



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias
Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

“Cambios en la expresión y función del receptor de glicina en el Núcleo Accumbens durante el envejecimiento”

Tesis para optar al grado de Doctor(a) en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

MACARENA SOFÍA KONAR NIÉ
CONCEPCIÓN-CHILE
2023

Profesor Tutor: Dr. Luis Gerardo Aguayo Hernández
Depto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Concepción.

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Neurofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Luis Gerardo Aguayo Hernández
Profesor tutor de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Katterine Salazar
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Patricio Castro Maldonado
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Marco Fuenzalida Núñez
Universidad de Valparaíso

Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto NIH RO1 025718, Fondecyt 1221080

Beca de Doctorado Nacional ANID # 21201459

AGRADECIMIENTOS

En este apartado me gustaría agradecer primeramente a Dios por darme la sabiduría, la fortaleza y la perseverancia que la realización de un doctorado requiere.

Quisiera agradecer a mi guía de tesis, el Dr. Luis Aguayo. Gracias por recibirme en su laboratorio y por confiar en mí. Gracias por poner en mis manos todas las herramientas que necesité durante el desarrollo de esta tesis y también por ser una fuente de inspiración en cuanto a su desarrollo científico.

Agradezco a cada una de las personas que conforman el laboratorio de Neurofisiología y el Departamento de Fisiología (son demasiados). Scarlet, Loreto, Nicol Romero y Lorena, gracias por su valiosa contribución en esta tesis. Carolina Benítez, agradezco muchísimo todo el conocimiento y la ayuda que me prestaste siempre. No puedo dejar de mencionar a las personas de mi salita: Óscar, Juliana, Nicolás, Robinson, Diego, Maca, Gerson, Pame y Pancho, gracias por hacer los días en el lab más bonitos. Sin duda fueron mi familia científica durante este tiempo. Gracias por los almuerzos, las conversaciones ñoñas y random, y la buena onda siempre. Gracias también a mis amigos, Kathleen, Sergio, Patito, Luciano, Coté por hacer mi vida más bonita y por ayudarme siempre que lo necesité, los quiero.

Quisiera agradecer también a diversas personas que permitieron que esta tesis se llevara a cabo. Las personas del CMA: Gustavo, Paul, Germán gracias por

todo el conocimiento aportado, por la confianza y la buena onda. Gracias al personal del CREAV y bioterio del departamento de Fisiología, por los conocimientos entregados y la dedicación con la que siempre cuidaron a nuestros animalitos. También quisiera agradecer al laboratorio de Biología celular, donde recibí mi primera formación científica y aprendí muchas de las técnicas que desarrollé en esta tesis. Gracias por la valiosa formación.

En el ámbito más personal, quisiera agradecer a mi familia. Gracias por aceptarme a mí y a mi pasión por la ciencia que me alejó físicamente de ustedes. Mamá, papá y mis otros papás (que cualquiera llamaría abuelos), gracias por su apoyo incondicional, los valores inculcados y el amor inmensurable que me han dado desde siempre. Los amo infinita y eternamente.

Gracias a mi compañero de vida, Magdiel. El científico que robó mi corazón y que me enseñó muchas de las cosas que sé del lab. Gracias por el apoyo incondicional, por el amor infinito y tu compañía todos estos años del doctorado (y más). Gracias por ser mi hogar y mi lugar seguro. Te amo.

Por último, quiero agradecerme a mí. Solo yo sé lo difícil que fue esta larga etapa llamada doctorado. Estar lejos de mi familia, no tener un descanso después de mi pregrado, cambiarme de laboratorio, adaptarme a un nuevo lugar, la pandemia, los contratiempos de salud, y otras dificultades que tuve que enfrentar en estos años, ahora valen la pena. Al fin se termina este largo, bonito y difícil

camino y doy paso a tachar una de mis más grandes metas: Ser Doctora en Ciencias Biológicas.

Gracias totales.

RESUMEN

El Núcleo accumbens (nAc) es una estructura cerebral clave en el sistema de recompensa. El nAc recibe e integra señalización aferente principalmente excitatoria originada desde diversas regiones del cerebro. El control inhibitorio es mediado por los receptores de ácido gama aminobutírico (GABA_A) y los receptores de Glicina (GlyR). Reportes de nuestro laboratorio demostraron la presencia de corrientes sinápticas glicinérgicas, provenientes de una región cerebral no identificada aún. Este proyecto tuvo como objetivo general determinar los cambios en la transmisión glicinérgica en el nAc durante el envejecimiento; donde se plantearon dos objetivos específicos: OS1: Caracterizar la expresión temporal y sub-celular de los GlyRs en el nAc de ratones adultos y envejecidos. OS2: Caracterizar la presencia y funcionalidad de la(s) aferencias glicinérgicas que llegan hasta el nAc de ratones adultos y envejecidos. Se encontró, usando *Western blot*, que los animales envejecidos de 12 y 18 meses muestran una reducción significativa en la subunidad β del GlyR, la cual permite al receptor anclarse a la sinapsis y una disminución en el ARNm de la subunidad $\alpha 2$ y $\alpha 3$ usando PCR cuantitativa.

La expresión de un virus retrógrado dependiente de la recombinasa Cre en el nAc de ratones GlyT2::Cre permitió determinar que la inervación glicinérgica que recibe el nAc proviene de la sustancia gris periacueductal lateral (IPAG). Esta inervación mostró ser discreta y no se vio sustancialmente afectada a nivel

estructural durante el envejecimiento. Ya que la IPAG tiene un rol en comportamientos defensivos y respuestas gratificantes al alcohol, indujimos la ablación neuronal glicinérgica sitio específica en la IPAG y evaluamos el consumo de etanol. Los animales con ablación glicinérgica exhibieron una disminución significativa en el consumo de etanol, sugiriendo que las neuronas glicinérgicas de la IPAG que inervan al nAc podrían participar en la inhibición/modulación requerida para generar recompensa y/o búsqueda, en respuesta al etanol, posiblemente mediado por la aversión al sabor.

El marcaje retrógrado nos permitió, además, evidenciar que la IPAG también provee de inervación glicinérgica al VTA. La comunicación IPAG-VTA-amígdala-nAc podría dar cuenta de un nuevo circuito neuronal que responde a comportamientos defensivos, aversivos y estímulos recompensantes relacionados con el sistema mesolímbico canónico. En conclusión, este trabajo de tesis da cuenta de que los GlyRs son susceptibles al envejecimiento y da cuenta de la existencia de nuevas proyecciones glicinérgicas de largo alcance que conectan el IPAG con el nAc. Estos hallazgos sugieren un papel hasta ahora desconocido de la inhibición glicinérgica y abre paso a nuevos estudios que permitan entender de manera acabada el rol de la transmisión glicinérgica en las regiones supraespinales del SNC.

ABSTRACT

The nucleus accumbens (nAc) is a key brain structure in the reward system. The nAc receives and integrates afferent signaling from several brain regions. Inhibitory control is mediated by gamma aminobutyric acid receptors (GABA_A) and glycine receptors (GlyR). Reports from our laboratory demonstrated the presence of glycinergic synaptic currents, coming from a brain region not yet identified. This project aimed to determine the changes in glycinergic transmission in the nAc during aging. Two specific objectives were set: SO1: Characterize the temporal and sub-cellular expression of GlyRs in the nAc of adult and aged mice, and SO2: Characterize the presence and functionality of the glycinergic input(s) that reach the nAc of adult and aged mice. Using Western blot, animals aged 12 and 18 months were found to show a significant reduction in the β subunit of GlyR, which allows the receptor to anchor to the synapse, and a decrease in $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunit mRNA using quantitative PCR.

The expression of a Cre recombinase-dependent retrograde virus in the nAc of GlyT2::Cre mice allowed us to determine that the glycinergic innervation received by the nAc comes from the lateral periaqueductal gray (IPAG). This innervation was shown to be discrete and was not substantially affected at the structural level during aging. Since IPAG has a role in defensive behaviors and rewarding responses to alcohol, we induced site-specific glycinergic neuronal ablation in the IPAG and assessed ethanol consumption. Animals with glycinergic ablation

exhibited a significant decrease in ethanol consumption, suggesting that IPAG glycinergic neurons innervating the nAc might participate in the inhibition/modulation required to generate reward and/or seeking in response to ethanol, possibly mediated due to taste aversion.

Retrograde labeling also showed that the IPAG provides glycinergic innervation to the VTA. The IPAG-VTA-amygdala-nAc communication could account for a new neural circuit that responds to defensive, aversive behaviors and rewarding stimuli related to the canonical mesolimbic system. In conclusion, this thesis work shows that GlyRs are susceptible to aging and shows the existence of new long-range glycinergic projections that connect the IPAG with the nAc. These findings suggest a hitherto unknown role of glycinergic inhibition and pave the way for new studies that will allow us to fully understand the role of glycinergic transmission in the supraspinal regions of the CNS.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
INDICE GENERAL	xi
INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE TABLAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
1.Envejecimiento cerebral	1
2.Núcleo accumbens	2
3.Inervación del nAc	3
4.Alteraciones en el nAc relacionadas al envejecimiento	5
4.1. Funcionales	5
4.2. Estructurales	7
5.Alteraciones en los niveles de neurotransmisores	8
6.Cambios en los receptores inhibitorios relacionados con la edad en el nAc	9
7.El receptor de glicina	10
8.Transmisión y sinapsis glicinérgica	12
9.Expresión del GlyR	14
10.Expresión temporal del GlyR	15
HIPÓTESIS	19
Objetivo general.	19
Objetivos específicos.	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Animales de experimentación	20
2. Preparación de las rebanadas cerebrales	20

3.	Disociación enzimática de neuronas accumbales	21
4.	Procesamiento histológico	22
4.1.	Fijación por perfusión vascular	22
4.2.	Procesamiento histológico para la obtención de cortes en vibrátomo.	22
4.3.	Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación	23
5.	Inmunofluorescencia	23
5.1.	Inmunohistoquímica	23
5.2.	Inmunocitoquímica	24
5.3.	Microscopía confocal espectral	26
6.	RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real	26
6.1.	Extracción de ARN total	26
6.2.	Transcripción reversa del ARN total (RT)	27
6.3.	Amplificación del ADNc por PCR	28
6.4.	Electroforesis en geles de agarosa	28
6.5.	RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).	29
7.	Ensayos de inmunodetección de proteínas	31
7.1.	Obtención de extractos de proteínas totales	31
7.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia	31
7.3.	Inmunodetección de las proteínas	32
8.	Cirugía estereotáxica	34
9.	Prueba de consumo de etanol (del inglés: Drinking in the dark DID)	35
10.	Concentración de etanol en sangre	36
11.	Prueba de campo abierto control (del inglés: Open field assay)	36
12.	Optogenética	37
13.	Análisis de datos	38

RESULTADOS	39
------------	----

Objetivo específico 1: Caracterizar la expresión temporal y sub-celular de los GlyRs en el nAc de ratones adultos y envejecidos. 39

Actividad 1: Análisis de la expresión del GlyR en el Núcleo accumbens. 39

Actividad 2: Estudiar la localización subcelular del receptor en las neuronas del nAc en las distintas etapas del ciclo vital. 48

Objetivo específico 2: Caracterizar la presencia y funcionalidad de la(s) aferencias glicinérgicas que llegan hasta el nAc (inervación) de ratones adultos y envejecidos. 58

Actividad 2.1: Realizar inyecciones estereotáxicas de trazadores retrógrados en el nAc de ratones GlyT2::Cre para estudiar el origen de la innervación glicinérgica. 58

Actividad 2.2: Estudiar neuronas glicinérgicas en IPAG a 6, 12 y 18 meses de edad. 80

Actividad 2.3. Estudiar las propiedades de los eventos sinápticos glicinérgicos optogenéticamente estimulados en animales que expresen el canal de rodopsina en las neuronas GlyT2 positivas para evaluar la funcionalidad de la innervación. 88

DISCUSIÓN	123
1. Alteraciones en la expresión temporal del GlyR en el nAc durante el envejecimiento	125
2. Estudio de la expresión génica de las subunidades durante el envejecimiento	127
3. Presencia de aferencias glicinérgicas que llegan hasta el nAc	130
4. El nAc recibe inervación glicinérgica de la IPAG	132
5. Inervación glicinérgica del mesencéfalo en animales durante el ciclo vital	134
6. Expresión de componentes GABAérgicos en el nAc durante el ciclo vital	137
7. Activación selectiva de ChR2 en neuronas glicinérgicas en la IPAG y el nAc	139
8. Consumo de etanol en animales con ablación neuronal glicinérgica sitio específica en la IPAG	140
9. Redes neuronales glicinérgicas que comunican a la IPAG con el sistema mesolímbico	144
GLOSARIO	151
BIBLIOGRAFÍA	153

INDICE DE FIGURAS

Esquema 1. Proyecciones aferentes y eferentes del nAc.	4
Esquema 2. Equivalencias de edades entre ratones C57BL/6J y seres humanos	18
Figura 1. Análisis inmunohistoquímico total del GlyR en el nAc de ratones de diferentes edades	41
Figura 2. Análisis de expresión proteica del GlyR en el nAc durante el envejecimiento	43
Figura 3. Evaluación de la expresión génica absoluta del GlyR en el nAc de ratones	45
Figura 4. Evaluación de la expresión génica temporal del GlyR en el nAc.	47
Figura 5. Estandarización de marcadores para inmunocitoquímica en neuronas hipocampales en cultivo	50
Figura 6. Análisis inmunocitoquímico del GlyR en neuronas hipocampales en cultivo	51
Figura 7. Análisis inmunocitoquímico de GlyR α en neuronas MSNs disociadas	53
Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de marcadores de organelos en el nAc	55
Figura 9. Análisis de la expresión de pan- α -GlyR en extractos citoplasmáticos, membranosos y nucleares de neuronas accumbales	57
Figura 10. Marcaje retrógrado de regiones cerebrales que inervan al nAc	60

Figura 11. Marcaje retrógrado de redes neuronales glicinérgicas que contactan al nAc.	64
Figura 12. Evaluación de la naturaleza glicinérgica de las neuronas EGFP+ del MB	67
Figura 13. Evaluación de la naturaleza GABAérgica de las neuronas EGFP+ del MB	69
Figura 14. Evaluación de la expresión de GlyT2 en neuronas EGFP+ del MB	71
Figura 15. Estudio exploratorio para la determinación del área del mesencéfalo que inerva al nAc	73
Figura 16. Análisis inmunohistoquímico de la región del mesencéfalo con un marcador para neuronas serotoninérgicas	75
Figura 17. Análisis inmunohistoquímico del animal GlyT2::EGFP en el mesencéfalo	77
Figura 18. Análisis inmunohistoquímico del nAc del animal GlyT2::EGFP.	79
Figura 19. Análisis estructural de la integridad de la innervación glicinérgica de la IPAG en animales durante el ciclo vital	81
Figura 20. Análisis de la expresión de componentes glicinérgicos en ratones a distintas edades	83
Figura 21. Análisis de la expresión de componentes glicinérgicos en ratones a distintas edades	85
Figura 22. Análisis de expresión proteica de componentes GABAérgicos en el nAc durante el ciclo vital	88
Figura 23. Generación de ratones que expresan el canalrodopsina-2 exclusivamente en neuronas glicinérgicas mediante el sistema Cre-Lox	92

Figura 24. Caracterización de la expresión del Canalrodopsina-2 en neuronas glicinérgicas de animales transgénicos	93
Figura 25. Expresión y activación de neuronas glicinérgicas por optogenética.	95
Figura 26. Expresión y activación de neuronas glicinérgicas en el nAc por optogenética	98
Figura 27. Análisis inmunohistoquímico de las cepas transgénicas utilizadas para el estudio de inervación glicinérgica	100
Figura 28. Ablación selectiva de neuronas glicinérgicas en la IPAG mediada por la expresión de caspasa-3 dependiente de la recombinasa Cre	105
Figura 29. Evaluación de la actividad locomotora y del peso corporal en animales con ablación neuronal glicinérgica sitio específica en la IPAG	108
Figura 30. Evaluación del consumo de etanol en animales con ablación glicinérgica en la IPAG mediada por caspasa-3 activa	111
Figura 31. Expresión de ChR2 en neuronas glicinérgicas en núcleo parainterfascicular del VTA.	113
Figura 32. Expresión de ChR2 en neuronas glicinérgicas en núcleo parainterfascicular del VTA	116
Figura 33. Análisis de la presencia de neuronas glicinérgicas en núcleo parainterfascicular del VTA	118
Figura 34. Marcaje retrógrado de redes neuronales glicinérgicas que contactan el VTA	120
Figura 35. Estudio de la ubicación de neuronas glicinérgicas que contactan el VTA y la IPAG	122
Esquema 3. Resumen gráfico.	124
Esquema 4. Eje VTA-nAc-IPAG-BLA	148

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia.	25
Tabla 2. Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.	30
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunodetección.	33
Tabla 4. Valores de distancia desde el sitio de inyección al sitio de proyección en milímetros y el radio de la inervación en micrómetros por cada animal analizado	64
Tabla 5. Cuantificación del número de neuronas contabilizadas en una rebanada cerebral que contiene mesencéfalo de 35 μm por cada animal analizado	65
Tabla 6. Alteraciones electrofisiológicas de la actividad glicinérgica en MSNs del nAc en ratones	127

INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento cerebral

El envejecimiento cerebral es un proceso fisiológico que involucra una serie de cambios estructurales, neuroquímicos y funcionales que pueden causar alteraciones progresivas en el control de circuitos e integración celular (Burke and Barnes, 2006; Ouda et al., 2015). Los cambios relacionados con la edad pueden provocar pérdida de la memoria, la percepción sensorial, la coordinación motora, la cognición, la memoria de trabajo y de las funciones ejecutivas (Alexander et al., 2012; Dykiert et al., 2012; Grau-Perales et al., 2019; Hahr, 2019; Noda et al., 2020; Ouda et al., 2015). Estas alteraciones pueden depender de factores como el estilo de vida, la dieta y los comportamientos sociales (Samarakoon et al., 2011). Se reconoce ampliamente que el envejecimiento afecta la función normal de varias regiones del cerebro, como el hipocampo (HC) y la corteza prefrontal (PFC) (Chang et al., 2005; Kelly et al., 2006; Morrison and Baxter, 2012; Rosenzweig et al., 2003). Ambas estructuras son parte del sistema de recompensa, sin embargo, regiones claves de este sistema cerebral como el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (nAc) han sido solo discretamente estudiadas en el contexto del envejecimiento.

2. Núcleo accumbens

El nAc es una estructura cerebral clave en el sistema de recompensa (Collins et al., 2016; Richter et al., 2020; Schall et al., 2020; Soares-Cunha et al., 2016). Participa en la regulación de los procesos motivacionales, emocionales y la interfaz límbico-motora (Buck et al., 2020; Kogias et al., 2020; Morrison et al., 2017; Schall et al., 2020). Además, el nAc juega un papel crítico en la memoria (Alejandro Borja et al., 2020), el aprendizaje (Zhang et al., 2020), la impulsividad en la toma de decisiones (Wang et al., 2019), los comportamientos de riesgo (Freels et al., 2020), el comportamiento alimenticio (Bond et al., 2020), la motivación sexual (Guadarrama-Bazante and Rodriguez-Manzo, 2019), aversión (Hurley and Carelli, 2020), comportamiento social (Fox et al., 2020), en depresión (Lee et al., 2020) y el consumo de etanol (Borrego et al., 2022; Ji et al., 2017; Liu et al., 2020b; Purohit et al., 2018). De manera interesante, varios de estos comportamientos se modifican con el envejecimiento.

Anatómicamente, el nAc está localizado en la porción medial ventral del cuerpo estriado. El accumbens se divide en un núcleo o “*core*” y un caparazón o “*shell*”, donde el núcleo está rodeado medial, ventral y lateralmente por el caparazón. Las principales diferencias entre el núcleo y caparazón están definidas por criterios histoquímicos, electrofisiológicos, conectómicos y morfológicos (Al-

Muhtasib et al., 2018; Meredith et al., 1992; Wright et al., 1996; Zaborszky et al., 1985).

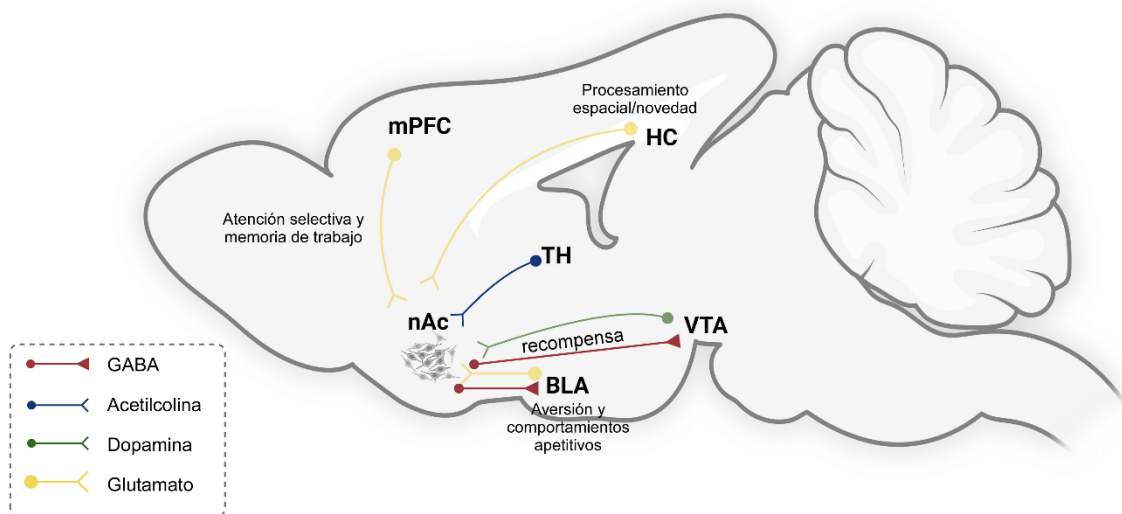
El nAc recibe e integra información de diversas regiones del cerebro (Floresco, 2015). Para la integración de la señalización aferente, el nAc está compuesto en un 95% por neuronas de naturaleza GABAérgica, las neuronas espinosas medianas (MSN) (Yager et al., 2015). Las MSNs están provistas de un amplio pool de receptores, entre ellos los receptores de dopamina de tipo 1 y 2 (D1R y D2R) (Allin et al., 1989; Woodruff et al., 1977), los receptores de Glutamato ionotrópicos y metabotrópicos (Manzoni et al., 1997; Tarazi et al., 1998), los receptores de ácido γ -aminobutírico de tipo A y B (GABA_{A-B}) (Akiyama et al., 2004), que junto al receptor de Glicina (GlyR) (Forstera et al., 2017), median la inhibición tanto sináptica, como no sináptica, proceso esencial para regular la excitabilidad de estos circuitos (Tepper and Bolam, 2004).

3. Inervación del nAc

El nAc recibe e integra información desde muchas áreas del cerebro, como el HC (Kelley and Domesick, 1982; Lopes da Silva et al., 1984; Yang and Mogenson, 1984), la amígdala basolateral (BLA) (Johnson et al., 1994; McDonald, 1991; Wright et al., 1996), la PFC (Beckstead, 1979; Gorelova and Yang, 1997; Montaron et al., 1996; Phillipson and Griffiths, 1985), el tálamo (Berendse and

Groenewegen, 1990; Brog et al., 1993; Phillipson and Griffiths, 1985) y el área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo (denominado como *midbrain* en inglés) (Fallon and Moore, 1978; Hnasko et al., 2012; Mingote et al., 2015; Phillipson and Griffiths, 1985), ver esquema 1.

Proyecciones aferentes y eferentes del núcleo Accumbens



Esquema 1. Proyecciones aferentes y eferentes del nAc. Un esquema simplificado de las principales conexiones dopaminérgicas (líneas verdes), glutamatérgicas (líneas amarillas), colinérgicas (líneas azules) y GABAérgicas (líneas rojas) que recibe el núcleo accumbens (nAc) en el cerebro de un roedor. El nAc recibe inervación dopaminérgica del área tegmental ventral (VTA) y a su vez el nAc provee de entradas GABAérgicas al VTA y a la amígdala basolateral (BLA). El nAc recibe inervación glutamatérgica de la corteza prefrontal medial (mPFC), el hipocampo (HC) y la BLA; mientras que la inervación colinérgica que llega al nAc se origina en el tálamo.

La naturaleza excitatoria de las entradas dopaminérgicas, glutamatérgicas o serotoninérgicas que llegan al nAc está bien establecida (Kelley and Domesick, 1982; Li et al., 1989; Ma et al., 2020; McDonald, 1991; Montaron et al., 1996; Qi et al., 2016). Con respecto a las entradas inhibitorias descritas para el nAc, sólo se había informado señalización inhibitoria de naturaleza GABAérgica (Van Bockstaele and Pickel, 1995). Sin embargo, nuestro grupo en los últimos años, informó la presencia de corrientes sinápticas inhibitorias mediadas por glicina en el nAc de ratones (Munoz et al., 2018). Los registros de *patch-clamp* mostraron corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura (mIPSC) glicinérgicas de baja frecuencia en MSN del nAc, que fueron bloqueadas por el antagonista del GlyR, estricnina 1 μ M (STN). Sin embargo, el origen de esta inervación glicinérgica es desconocido.

4. Alteraciones en el nAc relacionadas al envejecimiento

4.1. Funcionales

Recompensa. El envejecimiento no patológico se ha asociado con un rendimiento reducido en el aprendizaje relacionado con la recompensa. Estudios donde se emplea la resonancia magnética funcional (fMRI) para evidenciar cambios en la actividad cerebral han indicado que tanto los individuos jóvenes como los ancianos muestran activación del nAc en respuesta a estímulos

recompensantes, sugiriendo un procesamiento mesolímbico conservado en el envejecimiento (Schott et al., 2007). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que los individuos mayores muestran una activación reducida del estriado ventral o nAc en respuesta a la anticipación de posibles recompensas monetarias (Dreher et al., 2008) y que son más susceptibles a tomar decisiones financieras subóptimas que los adultos jóvenes (Mell et al., 2009); enfatizando la idea de que la toma de decisiones basada en la predicción de recompensas en adultos mayores, dependiente del nAc, es susceptible al envejecimiento.

Tiempos de selección de acciones. Se ha reportado que la atrofia del nAc en adultos mayores altera la capacidad de responder a tareas complejas. En concreto, los tiempos de selección de acciones frente a una tarea ejecutiva compleja son más largos en adultos mayores que en adultos jóvenes (Boisgontier et al., 2016). El hecho de que las personas mayores tardan más en determinar cómo responderán a una tarea compleja, sugiere que la integración de la comunicación neuronal en el nAc podría ser susceptible al envejecimiento.

Neofobia. El nAc participa en el aprendizaje de la aversión al gusto o neofobia y en el procesamiento de la palatabilidad del gusto (Fenu et al., 2001; Pedroza-Llinas et al., 2009; Ramirez-Lugo et al., 2007). Un estudio reciente realizado en animales informó que las ratas de edad avanzada presentan atenuación de la neofobia gustativa en comparación con animales adultos cuando se evaluó la

activación neuronal de neuronas del nAc en respuesta a un sabor nuevo (Grau-Perales et al., 2019).

En conjunto, estas alteraciones modifican la respuesta neurobiológica del nAc a procesos como la recompensa, el aprendizaje y la toma de decisiones y las conductas adictivas.

4.2. Estructurales

Pérdida de volumen. El cerebro humano disminuye su peso seco y, en consecuencia, el volumen a una tasa de alrededor del cinco por ciento por década después de los 40 años, lo que resulta en una disminución del 36 % en el peso total del cerebro envejecido (Svennerholm et al., 1997). Estos cambios en el volumen cerebral relacionados con la edad no son uniformes en todo el cerebro (Scahill et al., 2003; Trollor and Valenzuela, 2001; Yoo et al., 2016). En particular, el nAc parece estar sustancialmente afectado en el envejecimiento. Estudios de imágenes funcionales han demostrado que el nAc disminuye alrededor del 40% de su volumen durante el envejecimiento saludable (Jernigan et al., 2001; Liu et al., 2020a; Narvacan et al., 2017; Pressman et al., 2016; Walhovd et al., 2005; Walhovd et al., 2011; Wan et al., 2020). Se ha intentado determinar si esta pérdida de volumen accumbal podría estar asociada a una pérdida neuronal

masiva, sin embargo, la pérdida de neuronas en el nAc durante el envejecimiento normal del cerebro no parece ser significativa (Huang et al., 1995).

5. Alteraciones en los niveles de neurotransmisores.

El correcto funcionamiento de las redes neuronales, así como las interacciones a través de las sinapsis químicas, está significativamente mediado por los neurotransmisores (NT). Por ello, diversos estudios han intentado determinar si existen alteraciones relacionadas con la edad, en los niveles de NTs presentes en el nAc. En este contexto, los estudios han sugerido que los niveles de GABA o glutamato en el nAc de animales envejecidos no se alteran en comparación con animales jóvenes. A diferencia de GABA y glutamato (Kashyap et al., 2019; Segovia et al., 1999), los niveles de dopamina en nAc parecen alterarse significativamente con el envejecimiento (Huang et al., 1995; Karrer et al., 2017; Winner et al., 2017). Por otro lado, aunque se ha informado que la acetilcolina y la glicina están presentes en el accumbens, sus niveles no se han evaluado en el cerebro envejecido (Collins et al., 2016; Munoz et al., 2018). En cuanto a los niveles de glicina durante el envejecimiento, se sabe que estos decrecen en regiones espinales de ratas de 24 meses de edad (Hunter et al., 1989). Estos hallazgos de hace ya dos décadas no han sido reproducidos, ni se han ampliado a regiones cerebrales supraespinales.

6. Cambios en los receptores inhibitorios relacionados con la edad en el nAc.

El envejecimiento cerebral y las alteraciones de la neurotransmisión están ampliamente relacionados con cambios en la expresión y función de los receptores de neurotransmisores (de Oliveira et al., 2019; Utkin, 2019). Estos mediadores de la comunicación intercelular regulan la actividad neuronal mediante la apertura de canales iónicos (receptores ionotrópicos) o mediante la generación de segundos mensajeros (receptores metabotrópicos), siendo clave para una correcta neurotransmisión. El ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina son los principales neurotransmisores inhibitorios en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos (Martin and Siggins, 2002).

La alteración de la estructura y/o función de los receptores de neurotransmisores inhibitorios en el nAc ha sido discretamente estudiada. Existe solo un artículo en donde se evaluó la funcionalidad del receptor de GABA_AR en el nAc de ratas, mediante estudios de unión a radioligando, el cual indicó que los receptores GABA_AR no sufren alteraciones en la afinidad por su ligando en el núcleo accumbens de ratas envejecidas (24-30 meses) (Govoni et al., 1980). Todavía no hay estudios adicionales que respalden o contradigan estos hallazgos. Sin embargo, antecedentes de nuestro grupo de investigación (no publicados), en donde se evaluaron los eventos sinápticos mediados por receptores de GABA_AR

mediante la técnica de *Patch clamp* (usando un cóctel de inhibidores) en rebanadas cerebrales de ratones adultos (2 meses de edad) y de edad avanzada (12-14 meses), se evidenció que el porcentaje de eventos sinápticos asociados a la activación de receptores GABA_AR no muestra diferencias significativas en animales jóvenes respecto de los ratones de edad avanzada. Sugiriendo que los GABA_AR no alteran su funcionalidad en el nAc durante el envejecimiento. Usando la misma metodología (en presencia de Bicuculina), y dado que se reconoce la expresión de los receptores de glicina (GlyRs) en el nAc (Forstera et al., 2017), se evaluó la transmisión glicinérgica mediada por el GlyR en las neuronas accumbales. Se determinó que, en los ratones de 2 meses, el 64% de las neuronas registradas presentan eventos glicinérgicos mientras que, en animales de 12 meses, tan sólo el 43% de éstas exhiben eventos glicinérgicos, sugiriendo que en el envejecimiento podrían existir cambios en la función y/o expresión del GlyR (Gallegos et al., manuscrito en preparación).

7. El receptor de glicina

El receptor de Glicina es un canal de cloruro regulado por ligando perteneciente a la familia de receptores de neurotransmisores ionotrópicos pentaméricos (pLGIC). La unión de su ligando, glicina, gatilla un cambio conformacional en este receptor, el cual produce la apertura del poro central, incrementando la conductancia de iones Cl⁻ para desencadenar la hiperpolarización en sinapsis

maduras (Miller and Smart, 2010). Los GlyRs son receptores pentaméricos, por ende, requieren el ensamblaje de cinco subunidades para ser funcionales. Se han identificado cuatro subunidades alfa (α 1- α 4) y una subunidad beta (β) (Dutertre et al., 2012; Laube et al., 2002; Lynch, 2004; Oertel et al., 2007). De manera interesante, α 1 y α 3 difieren estructuralmente de las subunidades α 2 y β , ya que contienen una señal de localización nuclear (NLS) en el dominio del bucle citosólico grande (Melzer et al., 2010), dicha característica podría atribuirle funciones al GlyR que no han sido estudiadas.

En general, la composición de subunidades de GlyRs determinará la función, ubicación y las propiedades cinéticas y farmacológicas del receptor (Chen et al., 2009; Deleuze et al., 2005; Han et al., 2004; Li and Slaughter, 2007; Yang et al., 2007). Basados en su composición, los GlyR pueden ser homoméricos, formados a partir de cinco subunidades α , o heteroméricos, formados a partir de subunidades α y β con una estequiometría de $3\alpha:2\beta$ (Burzomato et al., 2003). Las distintas conformaciones de estos receptores se diferencian por su sensibilidad a la picrotoxina (PTX), por ejemplo, se reconoce que los GlyR homoméricos son altamente sensibles a este alcaloide, mientras que el GlyR heteromérico es mucho menos sensible a PTX (Hawthorne and Lynch, 2005; Pribilla et al., 1992). Otra diferencia es la conductancia de dichas conformaciones. En general, los GlyR homoméricos exhiben estados de conductancia mayores bordeando 100 pS, mientras que los receptores heteroméricos exhiben una conductancia considerablemente menor cercana a los 45 pS (Lynch, 2004).

La subunidad β , además de permitir la formación de heteropentámeros, tiene un dominio citosólico que interacciona con una proteína de anclaje llamada gefirina, la cual, a su vez, interacciona con componentes del citoesqueleto para anclar al receptor a la sinapsis (Maric et al., 2011). De esta manera, a los receptores heteroméricos se les conoce como receptores sinápticos y a los homoméricos como no sinápticos (Avila et al., 2013).

8. Transmisión y sinapsis glicinérgica

La transmisión glicinérgica media diversas funciones entre las cuales se destacan el procesamiento de información motora como la coordinación de respuestas reflejas espinales, tono muscular y el ritmo respiratorio; el procesamiento de información auditiva, visual, y sensorial. Además, median la supresión de las señales nociceptivas o de dolor en la médula espinal. Debido a su importante rol, diversas mutaciones en los componentes de la sinapsis glicinérgica (subunidades del receptor, transportadores o proteínas que anclan al receptor a la sinapsis) dan origen a diversas patologías entre ellas, hipereflexia (Bode and Lynch, 2014), esclerosis lateral amiotrófica (Lorenzo et al., 2006), autismo (Pilorge et al., 2016; Zhang et al., 2017) y presbiacusia (Dlugaiczky et al., 2016).

La transmisión glicinérgica es mediada por el neurotransmisor glicina. La glicina puede provenir de la recaptación de la glicina circundante o de la síntesis *de novo*

a partir del aminoácido serina y tetrahidrofolato (THF) en una reacción reversible catalizada por la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) (Legendre, 2001). Los niveles de glicina en el espacio sináptico son regulados por la acción de dos transportadores dependientes de sodio, los transportadores de glicina 1 y 2 (GlyT1 y GlyT2) (Choi et al., 2011; Gomeza et al., 2003). El GlyT1 expresado en células gliales es el principal responsable de la terminación de la señal y del mantenimiento de bajos niveles de glicina en las sinapsis, mientras que GlyT2 (baja afinidad) expresado en neuronas, se encarga de recaptar altas concentraciones de glicina en los terminales presinápticos. La glicina recaptada es transportada posteriormente por el transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios VGAT/VIAAT de baja afinidad (Km de orden milimolar) para el llenado de las vesículas sinápticas para ser liberadas nuevamente en la sinapsis (Bormann, 2000).

En la sinapsis glicinérgica, los terminales presinápticos de las neuronas glicinérgicas que contienen vesículas con glicina, liberan estas vesículas al espacio sináptico e impactan sobre el GlyR localizado en la neurona postsináptica para inducir la entrada de iones Cl^- desencadenando la hiperpolarización o inhibición neuronal (Legendre, 2001).

Los receptores localizados en la región extrasináptica (responden a bajas concentraciones de ligando, por lo que son de alta afinidad) se les conoce como receptores no sinápticos y pueden activarse por el neurotransmisor liberado de

forma no vesicular o por difusión procedente de las sinapsis adyacentes. Así, la activación de los GlyRs persistente de los receptores por niveles bajos de glicina en la zona extrasináptica provocará una inhibición mantenida o también llamada «tónica», mientras que la activación de los receptores sinápticos por altas concentraciones de glicina liberada por exocitosis en la sinapsis provocará una inhibición de tipo «fásica» (Dutertre et al., 2012; Legendre, 2001; Maguire et al., 2014).

9. Expresión del GlyR

Los GlyRs se expresan mayormente en la médula espinal y el tronco encefálico (Baer et al., 2003; Baer et al., 2009; Muller and Snyder, 1978). También se ha demostrado su expresión en la retina (Sanchez-Chavez et al., 2017) y en regiones supraespinales, tales como el hipocampo (Jansen et al., 1989), la corteza prefrontal (Salling and Harrison, 2014), el núcleo dorsal del rafe (Maguire et al., 2014), el estriado (Lorenc-Koci et al., 1998; Waldvogel et al., 2007), la amígdala (Delaney et al., 2010) y el nAc (Forstera et al., 2017).

La expresión del GlyR en el nAc juega un papel clave en la regulación del circuito de recompensa, ya que regula los niveles de dopamina en *pos* de mantener el balance excitatorio/inhibitorio en el circuito de recompensa (Lido et al., 2011). Se reconoce ampliamente que el GlyR participa en la respuesta al consumo de

etanol (Forstera et al., 2017; Gallegos et al., 2019; Molander et al., 2005; Molander and Soderpalm, 2005), dando cuenta de la importancia de este receptor inhibitorio en comportamientos adictivos y control del circuito de recompensa.

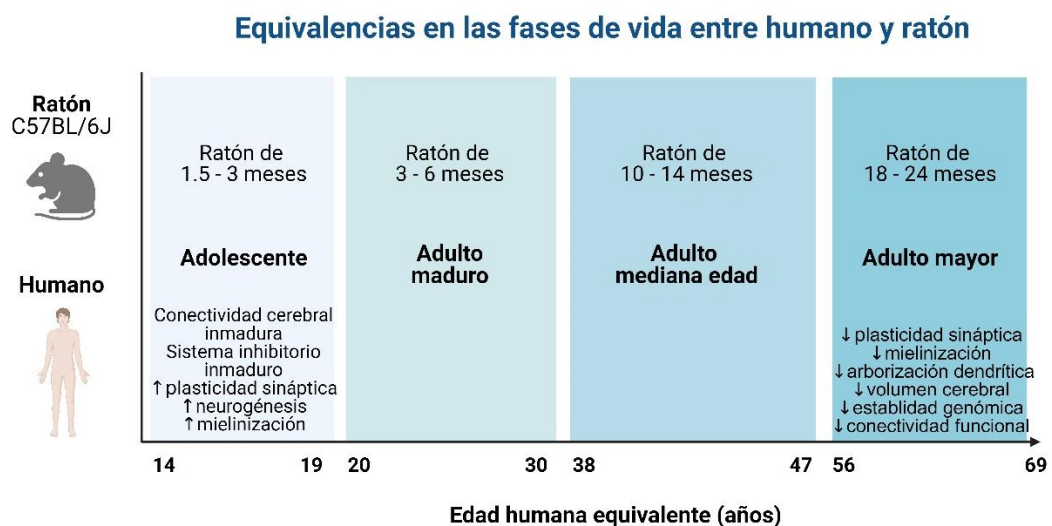
10. Expresión temporal del GlyR

La expresión de las distintas subunidades que componen al GlyR, en la medula espinal y el tronco encefálico, varían durante el desarrollo. En este contexto se sabe que, en estas regiones, la isoforma más abundante en estadios embrionarios es $\alpha 2$, mientras que, en la adultez, predomina la subunidad $\alpha 1$, en asociación con la subunidad β (Lynch, 2004). En relación con las distintas funciones de las subunidades, se ha demostrado que GlyR $\alpha 2$ controla la migración neuronal y el desarrollo de los circuitos en estadios tempranos (Avila et al., 2013; Avila et al., 2014; Morelli et al., 2017). Adicionalmente, $\alpha 2$ también parece modular el consumo de etanol, ya que los ratones *knock out* (KO) muestran una ingesta y preferencia reducidas de etanol (Blednov et al., 2015). En cuanto a la subunidad $\alpha 3$, esta tiene funciones importantes en la actividad del sistema auditivo, en la detección de señal de ruido y en la sensibilización del dolor inflamatorio central (Dlugaiczky et al., 2016; Harvey et al., 2009; Tziridis et al., 2017).

Los estudios que han reportado cambios en la expresión de las subunidades del GlyR en regiones supraespinales, se han llevado a cabo principalmente en el contexto del desarrollo. En este contexto, estudios con ratas mostraron que, en el hipocampo maduro, los GlyRs sinápticos disminuyen mientras que los receptores no sinápticos que contienen $\alpha 2/\alpha 3$ son los más abundantes (Aroeira et al., 2011), otro estudio indicó que en el hipocampo maduro predominan los ARNm de las subunidades $\alpha 2$ y β por sobre las transcripciones de $\alpha 1$ y $\alpha 3$; además, se informó que esta expresión predominante de las subunidades $\alpha 2$ y β se replicaron en la corteza prefrontal y el nAc (Jonsson et al., 2012). En línea con este estudio, se reportó que en el nAc de ratones jóvenes postnatal P21–P50, los GlyRs están compuestos principalmente por subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (McCracken et al., 2017). Además, usando ratones KO para las distintas subunidades, se informó que $\alpha 3$ mediaría las corrientes GlyR tónicas en el nAc, mientras que la subunidad $\alpha 2$ media las corrientes sinápticas (McCracken et al., 2017). Lo que es consistente con los estudios en ratas adultas que indicaron que el $\alpha 2\beta$ heteromérico parece ser la composición de subunidades más común en esta región del SNC (Jonsson et al., 2009). Los estudios sobre los cambios en la expresión de los GlyR en el contexto del envejecimiento cerebral son limitados. Un estudio se centró en los cambios en la expresión de los transcritos de las subunidades GlyR en el núcleo coclear dorsal en ratas de edad avanzada y encontró un aumento significativo relacionado con la edad en el ARN mensajero de la subunidad $\alpha 1$. Estos cambios condujeron a una disminución significativa

relacionada con la edad en el número total de sitios de unión a GlyR en las células del núcleo coclear dorsal (Wang et al., 2009).

Hasta la fecha no se han realizado estudios enfocados en estudiar la expresión y/o funcionalidad en el nAc de animales envejecidos. En línea con esto, fue de importancia abordar esta investigación en animales adultos, así como envejecidos, ya que la literatura indica que los animales adolescentes (< 3 meses) aún están desarrollándose (ver esquema 2), por lo que presentan un sistema inhibitorio inmaduro, están llevando a cabo procesos de neurogénesis y aún no está establecida por completa la conectividad cerebral funcional que se tendrá en la adultez (Egimendia et al., 2019; He and Crews, 2007; Walsh and Akopian, 2019). Los resultados obtenidos de animales adultos podrían dar paso a interpretaciones más cercanas al humano adulto que las investigaciones basadas en cerebros inmaduros.



Esquema 2. Equivalencias de edades entre ratones C57BL/6J y seres humanos.

Edades y equivalencias tomadas del libro sobre modelos de ratón en la investigación del envejecimiento llamado “The Mouse in Biomedical Research (Second Edition): Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research”. (Flurkey et al., 2007). Se esquematizan los diversos marcadores de envejecimiento que se han estudiado a nivel de envejecimiento cerebral según lo reportado en literatura (Egimendia et al., 2019; Hammelrath et al., 2016; He and Crews, 2007; Konar-Nie et al., 2022; Lopez-Otin et al., 2013; Radulescu et al., 2021; Walsh and Akopian, 2019).

La heterogeneidad en la expresión y función de las subunidades accumbales de GlyRs durante el envejecimiento podría ser funcionalmente relevante para explicar cambios conductuales y cognitivos o incluso cambios en el consumo de etanol.

En particular, **el presente proyecto tiene como principal objetivo determinar la existencia de cambios en la transmisión glicinérgica inducidos por el envejecimiento en el nAc**, una región del sistema de recompensa esencial para promover comportamientos tales como el aprendizaje, la motivación y las actividades apetitivas y hedónicas, los cuales parecen verse afectadas a medida que se envejece.

HIPÓTESIS

El envejecimiento induce cambios en las subunidades presentes en el GlyR junto a una disminución en la inervación glicinérgica en el núcleo Accumbens (nAc).

Objetivo general.

Determinar los cambios en propiedades de la transmisión glicinérgica en el nAc durante el envejecimiento.

Objetivos específicos.

Objetivo específico 1. Caracterizar la expresión temporal y sub-celular de los GlyRs en el nAc de ratones adultos y envejecidos.

Objetivo específico 2. Caracterizar la presencia y funcionalidad de la(s) aferencias glicinérgicas que llegan hasta el nAc (inervación) de ratones adultos y envejecidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

En esta tesis se utilizaron ratones C57BL/6J, ratones transgénicos Glyt2::Cre, GlyT2::EGFP, Ai32(ChR2-EYFP) (JAX #024109) y animales GlyT2Cre::Ai32 (ChR2-EYFP) de la edad de 6, 12 y/o 18 meses. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-25°C) y fotoperíodo (12/12 h luz/oscuridad), recibieron acceso libre al agua y fueron alimentados diariamente con pellet para roedores estándar (Lab Diet, 5P00 Prolab RMH 3000, Purina Mills, St. Louis, MO). Los animales de experimentación se manejaron según las normas de bioética del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

2. Preparación de las rebanadas cerebrales

Los ratones fueron decapitados siguiendo el protocolo descrito por Jun y colaboradores (Jun et al., 2011). Para cada animal, el cerebro fue rápidamente disectado y puesto en solución de corte (en mM): 194 Sucrosa, 30 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 Glucosa (pH 7.4) previamente saturado con 95% O₂ y 5% CO₂ por 30 minutos, luego se llevó a la cámara de corte para rebanar el cerebro en el vibrátomo (VT1200S, Leica, Alemania) y obtener rebanadas de 300 µm. Las rebanadas destinadas a la obtención de registros electrofisiológicos fueron posteriormente transferidas al líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) (en mM): 124 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄,

10 Glucosa, 2 CaCl₂ (pH 7.4 y ajustado con sacarosa a 315-320 mOsm) saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ a 30°C por 1 hora. Las rebanadas utilizadas para la obtención de lisados de proteínas fueron mantenidas en solución de corte hasta ser disectadas bajo lupa.

3. Disociación enzimática de neuronas accumbales

Para la obtención de neuronas aisladas, primero se seccionó el cerebro en rebanadas cerebrales coronales que contenían nAc en vibrátomo en la solución de corte. Luego de ser estabilizadas por 1 hora en aCSF (saturado con 95% O₂ y 5% CO₂) a 32 °C, las rebanadas luego fueron incubadas por 30 minutos en aCSF en presencia de 0.6 mg/ml de pronasa (Calbiochem/EMD Bioscience, Darmstadt, Alemania) a 37 °C. Posteriormente se procedió a hacer la disección de la región de interés y esas secciones fueron transferidas a un tubo que contiene DMEM bajo en glucosa sobre el cual se realizó una disociación mecánica usando puntas de pipetas de orden decreciente de tamaño. Se dejó decantar el 'debris' celular y el sobrenadante fue sembrado en placas y mantenido por 30 min a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Pasado ese periodo de incubación, las neuronas fueron fijadas con PFA al 4% por 20 min.

4. Procesamiento histológico

4.1. Fijación por perfusión vascular

Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilazina (80 mg/kg de peso corporal de ketamina y 10 mg/kg de peso corporal de xilazina) mediante inyección intraperitoneal. Una vez anestesiado, el animal se posicionó en la cámara de perfusión. A continuación, se realizó una incisión vertical de 5-6 cm a través de la pared abdominal y se procedió a exponer la cavidad pleural para acceder al corazón. Se posicionó la aguja de perfusión a través del ventrículo izquierdo hacia la aorta ascendente y se realizó una pequeña incisión en la aurícula derecha para crear una vía de salida de las soluciones para lavar y perfundir. Posteriormente, el animal fue perfundido con 40 mL de suero fisiológico durante 10 min y luego con 40 mL de PFA al 4% p/v por 15 min. El cerebro fue extraído y post-fijado por inmersión durante 24 h a 4 °C en PFA al 4% p/v.

4.2. Procesamiento histológico para la obtención de cortes en vibrátomo.

Para los cerebros cortados en vibrátomo, luego de la fijación por inmersión se mantuvieron en PBS 1X hasta su uso. Se obtuvieron rebanadas de 35 µm de espesor de la región de interés. Los cortes fueron coronales para el estudio de neuronas accumbales y sagitales para el estudio de neuronas del mesencéfalo. Los cortes fueron mantenidos en PBS 1X o en PBS 1X NaN₃ 0.02% para su preservación hasta su uso en inmunohistoquímica.

4.3. Procesamiento criogénico y obtención de cortes por congelación

Los cerebros cortados en Criostato, después de la perfusión vascular seguida de la post-fijación por inmersión en PFA 4%, fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% p/v por 3-5 días a 4 °C. Finalizado este periodo, se embebió la muestra en un compuesto crio-preservante NEG-50 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) el cual permite la obtención de una matriz sólida para la obtención de cortes por congelación. Se mantiene la muestra en -80°C por un periodo mínimo de 24 h o hasta el procesamiento. Los cerebros criopreservados posteriormente fueron cortados en el criostato en secciones con un grosor de 40 µm las que fueron depositadas en portaobjetos que se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

5. Inmunofluorescencia

5.1. Inmunohistoquímica

Se utilizaron rebanadas de 35 µm de tejido obtenidos ya sea por cortes en vibrátomo o criostato. Los cortes fueron lavados tres veces en solución tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 5 min. La mezcla de anticuerpos preparada en Tris PO₄ 1X-BSA 1 % Tritón X-100 0,2 % v/v se incubó a 4°C por 16 h en las diluciones correspondientes (Tabla 1). Posterior a la incubación con anticuerpo primario las muestras se lavaron 5 veces por 5 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubadas durante 2 h con los respectivos anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos (Alexa Fluor® Secondary Antibodies, Jackson

ImmunoResearch), diluidos en Tris-BSA 1 % Tritón X-100 0,2 % v/v. Como tinción nuclear se utilizó DAPI o TOPRO-3 (Gibco® Invitrogen, Life Technologies). La incubación se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente y oscuridad. Luego las muestras fueron lavadas 5 veces por 5 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y montadas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA).

5.2. Inmunocitoquímica

Las células obtenidas de la disociación enzimática de rebanadas que contienen nAc fueron sembradas en un sistema de cámara de cultivo sobre portaobjetos de 8 pocillos de 0.7 cm² de área (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). En la misma placa, fueron lavadas en tampón PBS 1X y fijadas por 20 min a temperatura ambiente en PFA al 4%, preparado en PBS pH 7,4. Posteriormente, las células fueron lavadas 5 veces por 5 min con tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y permeabilizadas con Tris-BSA 1 % Tritón X-100 0,2 % v/v por 10 min. Luego, fueron incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en tampón Tris-BSA 1 % Tritón X-100 0,2 % v/v por 16 h en cámara húmeda a 4°C. Luego fueron lavadas e incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios unidos a un fluoróforos (Alexa Fluor® Secondary Antibodies, Jackson ImmunoResearch) a temperatura ambiente por 2 h. Como tinción de contraste fue utilizada una tinción nuclear con DAPI. Finalmente, las células fueron lavadas y montadas con medio de montaje para fluorescencia (DAKO).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpos primarios inmunofluorescencia			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen (No. Cat.)
Anti-pan- α -GlyR	Conejo	1/400	Synaptic Systems (#146 008)
Anti-GlyR- β	Ratón	1/300	Synaptic Systems (#146 211)
Anti-MAP2	Cobayo	1/200	Synaptic Systems (#188 004)
Anti-Gefirina	Ratón	1/400	Synaptic Systems (#147 021)
Anti-GFP	Pollo	1/400	Synaptic Systems (#132 006)
Anti-recombinasa Cre	Conejo	1/200	Synaptic Systems (#257 003)
Anti-GlyT2	Cobayo	1/200	Synaptic Systems (#272 004)
Anti-TH-2	Conejo	1/200	Novus Biologicals (#NB300-109)
Anti-TH	Cobayo	1/200	Synaptic Systems (#213 104)
Anti-GAD1/67	Conejo	1/200	Synaptic Systems (#198 003)
Anti-Glicina	Conejo	1/100	Abcam (#ab9442)
Anti-Glicina	Conejo	1/100	Chemicon (AB139)
Anti-Lamina B1	Cabra	1/200	Santa Cruz (#sc-6216)
Anti-G β	Ratón	1/300	Santa Cruz (#sc-166123)
Anti-BiP	Ratón	1/200	Transduction Laboratories (#G73320)
Anti-EEA1	Ratón	1/200	Transduction Laboratories (#E41120)
Anti-LAMP1	Ratón	1/200	Transduction Laboratories (#L76620)

5.3. Microscopía confocal espectral

Muestras de cultivos celulares o cortes de tejidos con inmunofluorescencia fueron analizados utilizando un microscopio confocal espectral LSM780 NLO (Zeiss). Este equipo posee cinco líneas de láser de 405 nm, 458 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm y 633 nm y un detector policromático que permite la separación espectral. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software ZEN 2011 (Zeiss) con un tamaño de 1024 x 1024 x16 bits. Los parámetros que modifican la intensidad de fluorescencia capturada por el equipo, como potencia de láser y ganancia digital fueron seteados con muestras sin marcar. Para el análisis de muestras en las cuales era necesario recuperar más información, se realizó un escaneo segmentado de manera automatizada en los planos x, y, z con un objetivo de 25x, mediante la modalidad mosaico o tile scan y z-stack.

6. RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real

6.1. Extracción de ARN total

Se obtuvo ARN total del nAc de ratones C57BL/6J. El ARN fue extraído mediante el método de extracción tiocianato de guanidinafenol/cloroformo, homogenizando las muestras en 300 a 500 µL de Trizol®, dependiendo de la cantidad de tejido e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 120 a 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos e incubó a

temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C, para separar las fases. Una vez recuperada la fase acuosa, se agregaron 500 µL de isopropanol a cada muestra, las que fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado dos veces con 500 µL de etanol 70% v/v y centrifugado a 12.000 g por 5 min a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 10 µL de agua libre de ARNasa. El ARN total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza se midió por la relación 260/280 nm.

6.2. Transcripción reversa del ARN total (RT)

Previo a la síntesis de ADNc 2 µg de ARN total fueron tratados con ADNasa (Fermentas International Inc.). La síntesis de ADNc fue realizada utilizando el AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Inc.). Para un volumen final de 20 µL, se incubó la mezcla anterior con 0.5 µg de OligodT, denaturado a 70°C por 5 min y llevado a hielo por 2 min. Posteriormente, se agregó el tampón de transcripción (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNasa y se incubó por 5 min a 37°C. Finalmente, se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid® H Minus M-MuLV (Fermentas 45 International Inc.) y se incubó por 1 h a 42°C. Al finalizar la reacción la muestra fue calentada a 70°C por 10 min.

6.3. Amplificación del ADNc por PCR

La reacción de amplificación del ADNc obtenido se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) en presencia de los distintos partidores específicos (Tabla 2). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8% v/v, MgCl₂ 1.5 mM, mezcla de dNTPs (0.2 mM de cada uno), partidores específicos 0.2 µM, Taq ADN polimerasa 0.31 U (Fermentas) y 1 µL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12.5 µL. La mezcla fue incubada inicialmente a 95°C por 5 min, luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 30 s, T_m específica de cada par de partidores (°C) por 30 s y 72°C por 30 - 60 s, por último, se realizó una extensión final de 72°C por 7 min. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el servidor OligoAnalyzer 3.1, teniendo en cuenta su T_m, el porcentaje de GC, la formación de dímeros, y el tamaño del producto de PCR.

6.4. Electroforesis en geles de agarosa

Para la identificación de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa 1% p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0.2 µg/mL. Se utilizó tampón de carga 6X que contenía glicerol 30% v/v, azul de bromofenol 0,5% p/v en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM). Como estándar de peso molecular se sembraron 0.5 µg de un estándar de 100 pares de bases. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 80 V por 50 min

en tampón TAE 1X en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN en el gel fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.5. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

Este ensayo fue realizado en secciones disectadas desde rebanadas coronales de ratón que contenían nAc. Se obtuvieron muestras de ARN total por triplicado y los procesos de extracción de ARN y transcripción reversa fueron realizadas de la misma forma que para el RT-PCR convencional. Para este ensayo se utilizó el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). La mezcla de volumen final de 12.5 µL contenía 1 µL de ADNc y 500 nM de los partidores (Tabla 2). Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min, luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 15 s y 72°C por 15 s, en el termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.). La cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) en relación al gen de referencia ciclofilina. Los resultados fueron expresados aplicando el método $\Delta\Delta C_t$ en los cuales la cantidad de ARN fue expresada como X veces sobre una muestra utilizada como referencia. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 6.01.

Tabla 2. Partidores utilizados para RT-PCR convencional y qRT-PCR.

Nombre	Partidor sense 5'-3'	Partidor antisense 5'-3'	Producto (pb)
Gira1	GCACCAAGCACTACAACA	AGGACAGGATGACGATGAG C	123
Gira2	GAGACAGCAGTGGAATGAT TC	TCCGCAACAACCTTGTTGTCA G	167
Gira3	GCCTCCTGATCGTTATTCT ATC	GAACTCTGTGTGGTCATAGT AAG	112
Ciclofilin a	ATAATGGCACTGGTGGCAA GTC	ATTCCTGGACCCAAAACGCT CC	239

7. Ensayos de inmunodetección de proteínas

7.1. Obtención de extractos de proteínas totales

Extractos de proteínas totales fueron obtenidos a partir de tejido accumbal de ratón. Los tejidos fueron lavados en PBS y homogenizados en solución inhibidora de proteasas 1X (Roche) y mantenidas en hielo. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas en un sonicador de baño (Cole-Parmer 8850, Estados Unidos). Se realizaron tres pulsos de 2 minutos de duración con intervalos de 30 segundos en hielo y luego centrifugadas por 10 min a 8.000 g a 4°C. El sobrenadante obtenido se conservó a -80°C. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc.) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

7.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia

Los extractos de proteínas fueron diluidos en tampón de carga 6X que contenía Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 4% p/v, glicerol 20 % v/v β-mercaptoetanol 1,25 M y azul de bromofenol 0,04 % p/v, para luego ser calentados a 95 °C por 2 minutos. Se sembraron 30-50 µg de extractos de proteínas por pocillo. Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles al 10 % v/v de acrilamida/bisacrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 80 V por aproximadamente 180 min, usando como buffer de corrida tampón

Tris-glicina [Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % p/v, pH 6,8]. Las proteínas fueron luego transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno Immobilon-P®. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol 20 % v/v. La electrotransferencia fue realizada en frío a 250 mA durante 2 h. Para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se tiñó con solución rojo Ponceau 0.2 % p/v.

7.3. Inmunodetección de las proteínas

Para la inmunodetección de las proteínas transferidas, la membrana fue bloqueada con leche descremada 5% p/v en tampón TBS-T [Tris 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%] durante 1 h. Luego, fueron incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 3) diluido en TBS-T leche por 16 h a 4°C. Posteriormente, la membrana fue lavada 5 veces con TBS-T por 5 min, para luego ser bloqueada por 1h con TBS-T leche. Posteriormente, la membrana fue incubada por 2 h con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado a peroxidasa de rabanito picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluido 1:5000 en TBS-T leche. Una vez finalizada la incubación, la membrana fue lavada con TBS-T, 5 veces por 5 min. Para el revelado, la membrana es incubada con sustratos de quimioluminiscencia (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories, Inc.), en donde la señal quimioluminiscente es capturada

en un equipo automatizado de captura de imágenes fluorescentes/quimioluminiscentes LI-COR (Biosciences, Inc). El análisis densitométrico de cada banda se realizó con el software Quantity one®.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunodetección.

Anticuerpos primarios para <i>Western Blot</i>			
Anticuerpo	Especie	Dilución	Origen (No. Cat.)
Anti-pan- α -GlyR	Conejo	1/1000	Synaptic Systems (#146 008)
Anti-GlyR- β	Ratón	1/200	Synaptic Systems (#146 211)
Anti-G β	Ratón	1/300	Santa Cruz (#sc-166123)
Anti-GlyT2	Cobayo	1/200	Synaptic Systems (#272 004)
Anti-GAD67	Conejo	1/1000	Synaptic Systems (#198 003)
Anti-VGAT	Conejo	1/1000	Chemicon (#AB5062P)
Anti-NaK-ATPase	Conejo	1/1000	Cell Signaling Technology (#3010)
Anti-Lamina B1	Conejo	1/1000	Santa Cruz (#sc-6216)

8. Cirugía estereotáxica

Ratones WT o GlyT2::Cre fueron anestesiados en una cámara con 4% isofluorano y 0,5 L/min de O₂ (VIP 3000 Veterinary Vaporizer, Midmark). El pelaje de la cabeza fue removido y se ubicó el animal en posición decúbito ventral en el armazón de estereotaxia provisto de una manta calefactora y cámara de anestesia continua a 2-2.5% de isofluorano y 0,5 lts/min de O₂. A continuación se le administró ketoprofeno 0.1-0.2 mg/kg por vía subcutánea y gel ocular en los ojos del animal. Se realizó una incisión para exponer el cráneo. Se perforó el cráneo y se inyectó en la región de interés con una jeringa Hamilton de 1 μ L Neuros 7001 KH, Hamilton Company, Estados Unidos). Coordenadas nAc: antero-posterior 1.3 mm, medial-lateral \pm 1.1 mm y dorso-ventral 4.0 mm con respecto al bregma (Franklin and Paxinos 2008). Coordenadas IPAG: antero-posterior -4.75 mm, medial-lateral \pm 0.36 mm y dorso-ventral 2.0 mm con respecto al bregma. Coordenadas VTA: antero-posterior -2.9 mm, medial-lateral \pm 0.4 mm y dorso-ventral 4.0 mm con respecto al bregma. Se inyectó un volumen de 400 nL en el nAc o VTA del hemisferio izquierdo el adenovirus retrógrado: AAV-hSyn-EGFP (#50465, Addgene) para los animales GlyT2::Cre. Luego de la cirugía los ratones se devolvieron a sus jaulas y al día siguientes se les administró ketoprofeno vía intraperitoneal. Posterior a 6 semanas se procedió a la perfusión del animal, extracción del cerebro y procesamiento histológico. A los animales WT se les inyectó un volumen de 100 nL de la subunidad B de la Toxina del

cólera asociada Alexa Fluor 543 (CT-B 543, Biotium) y luego de 7 días se procesó el tejido. Para la ablación de neuronas glicinérgicas, se inyectó 1 μ L del virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o 0.5 μ L del virus control AAV-DIO-mApple en la sustancia gris periacudectal lateral (IPAG) de ratones GlyT2::Cre, luego de dos semanas, se sometieron a los estudios de comportamiento y posteriormente se procedió a la perfusión del animal, extracción del cerebro y procesamiento histológico.

9. Prueba de consumo de etanol (del inglés: Drinking in the dark DID)

La prueba DID se realiza en el periodo circadiano más activo del ratón, el ciclo de oscuridad. En este periodo se provee al animal de una botella con etanol por un límite de 2-4 horas, según el protocolo descrito por Thiele et al (Thiele, Crabbe et al. 2014). Los ratones se seleccionaron y dispusieron en jaulas individuales con disponibilidad *ad libitum* de agua y comida. Luego se cambió su ciclo de oscuridad de 8:00 pm-8:00 am a 12:00 pm-12:00 am. El cambio de horario fue realizado una hora al día y los ratones se dejaron 2 días para ambientación. Se ocuparon botellas de vidrio de 25 ml con *sipper* con bola de acero inoxidable. Se preparó solución de etanol al 15% y se reemplazaron las botellas de agua por botellas con una solución de etanol al 15% v/v después de 2 horas de inicio del ciclo de oscuridad. Cada botella fue pesada antes y después de cada sesión de consumo, 2 horas en los días 1-3, y el cuarto y último día, se dejó la botella con etanol por 4 horas. El peso de los ratones se midió el primer y último día de

prueba. El consumo de etanol fue registrado como gramos de etanol por kilogramo de peso del ratón (g/kg).

10. Concentración de etanol en sangre

Se evaluó la concentración de etanol en sangre (BEC, del inglés: Blood Ethanol Concentration) en los ratones sometidos a la prueba de consumo de etanol. Al día 4, en donde a los animales se les permite el acceso por 4 horas a la solución con etanol, se les extrajo sangre desde la vena facial (20-50 µl) inmediatamente después de terminar la sesión de consumo. Las muestras de sangre fueron centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm para extraer el suero. La concentración de etanol en sangre o BEC fue determinada en el suero, usando el equipo Analox AM1 Alcohol Analyzer (Analox Instruments Limited, UK). Los datos de BEC se muestran como miligramos de etanol por decilitro de sangre (mg/dl).

11. Prueba de campo abierto control (del inglés: Open field assay)

Prueba para evaluar la actividad locomotora exploratoria de ratones descrita en literatura (Seibenhener and Wooten, 2015). Los ratones se ubican en el centro de una caja equipada con una cámara de video, para que exploren de manera libre durante 20 minutos. Utilizando el software de seguimiento ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL), se analiza la distancia total recorrida de cada

ratón, cada 5 minutos. Se analiza, además, el tiempo que los ratones recorren el centro de la caja versus los bordes, parámetro que se utiliza para evidenciar la presencia o ausencia de un comportamiento ansioso en el animal.

12. Optogenética

Para los experimentos optogenéticos, se hizo uso de ratones transgénicos GlyT2 Cre::Ai32 (ChR2/EYFP) de 2-6 meses, los cuales poseen el ChR2 en neuronas que expresan GlyT2. Después de la obtención de rebanas coronales de 300 μm que contienen nAc, estas se estabilizaron en solución aCSF (en mM): 124 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 Glucosa, 2 CaCl₂ (pH 7.4 y ajustado con sacarosa a 315-320 mOsm) saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ a 32°C por 1 hora. Las rebanadas fueron transferidas a la cámara de registro calefaccionada a 32 °C (Warner Instruments, Camden, CT) en el microscopio Nikon Eclipse FN1 (Nikon, Japón) equipado con óptica DIC-IR. A continuación, se posicionó la fibra de estimulación LED de 470 nm a 500 μm de distancia y se estimuló el área del nAc o IPAG con pulsos de 1 ms de duración. Inmediatamente después de la fotoestimulación, se registraron los oIPSCs usando la modalidad de célula completa con fijación de voltaje a -60 mV. Para esos experimentos se utilizó una solución interna baja en potasio que se compone de (mM): 120 CsCl, 10 BAPTA, 4.0 MgCl₂, 0.5 GTP, 2 ATP, and 10 HEPES (pH 7.40 ajustado con CsOH). Los registros electrofisiológicos fueron obtenidos digitalmente usando el

software Clampex 10.6 y analizados con Clampfit 10.1 para corrientes evocadas ópticamente.

13. Análisis de datos

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando t de Student y para condiciones con más de 2 factores se utilizó ANOVA (one-way o two-way) seguido por un post-test de Tukey o Bonferroni post hoc test. Un nivel de probabilidad (p) menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 Software para el análisis de los datos. n.s. no significativo.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Caracterizar la expresión temporal y sub-celular de los GlyRs en el nAc de ratones adultos y envejecidos.

Actividad 1: Análisis de la expresión del GlyR en el Núcleo accumbens.

Para estudiar la expresión proteica del GlyR en el nAc de ratones a distintas edades, primero se realizó un análisis inmunohistoquímico en animales de 6, 12 y 18 meses de edad (Fig. 1). Para ello utilizamos el anticuerpo pan α -GlyR que reconoce todas las subunidades α del receptor en estudio ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). De esta manera se etiquetaron secciones coronales estriatales con anticuerpos anti- α -GlyR (verde), anti-MAP2 (rojo) como marcador neuronal y DAPI (azul) como marcador nuclear. Fue posible inmunodetectar α -GlyR en el nAc de ratones 6 (A-D), 12 (E-H) y 18 meses (I-L). Para denotar la presencia del receptor en la periferia celular, se muestran imágenes ampliadas (B, F y J). Con el objetivo de tener un análisis preliminar sobre los cambios en los niveles de expresión proteica del receptor (niveles totales), se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia total (M) a las distintas edades. De este análisis se encontró que los ratones de 6 meses exhiben una intensidad de fluorescencia promedio de 15157 ± 813 UA, los ratones de 12 meses exhibieron un promedio de 11858 ± 422 UA, mientras que en los animales de 18 meses se cuantificó un promedio de 10720 ± 1142 UA. Estos datos dieron cuenta de que la inmunoreactividad

asociada a pan- α -GlyR exhibió una disminución significativa en el nAc de ratones de 18 meses comparados con los animales de 6 meses ($F(2,9)=7.434$; $p=0.0124$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, $n=10$ células por cada condición, $n=4$ animales por cada condición).

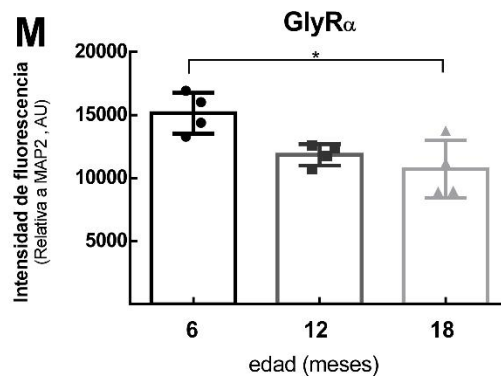
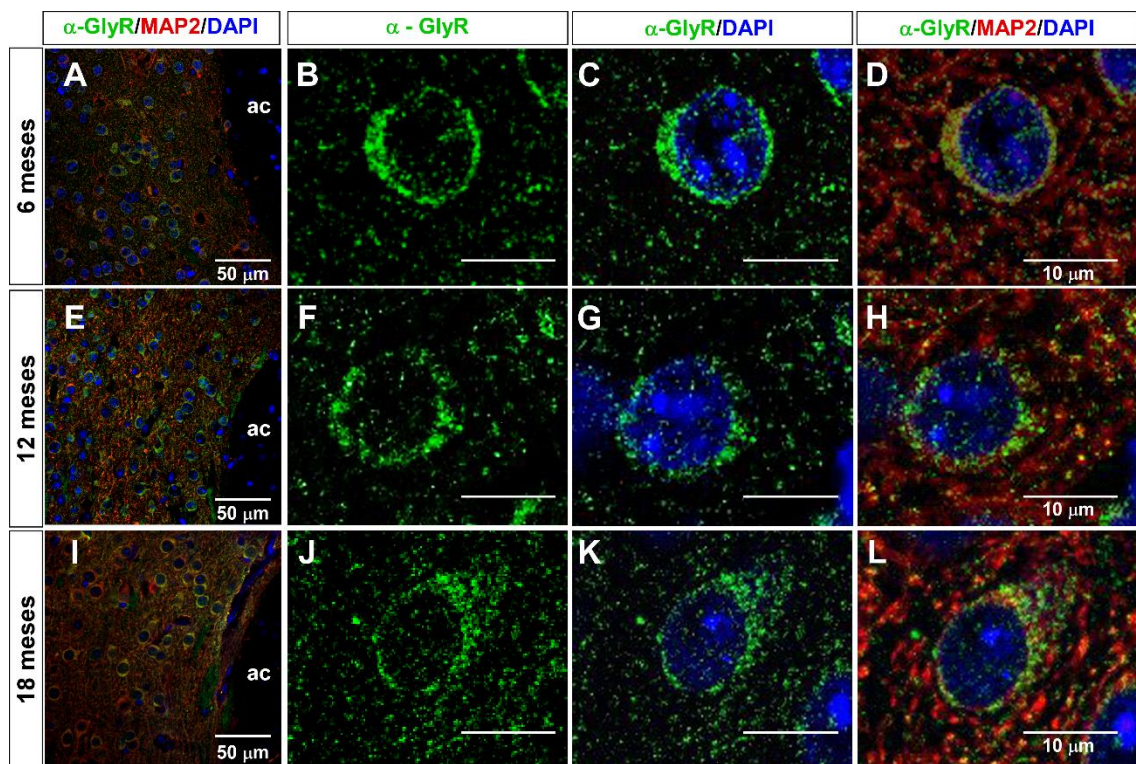


Figura 1. Análisis inmunohistoquímico total del GlyR en el nAc de ratones de diferentes edades. A-L. Secciones coronales de ratón inmunoteñidas con anti-pan- α -GlyR (verde), anti-MAP-2 (rojo) y DAPI (azul) como marcador nuclear. Ratones de 6 (A-D), 12 (E-H) y 18 meses de edad (I-L). Para cada una de las edades, se muestran fotomicrografías ampliadas representativas de la distribución celular del receptor en las respectivas edades (B, F, J). C, G y K. Superposición de pan- α -GlyR y DAPI. D, H y L. Superposición de pan- α -GlyR (verde), MAP-2 (rojo) y DAPI. Escala: 10 μ m. ac: comisura anterior. M. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total para α -GlyR en el nAc de ratones de 6 (círculo), 12 (rectángulo) y 18 meses (triángulo) mediante el uso del programa de procesamiento de imagen Image J. UA: unidades arbitrarias. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía con un post-test de Tukey, $n = 4$, $*** p < 0.001$.

A continuación, para determinar los niveles proteicos totales del GlyR (subunidades α y β), hicimos uso de una técnica de mayor sensibilidad, el ensayo de *Western blot*, el cual se realizó sobre lisados de micro disecciones del nAc de ratones a las distintas edades (Fig. 2). El análisis densitométrico confirmó los datos obtenidos mediante inmunohistoquímica. En concreto, la inmunodetección con el anticuerpo anti-pan α -GlyR asociada al análisis densitométrico (Fig. 2 A y B), mostró que los ratones de 18 meses exhiben niveles proteicos significativamente menores del GlyR que los ratones de 6 y 12 meses ($F(2,13)=8.567$; $p=0.0042$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, $* p < 0.01$, $n=6$). En concreto, la cuantificación densitométrica asociada a la detección de pan α -GlyR arrojó valores de 1.041 ± 0.14 y 0.8719 ± 0.07 UA para los animales de 6 y 12 meses, respectivamente, mientras que los ratones de 18 meses exhibieron valores promedio 0.5949 ± 0.14

UA; representando un 30 % de disminución de la expresión total del GlyR α en el nAc envejecido.

De manera interesante, cuando evaluamos los niveles proteicos de la subunidad β del GlyR (Fig. 2 C y D), necesaria para la formación de receptores sinápticos, se evidenció que esta subunidad disminuye su expresión proteica de manera significativa en ratones de 18 meses o envejecidos. Específicamente, la inmunodetección mostró que los ratones de 12 y 18 meses exhiben niveles proteicos significativamente menores de la subunidad β del GlyR que los ratones de 6 meses ($F(2,16)=9.423$; $p=0.0020$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, $n= 5-7$ animales c/ condición. En concreto, la cuantificación densitométrica asociada a la subunidad β del GlyR arrojó valores de 0.9297 ± 0.10 UA para los animales de 6 meses, mientras que los ratones de 12 y 18 meses exhibieron valores promedio 0.4840 ± 0.05 y 0.5325 ± 0.07 UA, respectivamente. Este análisis demostró diferencias significativas en la expresión de esta subunidad estructural, la cual se tradujo en una disminución del 50% de su expresión en el nAc de animales envejecidos.

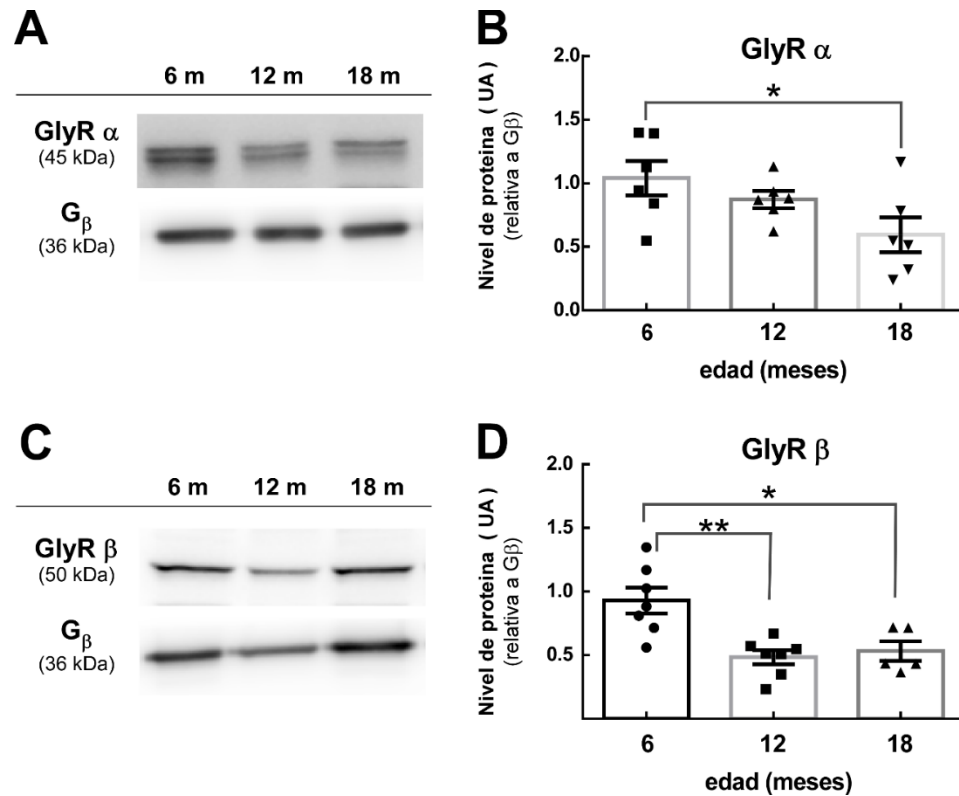


Figura 2. Análisis de expresión proteica del GlyR en el nAc durante el envejecimiento. A. Detección proteica de pan- α -GlyR en el nAc de ratones de 6, 12, 18 meses. B. Cuantificación densitométrica del nivel de proteína asociado a pan- α -GlyR C. Detección proteica de GlyR β . Como control de carga se utilizó el dímero G β . D. Análisis densitométrico del nivel de proteína: GlyR β . Los análisis densitométricos se realizaron con el software Quantity One. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía con un post-test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $n=5-7$ por cada condición.

A continuación, para poder discriminar cual o cuales son las subunidades que están modificando su expresión, hicimos uso de la técnica qRT-PCR. Primeramente, hicimos un análisis de la expresión absoluta de cada una de las

subunidades usando partidores específicos validados mediante ensayo de PCR convencional (Fig. 3, A). En este análisis se incluyeron animales de 2 meses para tener una referencia de lo que está ocurriendo en etapas más tempranas y si se correlacionan con la electrofisiología reportada en literatura. Los análisis estadísticos se realizaron en detalle en la figura siguiente ya que este grafico reúne los distintos estadios estudiados para denotar que subunidades α predominan en el nAc. En este sentido, la cuantificación absoluta de cada una de las subunidades mostró que, en los animales de 2 meses, la subunidad que se expresa predominantemente a nivel de ARNm en el nAc es la subunidad $\alpha 2$ (Gla2, amarillo), siendo considerablemente menor la expresión de $\alpha 1$ y $\alpha 3$ (Gla1 y 3 respectivamente) (B). De manera interesante, esta expresión predominante de $\alpha 2$ se mantuvo tanto en los animales de 6, 12 y 18 meses, aunque con un menor número de copias respecto a los ratones de 2 meses. Estos resultados sugieren que las neuronas MSNs del nAc expresan predominantemente la subunidad $\alpha 2$ en el individuo adulto y envejecido. Entender la composición del GlyR en animales de 2 meses es importante, ya que experimentos electrofisiológicos en nuestros (Forstera et al., 2017; Gallegos et al., 2019) y otros estudios utilizan animales de esta edad (Li et al., 2013; Lido et al., 2011; Maguire et al., 2014) y abre la pregunta sobre qué grado de maduración representa a esta edad más temprana en el desarrollo (Flurkey et al., 2007; Spear, 2016).

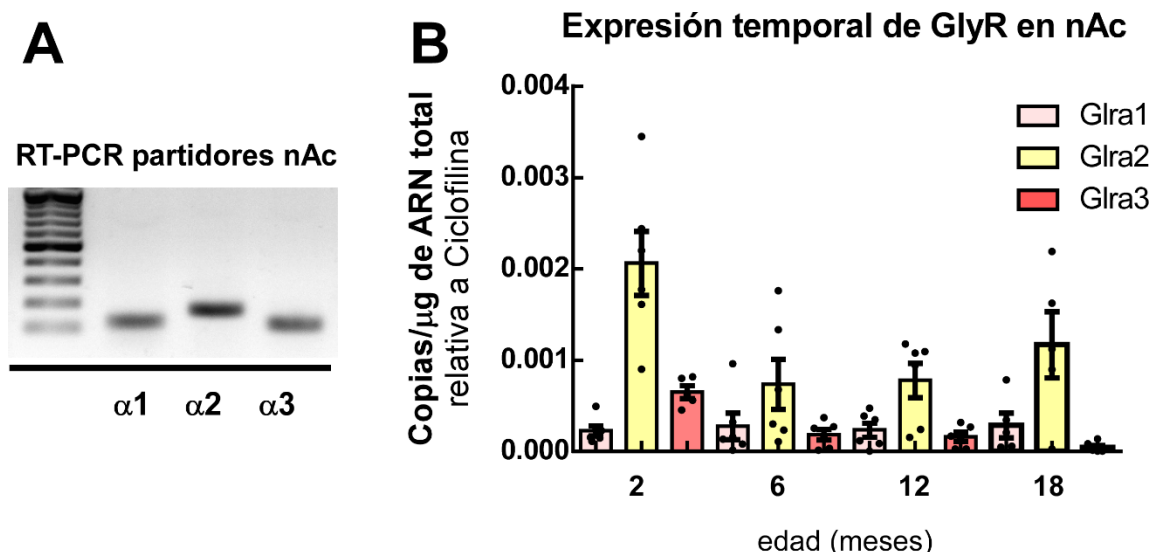


Figura 3. Evaluación de la expresión génica absoluta del GlyR en el nAc de ratones. A. Ensayo de RT-PCR para la validación de partidores de qPCR para los mensajeros de las subunidades $\alpha 1$ Glra1, $\alpha 2$ Glra2 y Glra3 $\alpha 3$ del GlyR, evaluada en el nAc de ratón de 2 meses. La reacción se evaluó a 35 ciclos utilizando una T_m de 55 °C. B. Análisis de expresión temporal por qPCR para Glra1 ($\alpha 1$), Glra2 ($\alpha 2$) y Glra3 ($\alpha 3$) (ver leyenda) desde nAc de ratones de 2, 6, 12 y 18 meses. Cuantificación absoluta expresada en número de copias por μ g de ARN total, relativa al gen ciclofilina. n= 5/6 animales c/condición.

A continuación, se analizó la expresión del mensajero para cada subunidad por separado y se relativizó al gen de referencia ciclofilina (Figura 4). La evaluación de la expresión de las distintas subunidades evidenció que, en el nAc de ratones, el mensajero para la subunidad $\alpha 1$, el gen Glra1, no muestra cambios significativos en ninguna de las edades evaluadas (A). Sin embargo, se logra ver una tendencia de aumento de la expresión en edades de 6 y 12 meses y una disminución en animales de 18 meses, sin embargo, no alcanza a ser

estadísticamente significativa ($F(3,19)= 0.0768$, $p=0.9718$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n=5/6$ animales c/condición).

Para la expresión del mensajero para la subunidad α_2 , se observó una disminución significativa en animales de 6 meses y 12 meses comparados con la expresión de los ratones jóvenes de 2 meses ($F(3, 19)=4.471$; $p=0.0155$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, $n=5/6$). Para el resto de las cohortes, no se evidenciaron cambios ni tendencias significativas en la expresión del mensajero para el gen *Gira2* (B). Sin embargo, cuando se evaluó la expresión relativa del gen de la subunidad α_3 , *Gira3*, se observó que los animales de 6, 12 y 18 meses muestran una expresión significativamente menor de α_3 , en comparación de los animales de 2 meses (C) ($F(3,19)=25.16$; $p<0.0001$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, *** $p < 0.0001$, $n=5/6$), implicando una disminución de un 70% en la expresión del gen asociado a la subunidad α_3 en animales de 6 y 12 meses y un 90% para los animales de 18 meses comparados con los de 2 meses. Estas diferencias, sugieren que el GlyR podría estar cambiando su composición en función de la edad en el nAc.

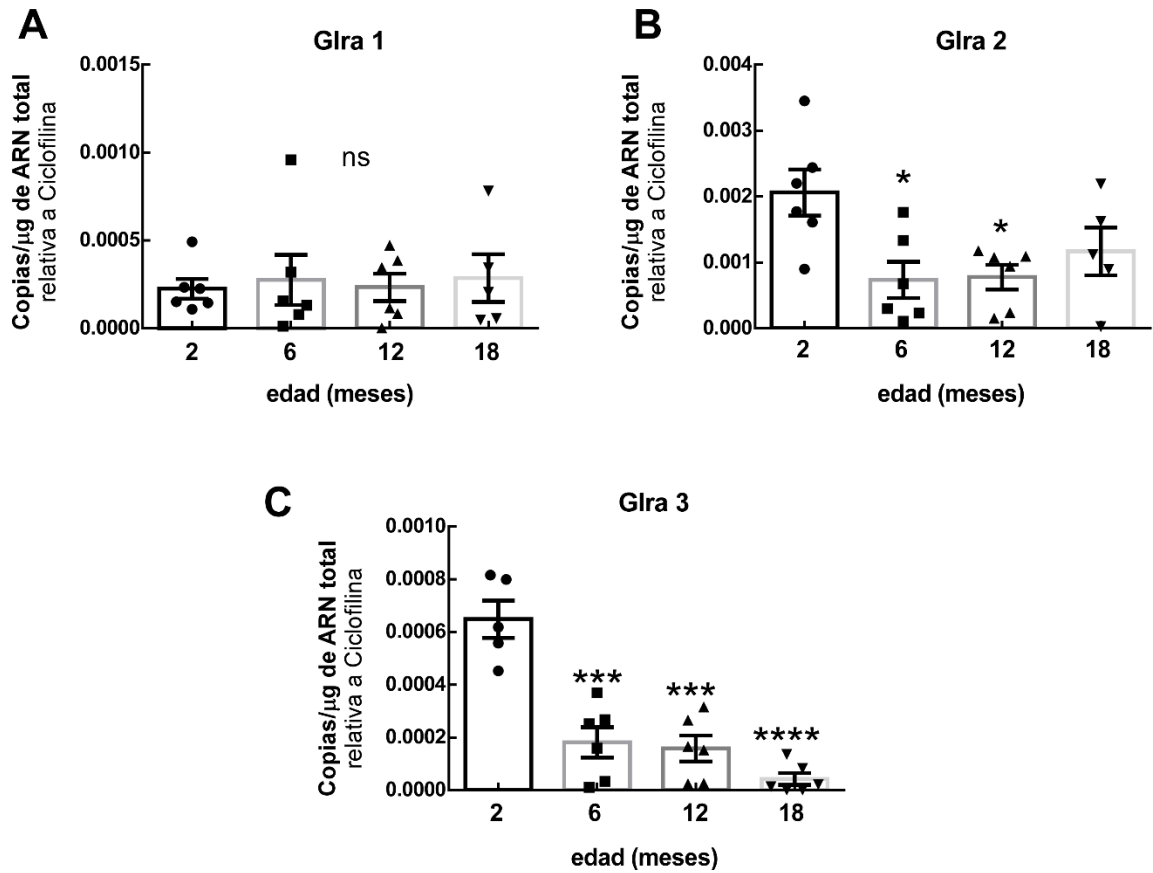


Figura 4. Evaluación de la expresión génica temporal del GlyR en el nAc. Ensayo de qPCR para los mensajeros de las subunidades α 1 Glra1 (A), α 2 Glra2 (B) y α 3 Glra3 (C) del GlyR desde nAc de ratones de 2 meses (círculos), 6 meses (rectángulos), 12 (triángulos) y 18 meses (triángulos invertidos). Cuantificación absoluta expresada en número de copias por mg de ARN total, relativa a la expresión de ciclofilina. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía con un post-test de Tukey. Las diferencias significativas fueron respecto a los datos de animales de 2 meses. ns: no significativo; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$, n=5/6 animales c/ condición.

En resumen, de los análisis de expresión, la data indica que la expresión del GlyR se altera durante el envejecimiento, y que la subunidad predominante del GlyR en el nAc es la subunidad $\alpha 2$. En términos de expresión relativa, se evidenció una disminución en la expresión del ARNm de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Glr2 y Glr3), esto sumado a la drástica disminución en la expresión proteica de la subunidad β del GlyR evaluada por *western blot*.

En estudios no publicados de electrofisiología de nuestro laboratorio en neuronas del nAc, se observó una progresiva disminución en la presencia de eventos sinápticos de glicina, esto acompañado de receptores de glicina con una menor sensibilidad a glicina y a etanol a medida que los ratones envejecen. En cuanto al número de neuronas que responden a glicina, esto también disminuye progresivamente. Adicionalmente, la densidad de corriente de glicina en las neuronas del nAc también es significativamente menor a los 12 meses cuando se compara a los 2 meses de edad en ratones WT. Estos datos concuerdan con la disminución en la expresión génica de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ la disminución en la expresión de la subunidad β del receptor en el nAc observados en ensayos de qPCR y *western blot* respectivamente.

Actividad 2: Estudiar la localización subcelular del receptor en las neuronas del nAc en las distintas etapas del ciclo vital.

Dado que las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 3$ del GlyR contienen una señal de localización nuclear (Melzer et al., 2010) y que se ha reportado que en un contexto patológico

como el glioblastoma estas subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 3$ pueden ejercer funciones a nivel intracelular (Forstera et al., 2014), nosotros quisimos estudiar si en el contexto del envejecimiento, el GlyR podría modificar su localización subcelular y/o función dentro la célula.

Para estudiar la localización subcelular del GlyR en las MSNs accumbales, primero evaluamos distintos marcadores de estructuras celulares en cultivos de neuronas hipocampales 14 DIV de ratón (Fig. 5). Como marcador neuronal se utilizó MAP-2 (A, magenta). Para marcar la membrana celular se utilizó un anticuerpo anti-G β (B, verde), el cual reconoce al dímero G β que forma parte de las proteínas G heterotriméricas. Para el marcar el núcleo celular, se usó anti-Lamina B1, una proteína que conforma la lámina nuclear (C, cian). Finalmente, se hizo uso del anticuerpo anti-gefirina (D), una proteína de anclaje a la sinapsis para el GlyR y GABA-A(R), la cual se usa como marcador de pre-sinapsis.

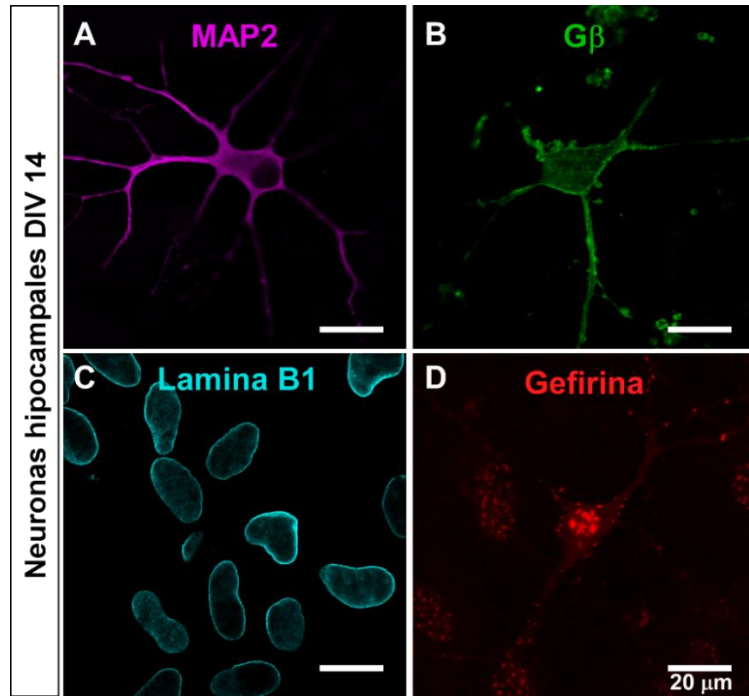


Figura 5. Estandarización de marcadores para inmunocitoquímica en neuronas hipocampales en cultivo. Neuronas de ratón 14 DIV inmunomarcadas con MAP-2 (A, magenta) como marcador neuronal, anti-G β (B, verde) para marcar membrana celular, anti-Lamina B1 (C, cian) para marcar membrana nuclear y gefirina (D, rojo) para marcar sinapsis. Escala: 20 μ m.

Una vez validado el uso de los marcadores de membrana, núcleo y postsinapsis, nos enfocamos en la estandarización en inmunocitoquímica de los anticuerpos de principal interés: el anticuerpo anti-pan- α -GlyR y anti-GlyR β . Se inmunomarcaron neuronas hipocampales 14 DIV con anti-pan- α -GlyR (Fig. 6 A, cian), con el anticuerpo anti-GlyR β (B, verde) y con MAP-2 como marcador neuronal (C, magenta). La señal asociada a los receptores no mostró el patrón

esperado, es decir, patrón punteado y membranoso. Cuando se marcaron neuronas con anti-gefirina (F), se evidenció un marcaje de tipo puntiforme en la membrana, esperable para proteínas sinápticas. Es importante destacar que, además, se pudo observar marcaje asociado a gefirina de menor intensidad, pero evidente en el núcleo de la célula.

En cuanto a la amplia distribución del GlyR citoplasmático podía estar sujeta al estadio temprano de las neuronas utilizadas en la inmunocitoquímica o posiblemente por bajo número de contactos sinápticos en los cultivos, por lo cual se continuó con la obtención de neuronas disociadas del nAc.

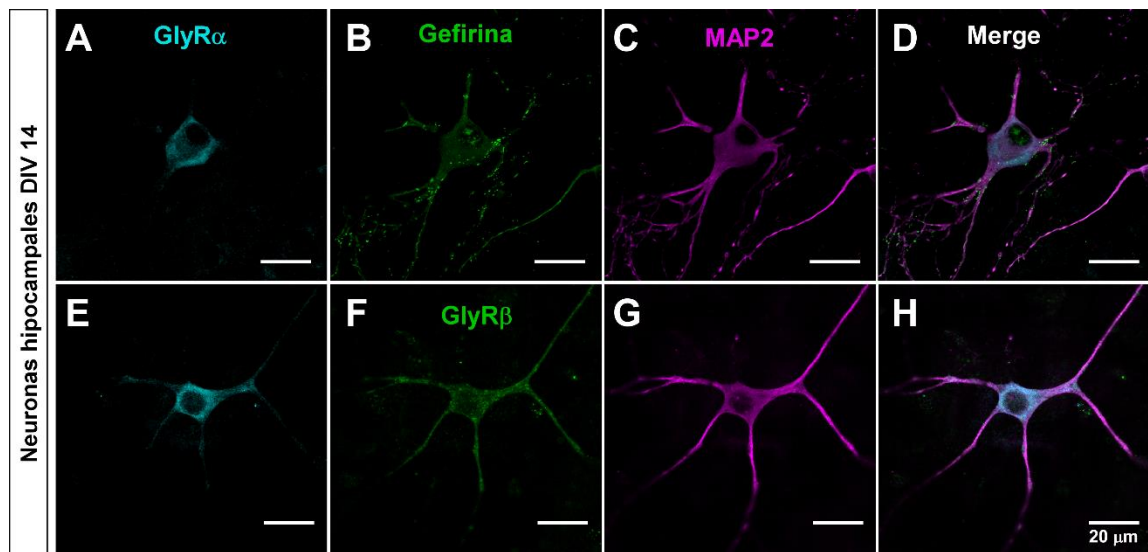


Figura 6. Análisis inmunocitoquímico del GlyR en neuronas hipocámpales en cultivo. Neuronas de ratón 14 DIV inmunomarcadas con anti-pan- α -GlyR (cian) (A y E), anti-

GlyR β (verde) (B) y MAP-2 (magenta) (C y G) como marcador neuronal. D y H. superposición de los tres canales. Escala: 20 μm .

A continuación, se procedió a la obtención de neuronas MSNs disociadas de ratones de 2 meses. Se obtuvieron neuronas disociadas a partir de disociación enzimática usando la enzima Pronasa E (ver materiales y métodos). Una vez sembradas las neuronas en placas, estas se sometieron a inmunocitoquímica con los marcadores previamente evaluados. Se etiquetaron neuronas MSNs con el anticuerpo con anti-pan- α -GlyR (verde), anti-gefirina (rojo) (B) y MAP-2 (gris) (Figura 7). Se muestran dos paneles en donde cada uno muestra una célula diferente, para denotar las diferencias en el patrón de distribución del marcador postsináptico gefirina (rojo). En el panel superior parece estar internalizado en estructuras citoplasmáticas, mientras que, en el panel inferior, se observa una especie de '*cluster*' asociado a la periferia celular/membrana. En cuanto a la marca asociada a las subunidades α del GlyR (verde), al igual que en neuronas hipocámpales, pareciera distribuirse ampliamente en la neurona, con énfasis en la periferia. No se pudo evidenciar un marcaje con mayor definición celular, sin embargo, estas neuronas muestran corrientes de Cl^- asociadas a GlyR indicando que estos se encuentran en la membrana celular (Fernandez-Perez et al., 2020).

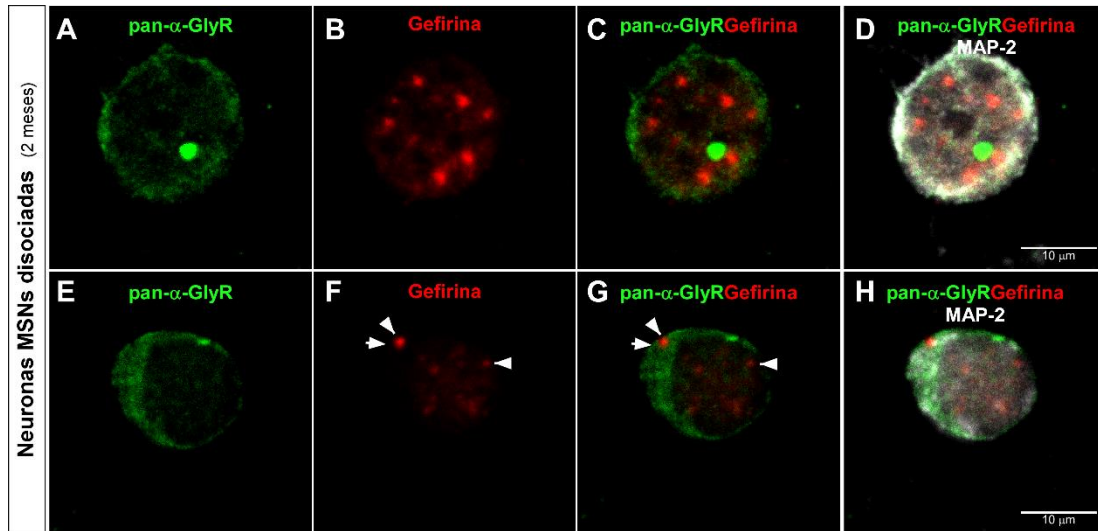


Figura 7. Análisis inmunocitoquímico de GlyR α en neuronas MSNs disociadas.

Neuronas MSNs accumbales de ratón de 2 meses inmunomarcadas con anti-pan- α -GlyR (verde), anti-gefirina (rojo) y MAP-2 (blanco) como marcador neuronal. Flechas para denotar *clusters*. Paneles finales muestran la superposición de los tres canales. Escala: 10 μ m.

A continuación, decidimos enfocarnos en evaluar la distribución subcelular del GlyR en rebanadas cerebrales, las cuales, si bien son más gruesas, conservan intactas las conexiones sinápticas y la distribución fisiológica de los receptores en la membrana. Para estudiar la distribución celular del GlyR en tejido, evaluamos distintos marcadores de organelos celulares para posteriormente colocalizarlos con la señal del receptor y estudiar su localización subcelular. Se usaron secciones coronales de 20 μ m que contienen nAc de animales de 6 meses y se utilizó anticuerpo anti-pan- α -GlyR (rojo) y anti-Lamina B1 (amarillo) (Figura 8 A-C), o marcadores de la vía secretora para determinar si el GlyR estaba siendo

endocitado o arrestado en algún paso de la vía secretora. En ese sentido se usó el anticuerpo anti-LAMP1, la proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (verde) (D-F), el anticuerpo anti-EEA1, Antígeno 1 de endosoma temprano (verde) (G-I) o el anticuerpo anti-BiP (verde) (J-L), una proteína chaperona HSP70 presente en el retículo endoplásmico (RE). De estos estudios inmunohistoquímicos, se pudo evidenciar que el GlyR no muestra reactividad asociada al núcleo, similar a datos en animales de 12 o 18 meses (datos no mostrados). Cuando se analizaron las marcas asociadas a los marcadores de lisosoma, endosoma temprano o el marcador de RE, no se pudo correlacionar el marcaje con la marca o señal característica de estas proteínas altamente descritas. Se requieren de anticuerpos específicos que permitan marcar o identificar organelos como el RE, endosomas para poder colocalizar con el GlyR. Paralelamente, el uso del anticuerpo anti-pan- α -GlyR (rojo) para estudios de localización subcelular por inmunohistoquímica no reunió las características necesarias para un análisis de mayor resolución espacial. Dada la complejidad estructural que implica trabajar con tejido, la presencia de tejido conectivo, lípidos, proteínas extracelulares y la existencia de múltiples capas celulares presentes en el tejido, se hizo complejo el análisis de colocalización de proteínas por lo que se continuó con el fraccionamiento celular que se describe a continuación.

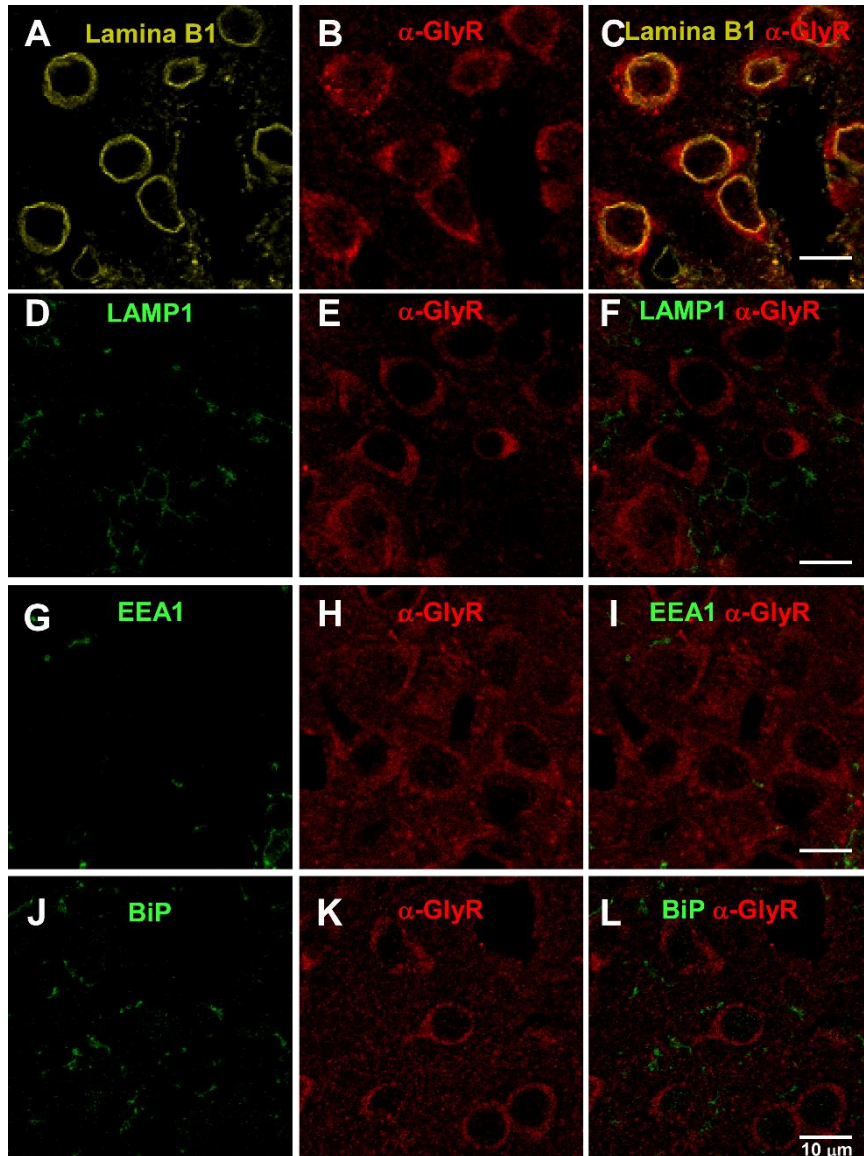


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de marcadores de organelos en el nAc.

A-L. Secciones coronales de ratones de 6 meses inmunoteñidas con anti-pan- α -GlyR (rojo), En verde: Lamina B1 (A, C) para membrana nuclear, LAMP1 (D, F) para lisosomas, EEA1 para endosomas (G, I) y BiP (J, L) para retículo endoplásmico. Escala: 10 μ m.

Alternativamente, decidimos hacer uso de la técnica de *western blot* y el fraccionamiento celular para estudiar la distribución subcelular del GlyR. De esta manera, se extrajo proteína del nAc de ratones de 6, 12 y 18 meses, la cual fue inmediatamente transferida a una matriz en la cual se sometieron a una serie de centrifugaciones y extracciones por solventes mediante el uso de un Kit comercial. De esta manera, se obtuvieron extractos citoplasmáticos, membranosos y nucleares. A continuación, estos extractos se utilizaron para hacer *western blot*. Las membranas resultantes del SDS-PAGE y posterior transferencia, se incubaron con anticuerpos anti-pan- α -GlyR, anti-Lamina B1 como control de la fracción nuclear, anti-Na K-ATPasa como control de la fracción membranosa y anti-G β como control de carga total (Figura 9). En este caso, el control del fraccionamiento celular para la fracción nuclear, lamina B1, resultó estar presente en las fracciones de membrana, además de las fracciones nucleares, sugiriendo que la separación de las fracciones no se realizó completamente. En el caso del control de fraccionamiento celular para membranas plasmáticas, la bomba NaK-ATPasa, se observó en las tres fracciones evaluadas, indicando que la pureza de las fracciones es de muy baja fidelidad. La NaK-ATPasa se expresa sólo en membrana citoplasmática por lo que no debería verse una banda en fracciones citoplasmáticas ni nucleares. En este sentido, el kit indica que cuando se usan masas tan pequeñas de tejido (<50 mg), es altamente probable que la eficiencia de la separación disminuya considerablemente.

Esta actividad en particular, que pretendía dilucidar la localización subcelular del receptor de glicina durante el envejecimiento, no pudo abordar robustamente la pregunta de estudio debido a las limitaciones técnicas encontradas durante la experimentación.

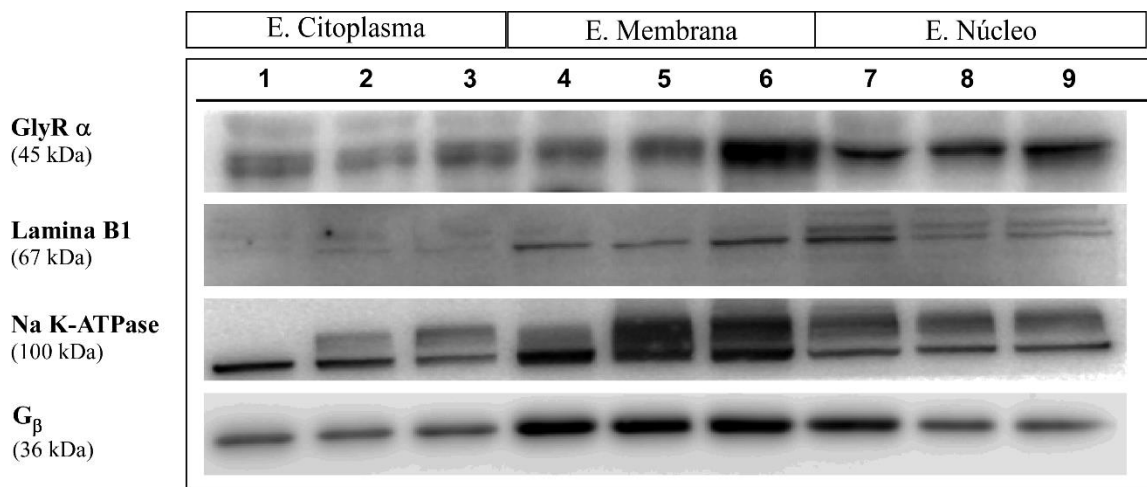


Figura 9. Análisis de la expresión de pan- α -GlyR en extractos citoplasmáticos, membranosos y nucleares de neuronas accumbales. Extractos proteicos obtenidos por fraccionamiento mediante el uso de kit comercial en neuronas accumbales de ratones de 6 meses. Extracto citoplasmático (carril 1-3), extracto de membrana (carril 4-6) y núcleo (carril 7-9). Como control del fraccionamiento se evaluó la expresión de lámina B1 para fracciones nucleares, la bomba NaK-ATPasa para fracciones membranosas y para fracciones citoplasmáticas.

Objetivo específico 2: Caracterizar la presencia y funcionalidad de la(s) aferencias glicinérgicas que llegan hasta el nAc (inervación) de ratones adultos y envejecidos.

Actividad 2.1: Realizar inyecciones estereotáxicas de trazadores retrógrados en el nAc de ratones GlyT2::Cre para estudiar el origen de la innervación glicinérgica.

Para investigar el origen de la innervación glicinérgica que llega al nAc, primero, utilizamos una estrategia de rastreo monosináptico retrógrado. Para ello, inyectamos en el nAc de ratones C57BL/6J *wild type* mediante estereotaxia, la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B) asociada al fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde), un marcador retrógrado que se une a los terminales neuronales y mediante transporte retrógrado se localiza en el soma de las neuronas (Figura 10). Una semana después de la inyección, se extrajo el cerebro y se realizó el procesamiento histológico para la obtención de rebanadas sagitales de 35 µm de grosor. Las secciones se incubaron con el marcador nuclear DAPI (azul) y se montaron en cubreobjetos para posterior análisis por microscopía confocal. La adquisición de imágenes por microscopía confocal nos permitió evidenciar señal asociada al marcador retrógrado CT-B (en verde) en diversas regiones cerebrales denotadas en rectángulos (Fig. 10 A). Se muestra el sitio de inyección: nAc (B). En esta rebanada sagital, observamos señal retrograda de una de las

áreas canónicas que inervan al nAc, el área tegmental ventral (VTA, C). De manera interesante, evidenciamos señal asociada a CT-B en una región restringida del mesencéfalo (D), la cual se muestra en una imagen ampliada (E) donde se denota la distribución celular del marcaje asociado a CT-B.

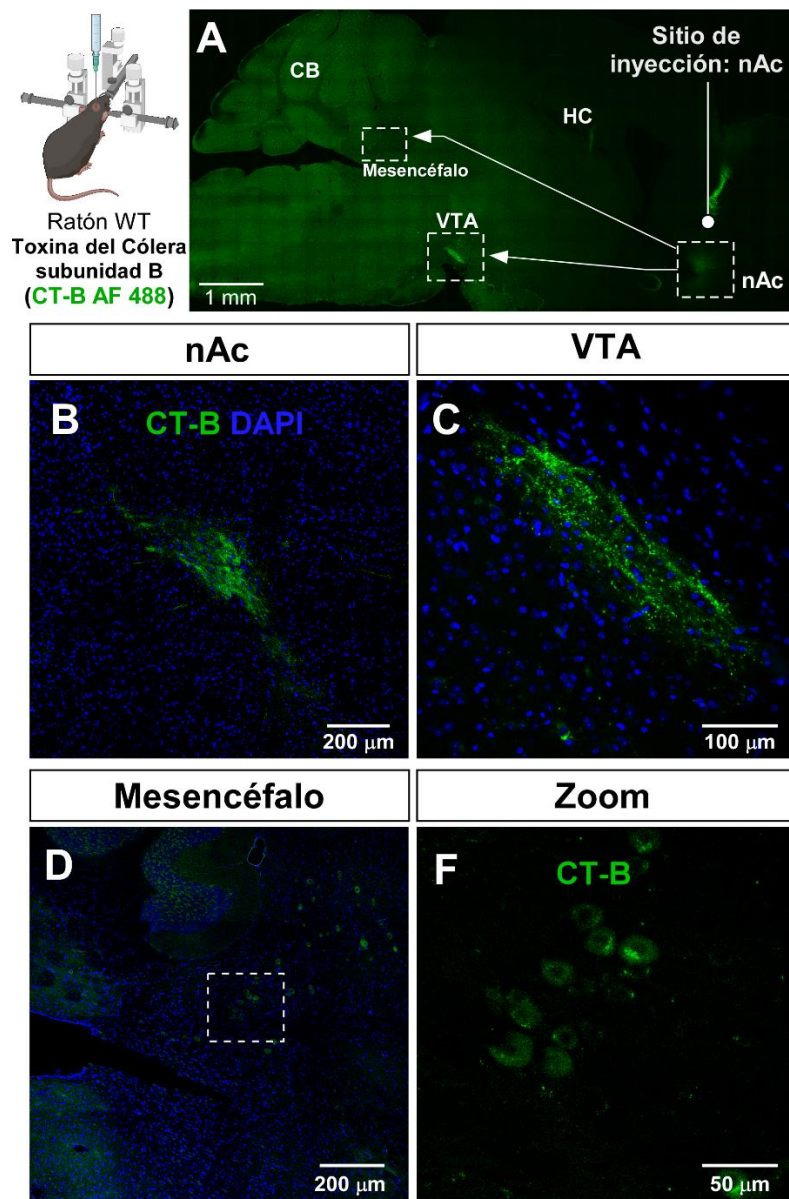


Figura 10. Marcaje retrógrado de regiones cerebrales que inervan al nAc. Se inyectó unilateralmente la subunidad B de la toxina del cólera, un marcador retrógrado (CT-B asociado al fluoróforo Alexa flúor 488), en el nAc de animales *Wild type*. A. Vista global que indica mediante un rectángulo las regiones en la que se evidenció el sitio de inyección, el nAc (B) y marcaje retrógrado: el área tegmental ventral (C) y el mesencéfalo (D). Se denotan el cerebelo (CB) y el hipocampo (HC) para efectos de orientación. Las secciones sagitales fueron marcadas con DAPI (azul) como marcador nuclear. E. Fotografía ampliada de la región del MB marcada retrógradamente con CT-B (verde).

A continuación, utilizamos el sistema Cre-Lox específico para determinar si las células marcadas retrógradamente en el mesencéfalo pertenecían a neuronas glicinérgicas. Inyectamos el virus adenoasociado retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP dependiente de la recombinasa Cre en el nAc de ratones GlyT2::Cre adultos de 6 meses. De esta forma, la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) codificada en el AAV, se expresa exclusivamente en neuronas glicinérgicas que expresan la recombinasa Cre (Fig. 11 A). Seis semanas después de la inyección, encontramos neuronas EGFP+ en el mesencéfalo y en las áreas olfatorias en cortes sagitales (lateral 0.36 mm) (B). En el mesencéfalo, evidenciamos un grupo de neuronas EGFP+ de patrón conservado que se observa comúnmente en los núcleos neuronales (C), mientras que en las áreas olfatorias se observaron neuronas en una disposición bastante aleatoria y patrón reticular (D). Se muestra el sitio de inyección en donde se puede evidenciar sagitalmente el nAc y sobre el algunos somas y axones ascendentes (E).

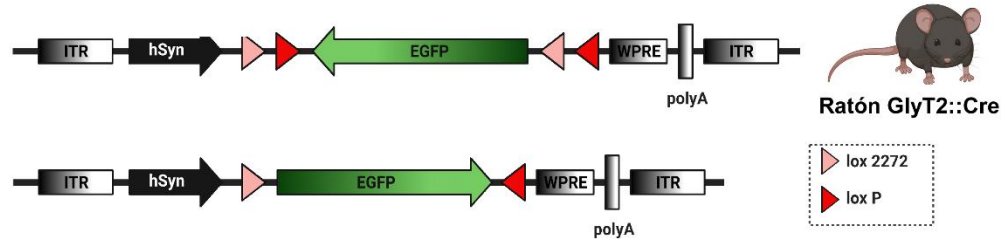
Además, inmunomarcamos secciones sagitales con un anticuerpo que reconoce la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) (rojo) para corroborar la naturaleza neuronal de las células etiquetadas con el reportero EGFP (F-G). Para demostrar la especificidad del etiquetado, utilizamos un anticuerpo anti-Recombinasa Cre (H-I) y confirmamos que las neuronas positivas para EGFP expresan la recombinasa Cre (magenta), lo que indica que la expresión viral era específica para las neuronas GlyT2::Cre.

Para demostrar la presencia de GlyT2 en el mesencéfalo, inmunodetectamos este transportador en lisados de proteínas del mesencéfalo de animales GlyT2::Cre (J). Como control positivo se usó tejido de cerebelo y como control de carga se inmunodetectó el dímero Gbeta.

En este trabajo, nos centramos en la innervación glicinérgica del mesencéfalo debido a su patrón ordenado. Para la caracterización de la innervación proveniente del mesencéfalo, determinamos la distancia entre el sitio de inyección del AAV retrógrado y el sitio en donde se evidencian los somas EGFP+ como se esquematiza en la Figura 11, A y Tabla 4. Se realizaron mediciones en secciones sagitales de 4 animales inyectados; de los cuales se obtuvo una distancia promedio de 4.075 ± 0.32 mm entre el sitio de inyección y el mesencéfalo. También medimos el radio de la innervación del mesencéfalo para estimar el tamaño del núcleo neuronal EGFP+ del mesencéfalo. La región exhibió un radio

promedio de 116.7 μm , sugiriendo un diámetro cercano a los 200 μm contenidos dentro del cerebro medio y un área promedio de 42.78 mm^2 .

A AAV-hSyn-DIO-EGFP rg



B AAV-hSyn-DIO-EGFP rg

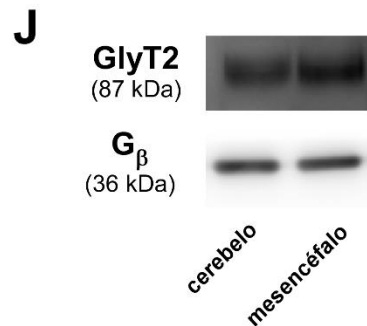
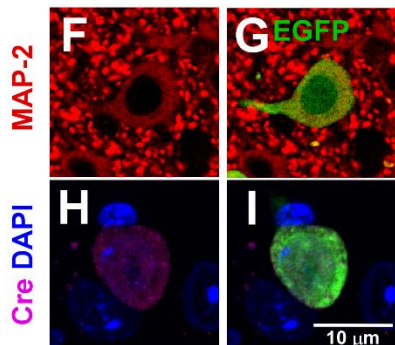
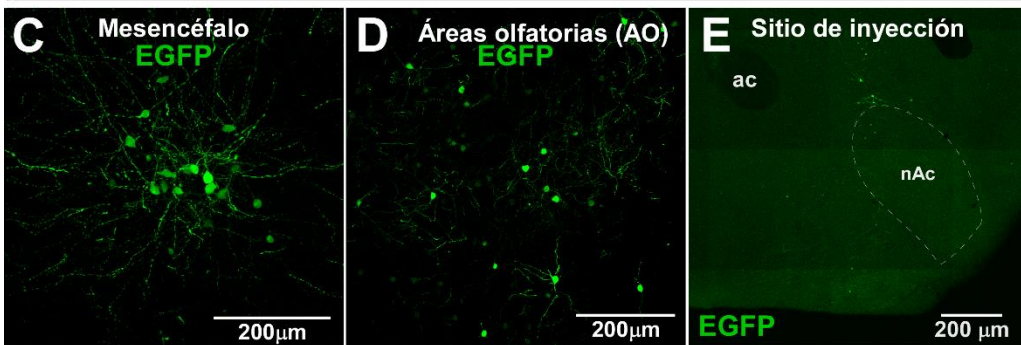
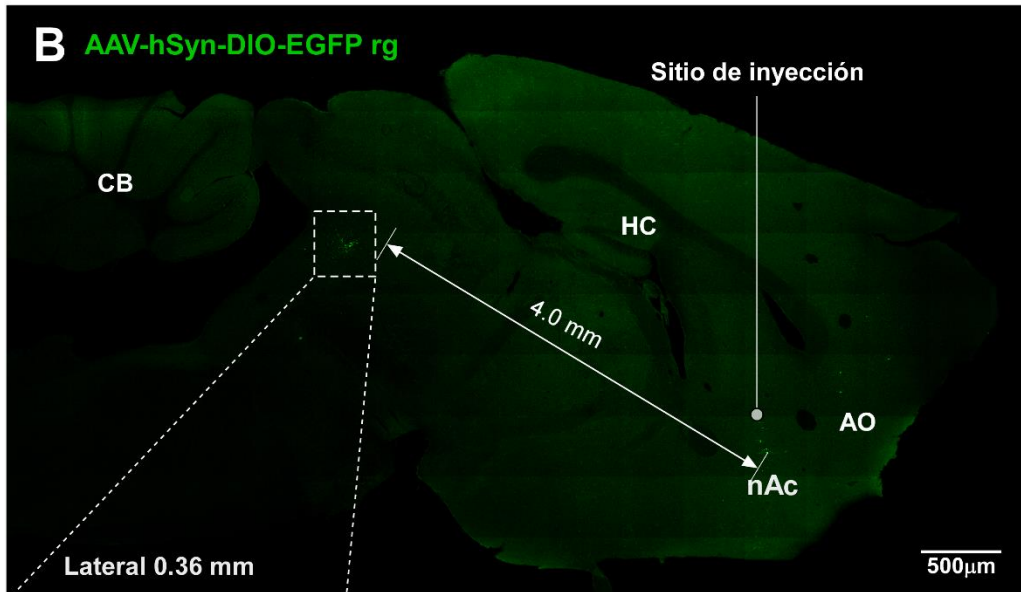


Figura 11. Marcaje retrógrado de redes neuronales glicinérgicas que contactan al nAc. A. Esquema del constructo del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP inyectado en el nAc de ratones GlyT2::Cre adultos de 6 meses. B. Vista global que muestra el sitio de inyección y sitio en el mesencéfalo en secciones sagitales donde se evidenció marcaje retrógrado asociado a la proteína verde fluorescente (EGFP). Se denota el cerebelo (CB) y el hipocampo (HC) para efectos de orientación. C. Fotografía ampliada de la región del mesencéfalo en B. D. Áreas olfatorias. E. Sitio de inyección. F-I. Neuronas EGFP positivas (verde) que muestran inmunoreactividad para MAP2 (rojo), la recombinasa Cre (magenta) y DAPI (marcador neuronal), validando la expresión del virus en neuronas glicinérgicas. J. Inmunodetección por *western blot* del transportador de glicina de tipo 2 en el mesencéfalo. Se usó G β como control de carga.

Tabla 4. Valores de distancia desde el sitio de inyección al sitio de proyección en milímetros y el radio de la inervación en micrómetros por cada animal analizado. SEM: Error estándar (*standard error of the mean*).

	Animal #1	Animal #2	Animal #3	Animal #4	Promedio \pm SEM
Distancia desde el sitio de proyección (mm) NAc MB	3.74	3.86	4.32	4.38	4.075 \pm 0.1611
Radio (μm)	107.32	110.74	115.43	133.32	116.70 \pm 5.783

A continuación, cuantificamos el número de neuronas positivas para EGFP en una sección de 35 micrómetros de un área promedio de 42.78 mm² que contenía mesencéfalo, por cada animal n=9 (Tabla 5). Se contaron en promedio 18 \pm 1.09 neuronas EGFP+ para cada sección de 35 μ m. Esto se traduciría en que el

volumen en el cual están contenidas estas neuronas glicinérgicas es de 4.7 mm^3 de esta región del mesencéfalo podemos encontrar aproximadamente 3.827 neuronas glicinérgicas que se proyectan al nAc. En este sentido, la data sugiere que la inervación es discreta, pero conservada en esta área del mesencéfalo.

Tabla 5. Cuantificación del número de neuronas contabilizadas en una rebanada cerebral que contiene mesencéfalo de $35 \mu\text{m}$ por cada animal analizado.

	Número de neuronas EGFP ⁺ por rebanada de $35 \mu\text{m}$
Animal #1	18
Animal #2	14
Animal #3	18
Animal #4	23
Animal #5	21
Animal #6	17
Animal #7	13
Animal #8	21
Animal #9	19
Promedio \pm SEM	18.22 ± 1.090

Con el objetivo de validar la naturaleza glicinérgica de las neuronas EGFP⁺ observadas en el mesencéfalo y además evaluar la especificidad del sistema

Cre-lox en animales GlyT2::Cre, hicimos tinciones de secciones sagitales que contienen mesencéfalo de animales inyectados con el virus retrógrado (AAV-hSyn-DIO-EGFP), usando un anticuerpo que reconoce glicina (Figura 12). Primero se muestra una vista global del inmunomarcaje con el anticuerpo anti-glicina (rojo) y el anticuerpo anti-EGFP (verde) que reconoce la proteína reportera del virus retrógrado (A). Se denotó el cerebelo (CB) donde se evidenció señal positiva para glicina, lo cual se usó como un control positivo de la marca asociada a glicina. En los paneles inferiores se pueden observar imágenes ampliadas correspondientes a la región del mesencéfalo que exhibe neuronas EGFP, las cuales también muestran inmunoreactividad para el anticuerpo anti-glicina (B-D). A continuación, se muestra una imagen ampliada de un soma neuronal para indicar la presencia de estructuras granulares con inmunoreactividad positiva para glicina (E-E’). El análisis de colocalización arrojó parámetros Manders M1 y M2 de 0,986 y 1, respectivamente y un coeficiente de Pearson $r = 0.73$, lo cual implicó que un 0.986 de la señal asociada a glicina colocalizó con la señal asociada a EGFP y que esta última un 1.0 (es decir el 100%) de la señal asociada a EGFP colocalizó con la marca de glicina, sugiriendo un alto grado de colocalización entre la señal asociada con EGFP y glicina, reforzando la naturaleza glicinérgica de estas neuronas (F).

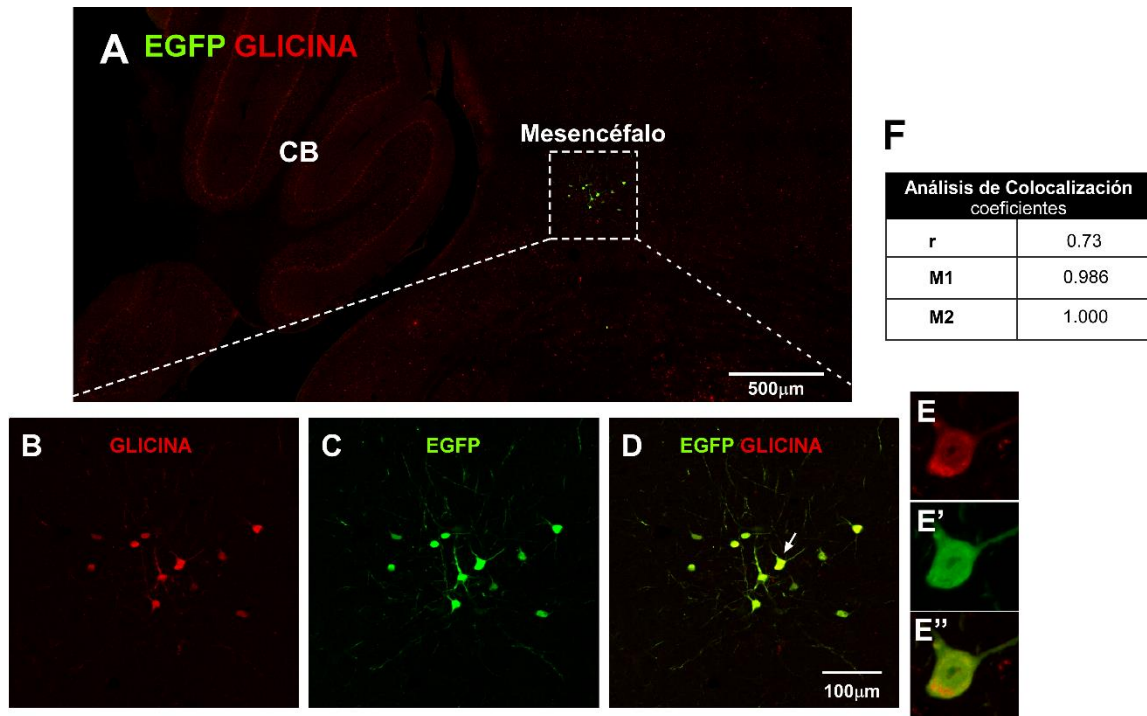


Figura 12. Evaluación de la naturaleza glicinérgica de las neuronas EGFP+ del MB. A. Vista global que indica el sitio en el mesencéfalo donde se evidenció marcaje retrógrado asociado al virus AAV-hSyn-DIO-EGFP (verde) en animales GlyT2::Cre. Las secciones fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti-glicina (rojo). CB: cerebelo. B-D. Fotografías ampliadas del mesencéfalo inmunomarcadas con el anticuerpo anti-glicina (B), EGFP (C) y la superposición de ambas marcas (D). E, E' y E''. Imágenes ampliadas denotando un cuerpo neuronal indicado con una flecha en D, EGFP+ (verde) para denotar el patrón de distribución de la marca asociada a glicina (rojo) validando la expresión del virus en neuronas glicinérgicas. F. Análisis de colocalización para EGFP y glicina. R: coeficiente de Pearson; M1 y M2: Coeficiente de Manders.

Debido a estudios previos que sugieren la liberación conjunta de glicina y GABA de las neuronas inhibitorias (Chaudhry et al., 1998; Nerlich et al., 2014; Ostapoff et al., 1997; Wojcik et al., 2006), queríamos determinar si las neuronas

glicinérgicas del mesencéfalo exhiben, además, un fenotipo GABAérgico. Dado que la enzima glutamato descarboxilasa 1 (GAD 1/67), que cataliza la síntesis de GABA, se reconoce como un marcador de neuronas GABAérgicas (Esclapez et al., 1994; Fong et al., 2005; Murphy et al., 1998), utilizamos un anticuerpo anti-GAD 1/67 en secciones sagitales que contienen el mesencéfalo de animales inyectados con el virus retrógrado para determinar si las neuronas EGFP mostraban un fenotipo GABAérgico (Figura 13). Se muestra una vista global de ambos marcadores (A). Se denotó el cerebelo (CB) donde se evidencio señal positiva para GAD1/67, lo cual se usó como un control positivo de la marca. A continuación, se muestran imágenes ampliadas de la región del mesencéfalo EGFP+ (B-D), donde las neuronas EGFP+ no mostraron reactividad para GAD 1/67 (rojo). Se muestran imágenes ampliadas de una neurona EGFP+ para denotar la ausencia de marca asociada a GAD1/67 (E-E"). A partir de los análisis de colocalización para GAD 1/67 y EGFP, obtuvimos valores de Manders de M1 y M2 de 0.026 y 0.014, respectivamente y un coeficiente de Pearson $r = 0.022$ (F), reflejando un bajo grado de colocalización entre la señal asociada con EGFP y glicina, lo que sugiere que las neuronas EGFP+ expresarían exclusivamente glicina como neurotransmisor inhibitor y no GABA.

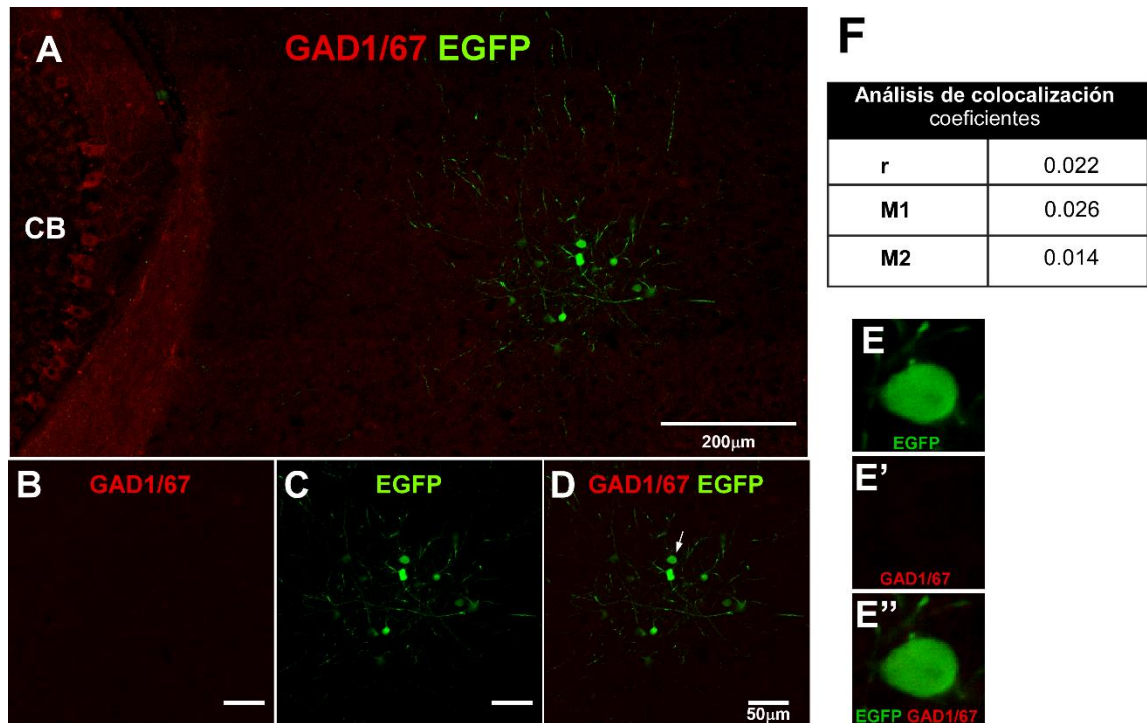


Figura 13. Evaluación de la naturaleza GABAérgica de las neuronas EGFP+ del MB. A. Vista global que indica el sitio en el mesencéfalo positivo para el marcaje retrógrado asociado al virus AAV-hSyn-DIO-EGFP (verde). Las secciones fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti-GAD1/67 (rojo). CB: cerebelo. B-D. Microfotografías ampliadas del MB inmunomarcadas con el anticuerpo anti-GAD1/67 (B), EGFP (C) y la superposición de ambas marcas (D). E, E' y E''. Imágenes ampliadas denotando un cuerpo neuronal indicado con una flecha en D, EGFP+ (verde) para denotar la ausencia de la marca asociada a GAD1/67 (rojo) validando la expresión del virus en neuronas glicinérgicas. F. Análisis de colocalización para EGFP y GAD1/67. R: coeficiente de Pearson; M1 y M2: Coeficiente de Manders.

Dado que el transportador de glicina de tipo 2 (GlyT2) se ha descrito en literatura como el marcador clásico de neuronas glicinérgicas, quisimos evaluar la presencia de este transportador de tipo neuronal en las neuronas EGFP+ de naturaleza glicinérgica (Figura 14). Se incubó el anticuerpo anti-GlyT2 (rojo) en rebanadas cerebrales de animales GlyT2::Cre inyectados con el AAV retrógrado (EGFP, verde). Cuando se evidenció la señal asociada a GlyT2, pudimos notar una señal de tipo axonal, posiblemente aferentes ascendentes que inervan esta región mesencefálica, y dispersa en la región del mesencéfalo (A). Cuando la señal asociada a GlyT2 se superpuso con la de EGFP, las marcas no parecían superponerse (C). Esto se replicó cuando se analizaron áreas que contenían fibras/axones EGFP+ (D). Para un análisis más fidedigno, sometimos estas imágenes a análisis de co-localización. Los resultados de la co-localización de las señales asociadas a GlyT2 y EGFP, arrojaron valores de Manders de $M1=0.095$ y $M2=0.025$ (E), reflejando un bajo grado de colocación entre la señal asociada con EGFP y el transportador neuronal, lo que podría deberse a que este transportador suele ser una proteína de naturaleza postsináptica, implicando que se expresa en terminales sinápticos, es decir donde ocurre la sinapsis (en este caso nAc), más que en el soma neuronal.

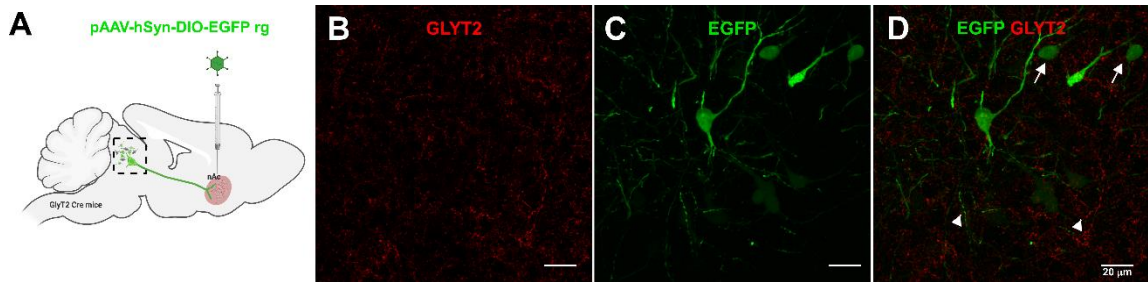


Figura 14. Evaluación de la expresión de GlyT2 en neuronas EGFP+ del MB. A. Esquema experimental de la inyección del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP en el nAc de animales GlyT2::Cre. B-D. Secciones sagitales que contienen MB que exhiben neuronas marcadas con el virus retrógrado (EGFP+, verde) fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti-GlyT2 (rojo).

A continuación, realizamos un estudio exploratorio para la determinación específica del área del mesencéfalo que inerva al nAc. Para ello, primero inyectamos la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B) asociada al fluoróforo Alexa Fluor 546 (rojo) en el nAc de ratones WT de 6 meses. Una semana después se extrajo el cerebro, se obtuvieron rebanadas coronales que contenían mesencéfalo (bregma -5.13 mm) y se incubaron con el anticuerpo anti-triptófano hidroxilasa 2 (TH-2, verde) (Figura 15 A), un marcador de neuronas serotoninérgicas, esto para tener una referencia espacial a la ubicación del núcleo dorsal del rafe, el mayor centro serotoninérgico del mesencéfalo, ubicado cerca del 4to ventrículo cerebral. Del marcaje con CT-B (B), podemos observar un pequeño grupo de células con marca positiva, las cuales se ven con mayor claridad en los paneles inferiores (C-E). Como era de esperar, estas células no

eran positivas para TH-2. Cuando se evidenció el marcaje con TH-2 (F), pudimos observar un grupo de neuronas positivas para TH-2 ubicadas en el núcleo dorsal del rafe (DR). De este experimento y del posterior análisis usando el atlas de coordenadas de ratón ‘*The Allen Mouse Brain Atlas*’, determinamos que la región en donde se ve marcaje asociado a CT-B correspondía a la sustancia gris periacueductal lateral (IPAG, del inglés: *lateral Periacueductal gray*).

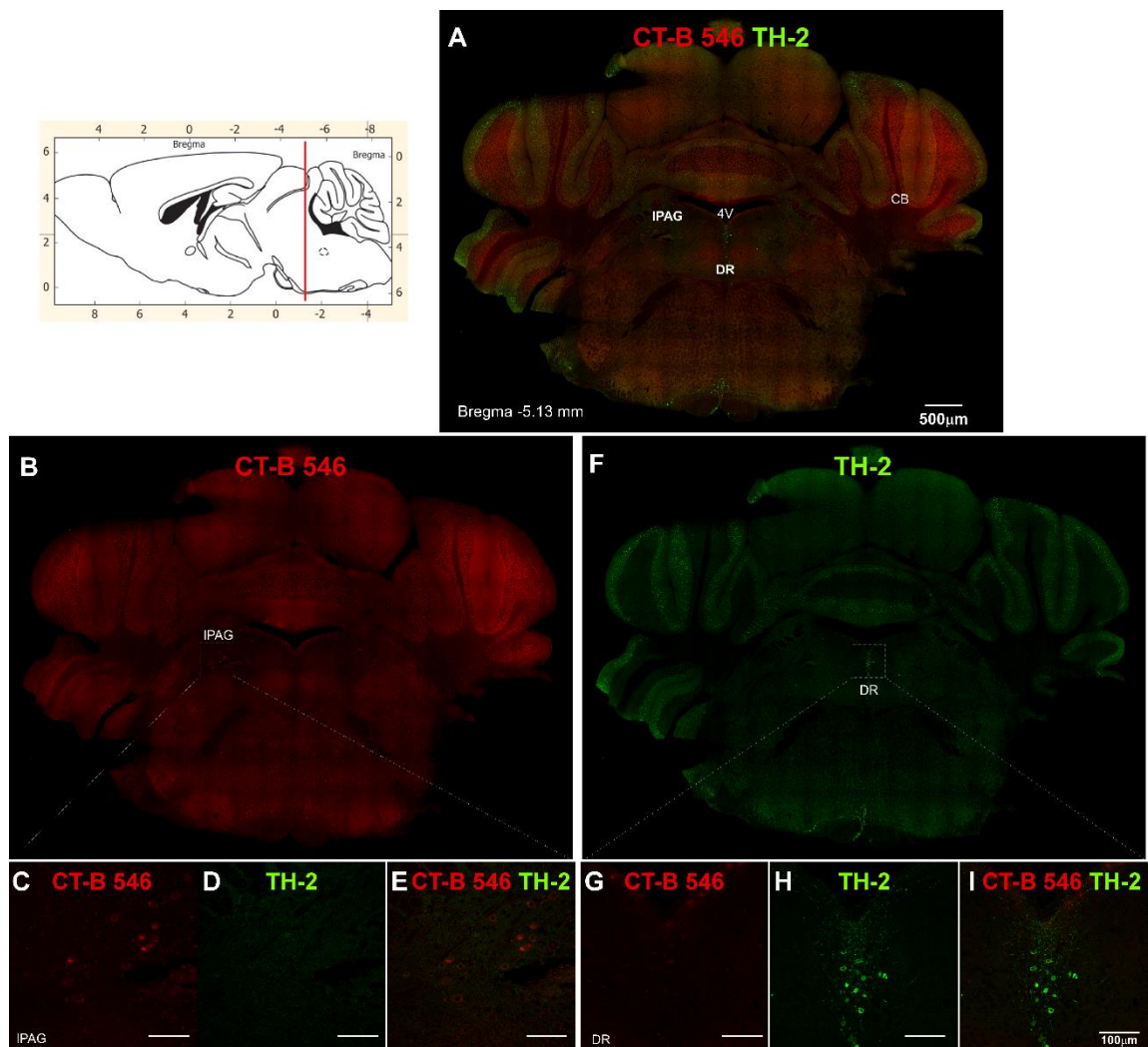


Figura 15. Estudio exploratorio para la determinación del área del mesencéfalo que inerva al nAc. A. Marcaje retrógrado de neuronas del área gris periacueductal lateral (IPAG) después de la inyección unilateral de la subunidad B de la toxina del cólera, asociada al fluoróforo Alexa Fluor-543 (CT-B 543, rojo) en el nAc de ratones WT. Las rebanadas fueron inmunomarcadas con el anticuerpo que reconoce la enzima triptófano hidroxilasa 2 (TH-2, verde). Referencia del atlas Allen del cerebro del ratón. CB: cerebelo. B. marcaje con CT-B 546. C. marcaje con TH-2. C-E. Fotografía ampliada de la región IPAG en B. G-I. Fotografía ampliada de la región RD en F.

Para un enfoque más específico, se inyectaron ratones GlyT2::Cre con el virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP (verde), y posteriormente se incubaron secciones sagitales con el mismo anticuerpo anti-triptófano hidroxilasa 2 (TH-2, rojo) para orientarnos respecto al núcleo dorsal del rafe DR (Figura 16). Las neuronas glicinérgicas fueron detectadas en una región adyacente al DR, cercanas al 4to ventrículo, en una región cerebral llamada IPAG según muestra el esquema del atlas *The Allen Mouse Brain Atlas* denotado con una flecha en rojo (E).

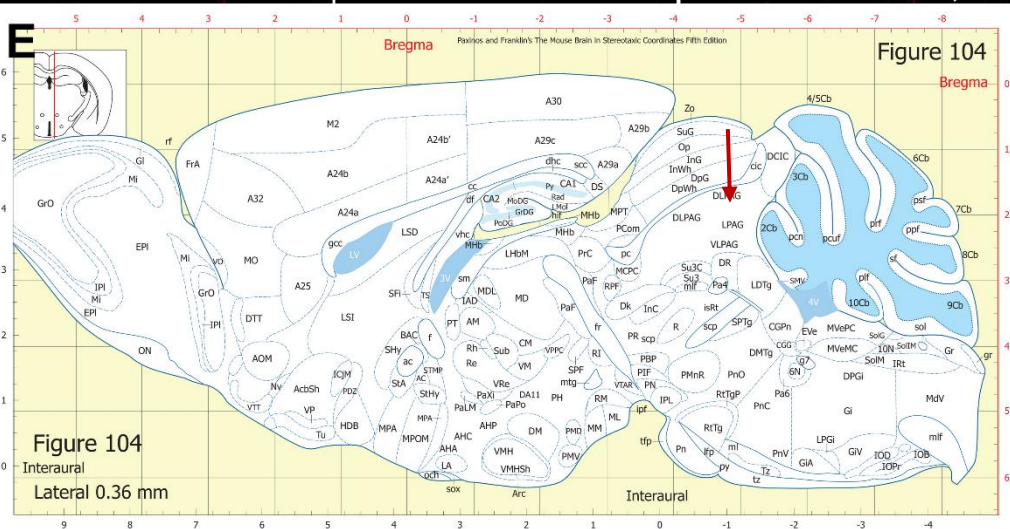
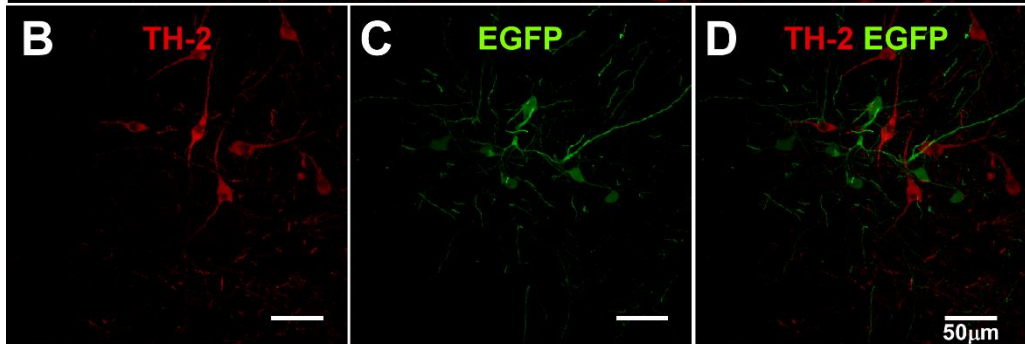
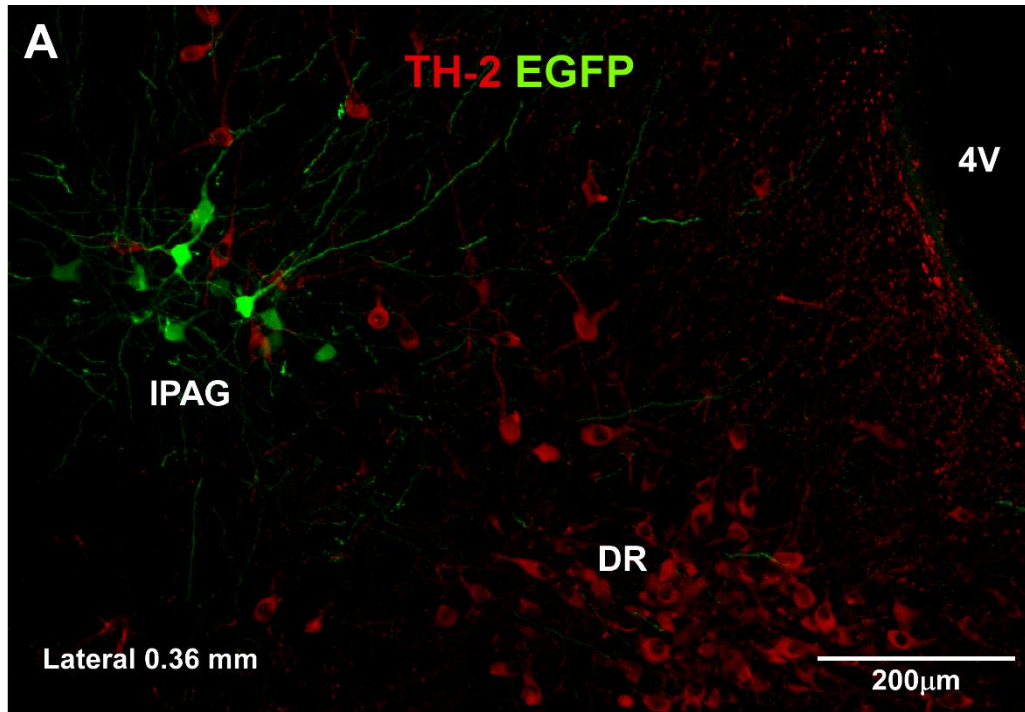


Figura 16. Análisis inmunohistoquímico de la región del mesencéfalo con un marcador para neuronas serotoninérgicas. A. Secciones sagitales de ratones GlyT2::Cre inyectados con el virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP (verde), inmunomarcadas con anti-Triptófano hidroxilasa 2 (rojo). B, B'. Fotografía ampliada de la región del mesencéfalo en A. B. Fotografía ampliada de la región del mesencéfalo en A. C. Imagen ampliada que muestra el núcleo del rafe dorsal (DR) como referencia del área donde se visualizan las neuronas EGFP+. E. Fotografía del atlas *The Allen Mouse Brain Atlas*.

Para corroborar la naturaleza glicinérgica de las neuronas detectadas en la IPAG, hicimos uso de otra cepa transgénica, los animales GlyT2::EGFP. Estos ratones transgénicos expresan endógenamente la proteína fluorescente verde mejorada bajo el promotor del transportador GlyT2, exclusivamente neuronal (Zeilhofer et al., 2005). De esta manera, este animal nos permite identificar las neuronas glicinérgicas en el cerebro sin uso adicional de virus o cruza. Teniendo este recurso, decidimos analizar secciones sagitales y coronales que contenían mesencéfalo y las inmunomarcamos con anticuerpo anti-EGFP (Figura 17). Primero evidenciamos de manera macro la expresión de EGFP para tener una visión general del marcaje en el cerebro (A). Evidenciamos inmunoreactividad en regiones caudales, cerebelo y el mesencéfalo, lo cual se condice con la literatura (Zeilhofer et al., 2005). Para un análisis más detallado, se realizó una magnificación del área del mesencéfalo que contiene la IPAG (B y C), en la cual podemos ver que efectivamente existe un acotado núcleo de neuronas glicinérgicas/EGFP+ las cuales están distribuidas en la misma ubicación donde

se evidenció marcaje con el virus retrogrado en animales GlyT2::Cre, demostrando por una tercera aproximación experimental, la presencia de este núcleo neuronal de naturaleza glicinérgica en el mesencéfalo.

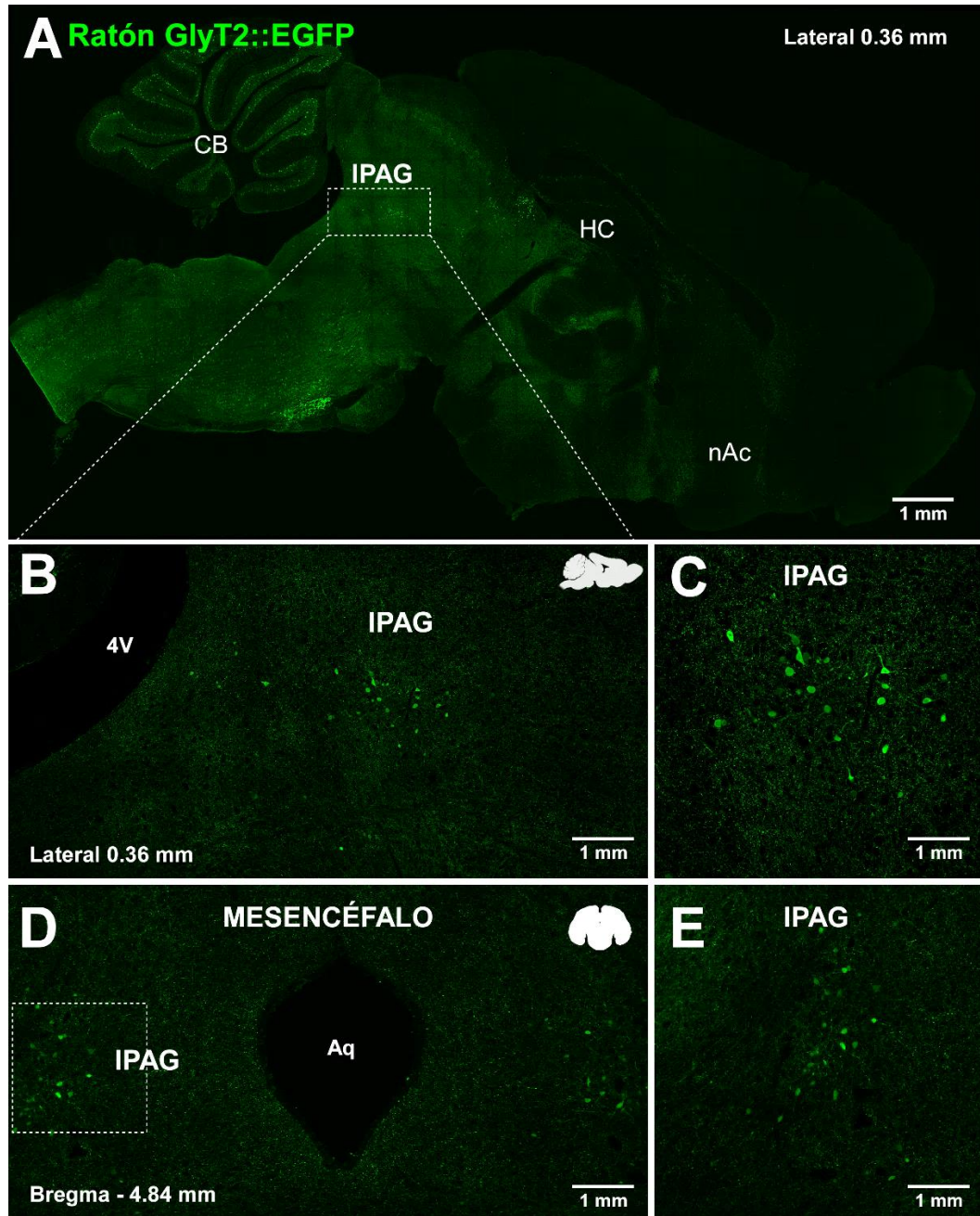


Figura 17. Análisis inmunohistoquímico del animal GlyT2::EGFP en el mesencéfalo. Rebanadas de cerebro del animal transgénico GlyT2::EGFP el cual expresa endógenamente la proteína fluorescente EGFP exclusivamente en neuronas glicinérgicas. Las secciones fueron inmunomarcadas con anti-GFP (verde). Se denotaron áreas como el cerebelo (CB), el hipocampo (H) y el nAc para efectos de orientación. A-C. Secciones sagitales que

contienen mesencéfalo. En B y C se muestran magnificaciones de la microfotografía en A para denotar la presencia de neuronas EGFP+ en la IPAG vista sagitalmente. D-E. Secciones coronales del mismo animal que contiene IPAG denotando un grupo de neuronas EGFP vistas de manera frontal. Aq: Acueducto cerebral. Barra de escala= 1 mm.

También quisimos explorar el nAc de los animales GlyT2::EGFP para determinar si existen somas y/o fibras EGFP+ glicinérgicas en esta área del cerebro (Figura 18). En rebanadas coronales estriatales marcadas con anticuerpo anti-EGFP, pudimos evidenciar somas EGFP+ en el núcleo septal lateral intermedio (LSI), pero no en el nAc. (A). Al visualizar la región del nAc en más detalle (B-E), es posible ver fibras EGFP+ principalmente en el *core* accumbal y preferentemente en la periferia de la comisura anterior hacia ventral. Según las secciones analizadas el nAc no exhibe somas EGFP+.

Nuestros resultados indican que el nAc alberga fibras glicinérgicas en su estructura y refuerzan la data que sugiere la llegada de inervación glicinérgica a este núcleo, usando otro modelo animal transgénico.

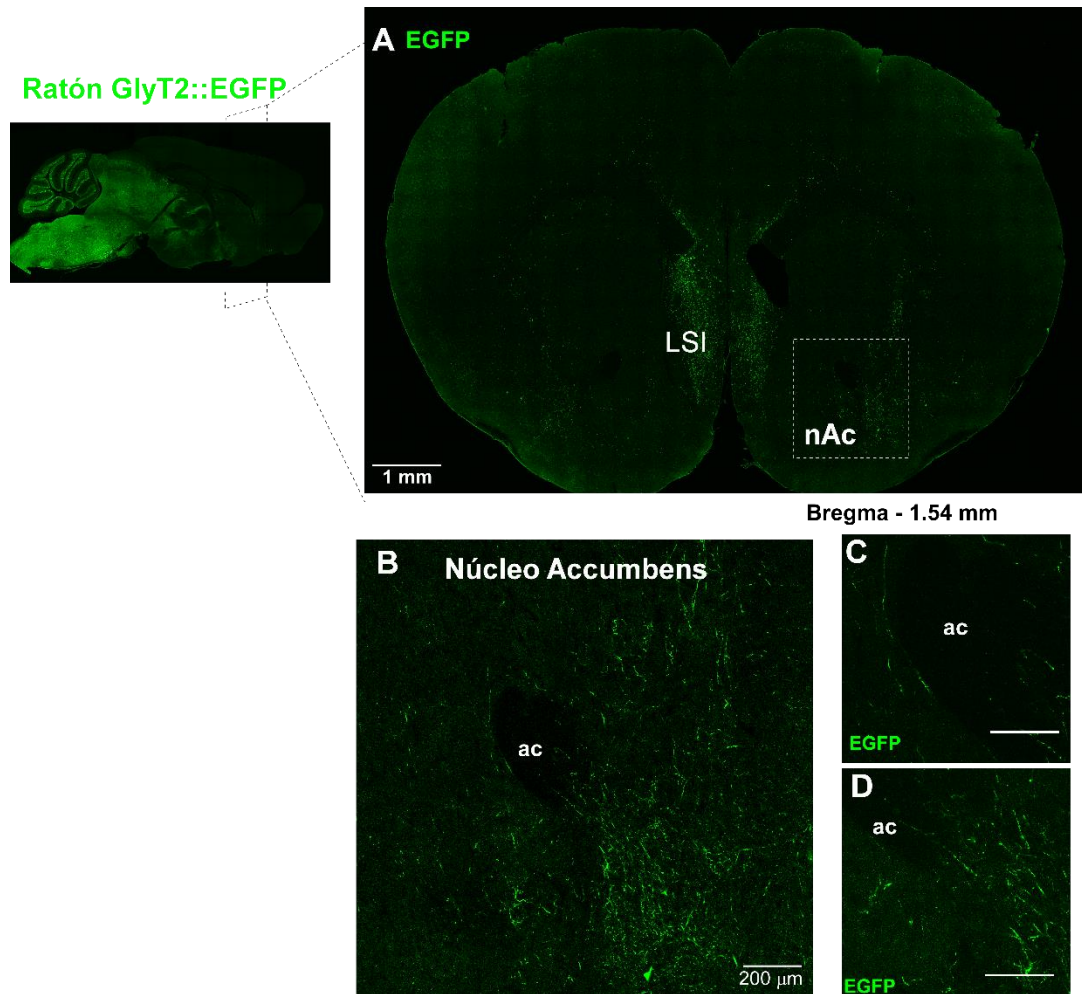


Figura 18. Análisis inmunohistoquímico del nAc del animal GlyT2::EGFP. Rebanadas coronales que contienen nAc en animal transgénico GlyT2::EGFP para evidenciar la presencia de inervación glicinérgica. A. Sección coronal ubicada en el bregma -1.54 mm (coordenadas de referencia Atlas Allen Brain Mouse) inmunomarcada con anti-GFP (verde). B. Microfotografía ampliada de la región del nAc para denotar la presencia de fibras EGFP+ en el nAc. C-D. Se muestran distintos planos del nAc y la comisura accumbal. ac: comisura anterior; núcleo septal lateral intermedio (LSI).

Actividad 2.2: Estudiar neuronas glicinérgicas en IPAG a 6, 12 y 18 meses de edad.

El siguiente estudio después de haber explorado sobre el origen de la innervación glicinérgica que llega al nAc y describir que existen neuronas glicinérgicas dentro de la sustancia gris periacudectal que inervan al Accumbens, el núcleo que juega un rol crucial en las conductas motivadas y el placer, nos enfocamos en determinar como el envejecimiento podría afectar la integridad de esta innervación. Para ello, primero inyectamos ratones GlyT2::Cre de 6, 12 y 18 meses con el virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP (Figura 19). Luego de 6 semanas, se procesó el cerebro de los animales para la obtención de secciones sagitales de 35 μm las cuales fueron etiquetadas con el anticuerpo anti-EGFP, que reconoce el reportero del virus retrógrado (A-D). De las imágenes obtenidas por microscopia confocal, se obtuvo señal asociada a EGFP (verde) en la IPAG de los tres grupos de estudio: 6 meses (B), 12 meses (C) y 18 meses (D). Seguido de esto, cuantificamos y graficamos el número de neuronas positivas para EGFP en una sección de 35 micrómetros que contenía el mesencéfalo, por cada animal de cada grupo de estudio ($n=3$ para cada grupo) (E). Se contaron un promedio de 16.67 ± 1.33 neuronas EGFP+ para los ratones de 6 meses por cada sección, 20.33 ± 1.76 neuronas EGFP+ para los animales de 12 meses y 17.67 ± 2.40 neuronas EGFP+ para los animales de 18 meses. Del análisis estadístico se extrajo que estas diferencias no eran estadísticamente significativas ($F(2, 6) = 1.010$; $p = 0.4186$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones

múltiples, n=3), lo que sugiere que, si bien la presencia de neuronas glicinérgicas es conservada en esta área del mesencéfalo, esta no se vería sustancialmente afectada a nivel estructural durante el envejecimiento.

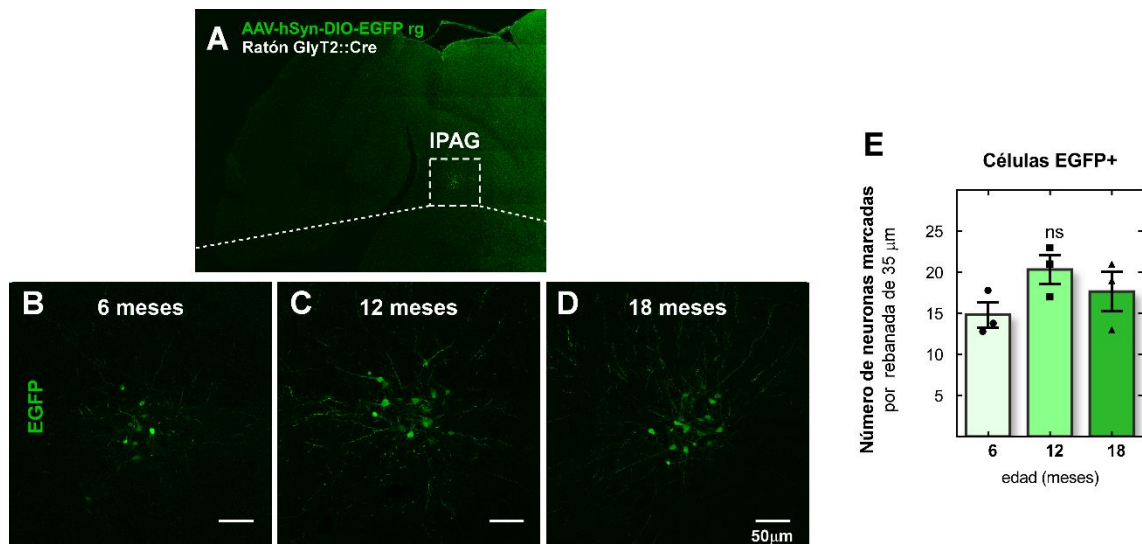


Figura 19. Análisis estructural de la integridad de la innervación glicinérgica de la IPAG en animales durante el ciclo vital. A. Fotografía de la región del mesencéfalo IPAG marcada retrógradamente con el virus AAV-hSyn-DIO-EGFP que expresa el reportero EGFP (verde). B-D. Vista ampliada de neuronas EGFP+ de la IPAG de ratones de 6 (B), 12 (C) y 18 meses (D). E. Cuantificación del número de neuronas EGFP+ en cortes sagitales de ratones de 6, 12 y 18 meses. Se cuantificó una sección de 35 µm de grosor por cada animal. n=3 cada condición. ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples ns: no significativo, n=3 por condición.

Considerando que la cuantificación del número de neuronas no mostró alteraciones en animales envejecidos, decidimos analizar a nivel molecular algunos componentes de la sinapsis glicinérgica que podrían verse alterados en animales de edad avanzada (Figura 20). Primero, se evaluó el nivel de expresión proteica del marcador clásico de neuronas glicinérgicas, el transportador de glicina de tipo 2, en el nAc de animales de 6, 12 y 18 meses mediante *western blot* (n=4 por c/grupo) (A). Como control de carga se evaluó G β . A continuación, se realizó la cuantificación densitométrica de la señal asociada a GlyT2 en la inmunodetección (B), donde se obtuvo que los ratones de 6 meses expresan niveles proteicos promedio de 0.2619 ± 0.04 UA, los animales de 12 meses expresan 0.1717 ± 0.01 UA, mientras que los animales de 18 meses exhiben niveles de proteínas promedio de 0.2371 ± 0.05 UA. Del análisis estadístico se extrajo que estas diferencias no son estadísticamente significativas, sugiriendo que la expresión proteica de este transportador presináptico en el nAc no se altera con la edad ($F(2, 8) = 1.232$; $p = 0.3417$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, n=4).

Para descartar alteraciones a nivel de expresión génica, quisimos realizar una PCR cuantitativa, para lo cual primeramente validamos los partidores que reconocen el ARNm para GlyT2 en cDNA de medula de ratón y el nAc de animales de 6, 12 y 18 meses (C). Si bien, la PCR amplificó cuando se usó el cDNA de médula (control positivo de expresión de GlyT2), esto no ocurrió cuando se usó cDNA de nAc. Estos resultados se replicaron cuando se realizó la PCR

cuantitativa, ya que la reacción arrojó 'No Ct' cuando se evaluó el gen para GlyT2 en las muestras evaluadas, no así cuando se evaluó el gen de referencia (ciclofilina) (datos no mostrados). Por ello, mediante un esquema simple (D), teorizamos que el ARNm para GlyT2 estaría expresándose en el soma de las neuronas glicinérgicas (en la IPAG), mientras que el transportador ya sintetizado se localizaría en los terminales presinápticos que llegan al nAc.

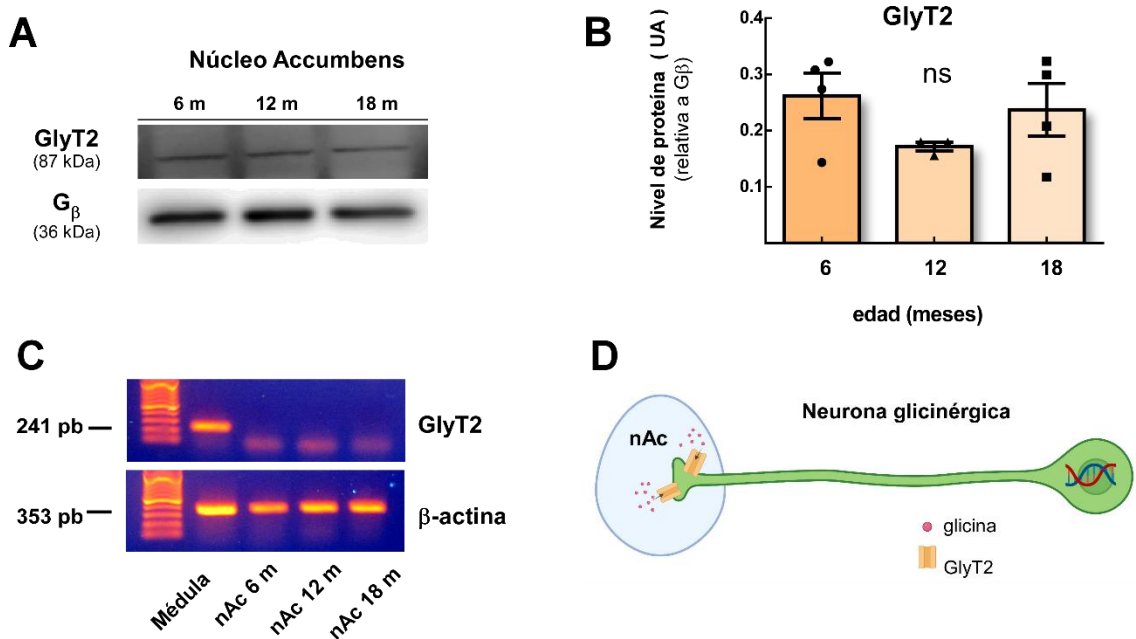


Figura 20. Análisis de la expresión de componentes glicinérgicos en ratones a distintas edades. A. Evaluación de la expresión proteica de GlyT2 en el nAc de ratones a las distintas edades. Se usó como control de carga el dímero G_β. B. Cuantificación densitométrica de GlyT2; ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, n=3-4 por condición. C. Ensayo de RT-PCR para el gen que codifica al transportador de glicina tipo 2 (GlyT2). La reacción de PCR se llevó a cabo usando cDNA proveniente de médula como control positivo, nAc

de ratones de 6, 12 y 18 meses. Se usó como control el gen de β -actina. D. Figura que sugiere la localización del gen para GlyT2 en el soma de neuronas glicinérgicas.

No existen reportes que evalúen los niveles de glicina en el nAc en animales envejecidos, nosotros, usando el anticuerpo que reconoce glicina, quisimos evaluar con un enfoque sencillo, si los niveles de glicina se modifican con la edad. Para ello, inmunomarcamos secciones coronales que contienen nAc con un anticuerpo anti-glicina (verde) (Fig. 21 A-D). Se inmunodetectó además NeuN (B, cian) y MAP2 (C, rojo), ambos marcadores neuronales. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a glicina en animales de 6 meses arrojó un valor promedio de 2589 ± 135 UA, los animales de 12 meses 1991 ± 280 UA, mientras que los animales de 18 meses exhiben niveles promedio de 2214 ± 411 UA. El análisis estadístico concluyó que estos valores no son estadísticamente significativos ($F(2, 8) = 1.558$; $p = 0.2682$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n=3-5$), sugiriendo que la glicina en el nAc no sería un neurotransmisor que se altere con el envejecimiento.

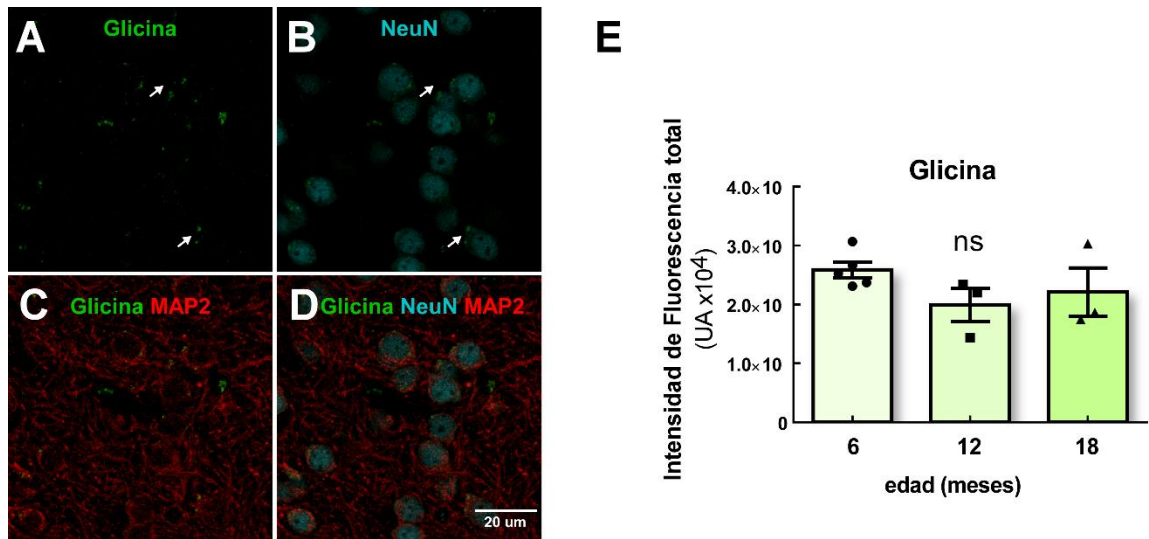


Figura 21. Análisis de la expresión de componentes glicinérgicos en ratones a distintas edades. A-D. Inmunohistoquímica en neuronas accumbales inmunomarcadas con anticuerpo anti-glicina (A, verde), NeuN (B, cian), MAP2 (C, rojo). D. superposición de los marcajes. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia para la marca asociada a glicina. ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, ns: no significativo, n=3-5 animales por condición.

Si los componentes glicinérgicos no exhiben cambios asociados al envejecimiento, ¿es posible que el sistema GABAérgico contribuya a la disminución en la transmisión inhibitoria observada en el nAc según la data no publicada de nuestro laboratorio? Para responder esta interrogante, evaluamos la expresión de diversos componentes del sistema GABAérgico mediante *western blot* en animales de 6, 12 y 18 meses (Figura 22).

Inmunodetectamos la enzima Ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD1/67) la cual participa en la síntesis de GABA en el nAc de animales de los tres grupos de estudio (A). Esto con el objetivo de determinar si el envejecimiento altera la expresión de esta enzima y consecuentemente la síntesis de GABA. La cuantificación densitométrica relativizada a G β , determinó valores promedio de 0.80 ± 0.12 UA para la expresión de GAD1/67 en ratones de 6 meses, 0.89 ± 0.32 UA en animales de 12 meses y 0.62 ± 0.10 UA en ratones de 18 meses (n=4). Del análisis estadístico, se extrajo que los niveles relativos de GAD1/67 inmunodetectados en extractos de proteínas del nAc de ratones no exhibieron diferencias significativas en función de la edad ($F(2, 8) = 1.339$; $p = 0.3152$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, n=3-4 animales c/condición).

A continuación, se evaluaron los niveles del Transportador de aminoácidos inhibidores vesiculares (VIAAT o VGAT), el cual se encarga de la captación de GABA y glicina en vesículas sinápticas (Bormann, 2000) (C). Del análisis densitométrico, se obtuvieron valores promedio de 0.69 ± 0.07 para los animales de 6, mientras que para los ratones de 12 y 18 meses se alcanzaron valores promedios de 0.79 ± 0.22 y 0.60 ± 0.19 respectivamente. La estadística indicó que los niveles relativos de este transportador no mostraron diferencias significativas a las distintas edades ($F(2, 8) = 1.092$; $p = 0.3806$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, n=3-4).

También evaluamos la expresión proteica de la subunidad $\alpha 1$ del receptor de GABA (GABA-A $\alpha 1$), la cual se expresa ampliamente en el nAc (E). Similar a lo observado con la enzima GAD1/67 y VGAT, según la densitometría, GABA-A $\alpha 1$ exhibió una expresión estable y conservada en el tiempo. Los ratones de 6 meses alcanzaron valores promedio de 0.70 ± 0.14 UA, 0.82 ± 0.14 UA para animales de 12 meses. En el caso de los niveles relativos de GABA_A $\alpha 1$ provenientes de ratones de 18 meses, estos oscilaron en valores de 0.83 ± 0.04 UA, no siendo significativamente distintos que en animales de 6 o 12 meses ($F(2, 7) = 1.170$; $p = 0.3643$, ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, $n=3-4$). Esta uniformidad en la expresión de los distintos componentes GABAérgicos, sugieren que el sistema de inhibición GABAérgico no se vería afectado en el nAc durante el envejecimiento.

De manera interesante, los niveles de expresión asociados a GABA_A $\alpha 1$ en el nAc fueron similares a los niveles de expresión asociados a pan- α -GlyR en los animales de 6 y 12 meses, lo cual podría sugerir que la expresión a nivel proteica de tan sólo las subunidades $\alpha 1$ del receptor GABA_A, podría ser equiparable a la expresión de todas las subunidades α del GlyR. Es importante mencionar que el receptor GABA_A puede estar compuesto de subunidades α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , y/o ρ_{1-3} (Sigel and Steinmann, 2012), y que en este trabajo sólo se evaluó la expresión de GABA_A $\alpha 1$ en el nAc.

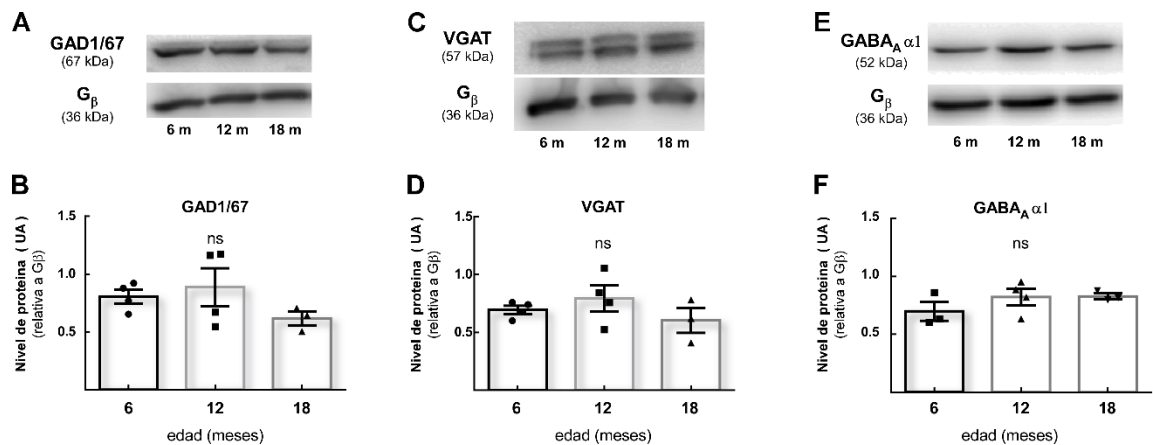


Figura 22. Análisis de expresión proteica de componentes GABAérgicos en el nAc durante el ciclo vital. A. Detección proteica de GAD1/67 en el nAc de ratones de 6, 12, 18 meses. B. Cuantificación densitométrica del nivel de proteína asociado a GAD1/67 C. Detección proteica de VGAT. D. Análisis densitométrico del nivel de proteína VGAT. E. Detección proteica del receptor de GABA-A α 1 en el nAc. F. Cuantificación densitométrica del nivel de proteína asociado a GABA $_A$ α 1. Como control de carga se utilizó el dímero G β . Los análisis densitométricos se realizaron con el software Quantity One. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía con un post-test de Tukey; ns: no significativo, n=3-4 animales c/ condición.

Actividad 2.3. Estudiar las propiedades de los eventos sinápticos glicinérgicos optogenéticamente estimulados en animales que expresen el canal de rodopsina en las neuronas GlyT2 positivas para evaluar la funcionalidad de la inervación.

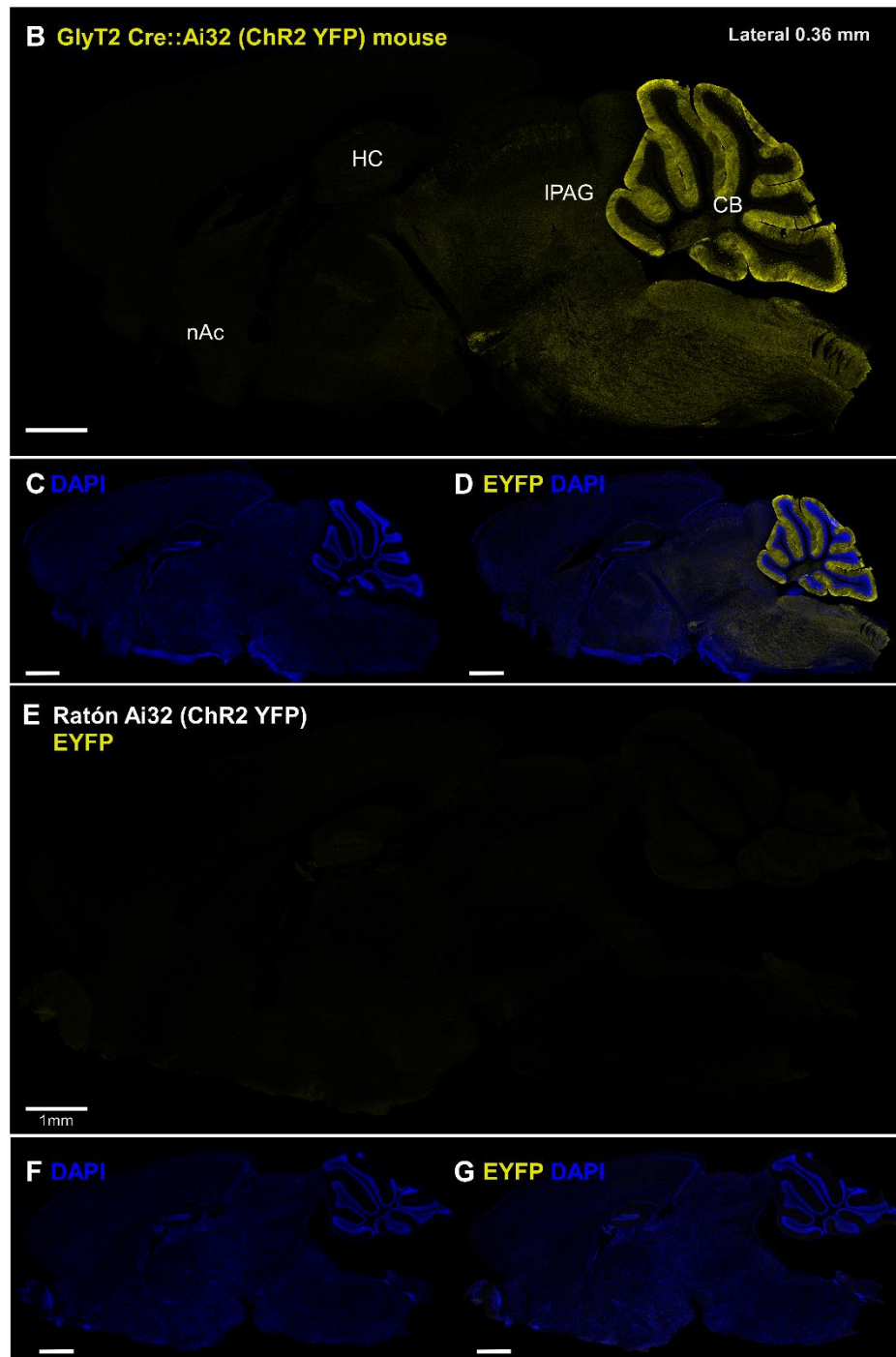
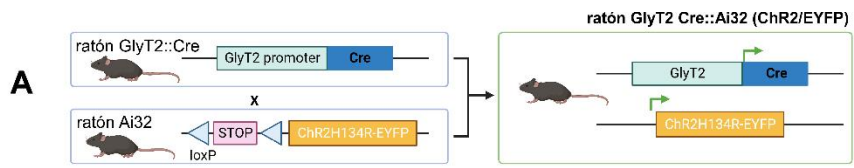
Para evaluar la funcionalidad de la inervación glicinérgica de la IPAG, previamente evidenciada usando trazadores retrógrados inyectados en el nAc, hicimos uso de animales transgénicos GlyT2Cre::Ai32 (ChR2-EYFP), los cuales

expresan el canalrodopsina-2 en las neuronas glicinérgicas de manera endógena. Este animal se generó realizando la cruce de ratones GlyT2::Cre con ratones Ai32(ChR2-EYFP). Los animales Ai32 codifican el canalrodopsina-2 en orientación invertida y flanqueado con sitios LoxP, de manera que sólo en presencia de Cre, estos animales expresarán la opsina como consecuencia de la inversión de los sitios LoxP, dando como resultado un marco de lectura funcional para ChR2 (Figura 23 A).

La generación de estos animales tuvo como objetivo: 1. Evaluar la funcionalidad de la inervación glicinérgica que llega al nAc, y 2. Estudiar la funcionalidad de esta inervación a las distintas edades: 6, 12 y 18 meses, para estudiar si el envejecimiento ejerce un efecto en la neurotransmisión glicinérgica accumbal.

Se obtuvieron secciones sagitales cerebrales de animales GlyT2Cre::Ai32 (ChR2-EYFP) (B) en donde se evidencia la expresión de EYFP asociada al ChR2 en regiones caudales, el cerebelo y en menor medida en el área del cerebro medio o mesencéfalo mediante imágenes de microscopia confocal. En los paneles inferiores se muestra el marcaje con DAPI (C) y la superposición de ambas marcas (D). También analizamos el marcaje de EYFP en animales Ai32 (E) y GlyT2::Cre (H) por sí solos, usados como controles negativos y para evidenciar la especificidad del sistema Cre-Lox en nuestra nueva cepa. No evidenciamos señal asociada a EYFP en los ratones Ai32 ni en los animales GlyT2::Cre, lo cual nos sugiere que estos animales no expresan niveles

detectables del Chr2 de manera ectópica. En los paneles inferiores se muestra las mismas secciones teñidas con DAPI y la superposición de EYFP y DAPI para cada cepa.



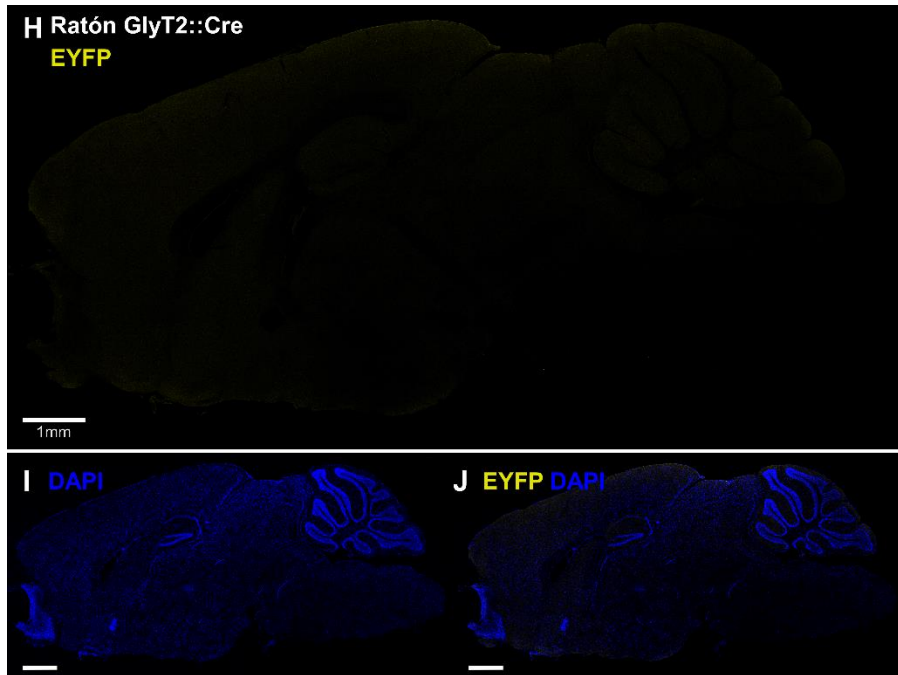


Figura 23. Generación de ratones que expresan el canalrodopsina-2 exclusivamente en neuronas glicinérgicas mediante el sistema Cre-Lox. A. Esquema del cruce de ratones GlyT2::Cre y Ai32(ChR2-EYFP) para la generación de ratones doble transgénicos GlyT2 Cre::Ai32 dobles homocigotos para ambos genes. B-G. Cortes sagitales de ratón GlyT2 Cre::Ai32 (ChR2-EYFP) inmunomarcados con el anticuerpo anti-EYFP (B-D) y ratón Ai32 como animal control (E-G). Se utilizó DAPI como marcador neuronal.

A modo de caracterización, analizamos la expresión de EYFP asociado a ChR2 en regiones cerebrales en las cuales se reconoce la expresión de GlyT2 en animales GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) (Figura 24 A). Cabe destacar que se observó una expresión robusta de ChR2/EGFP (amarillo) en el cerebelo y el tronco encefálico, en línea con los reportes de literatura y validando la expresión

de ChR2 en áreas cerebrales con abundante presencia de neuronas glicinérgicas (Uusisaari and Knopfel, 2010; Zeilhofer et al., 2005).

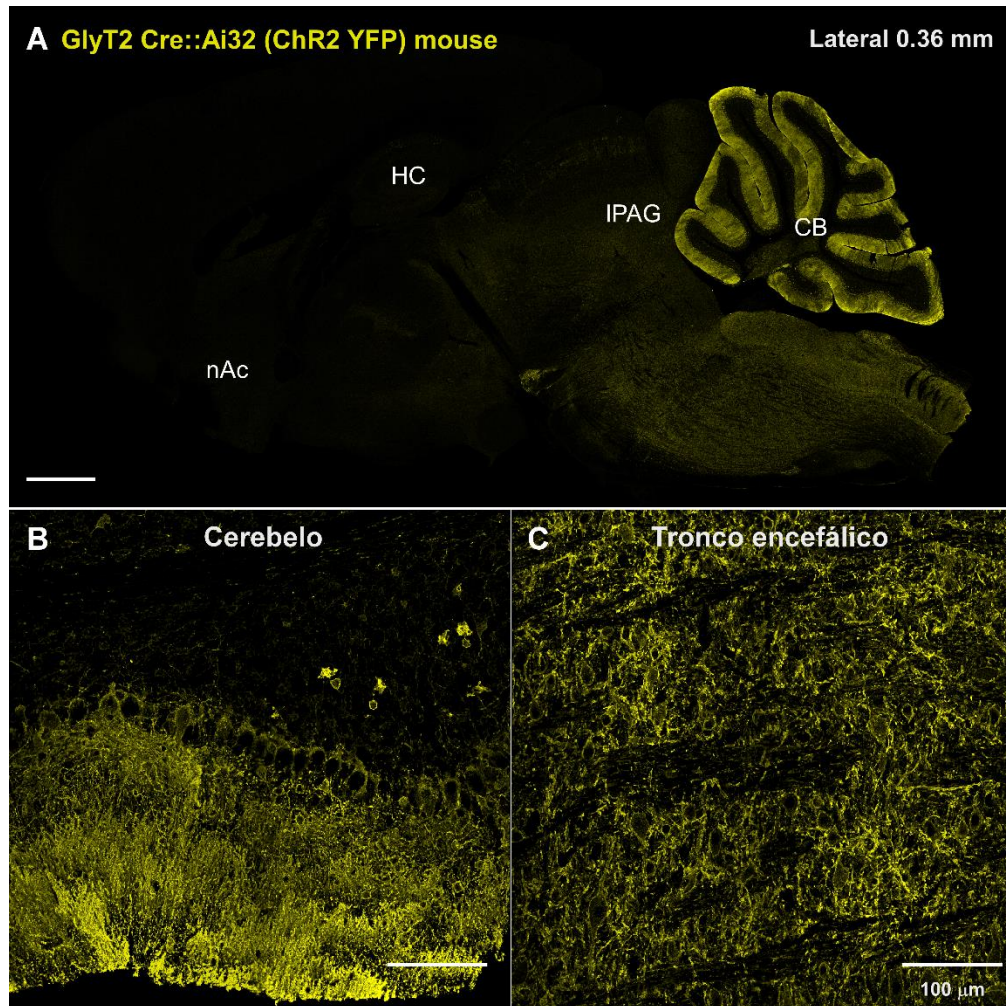


Figura 24. Caracterización de la expresión del Canalrodopsina-2 en neuronas glicinérgicas de animales transgénicos. A. Corte sagital de ratón GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) del área lateral 0.36 mm inmunomarcado con anticuerpo anti-EYFP. CB: cerebelo, HC: hipocampo. B. Fotografía ampliadas del cerebelo y el tronco encefálico (C) mostrados como controles positivos de neuronas glicinérgicas.

A continuación, se evaluó la expresión de la opsina en la región del mesencéfalo donde se evidenció marcaje con el virus retrógrado, la sustancia gris periacudectal (IPAG) (Figura 25 A). Para una mejor visualización, se muestra una magnificación de la IPAG vista sagitalmente y la sumatoria de planos en el eje Z (Z-stack), donde se evidenció señal ChR2/EGFP+ (B). Además, fue posible detectar señal ChR2/EGFP+ en el soma de neuronas mesencefálicas (C y D), las cuales exhiben señal con un patrón de membrana, esperado para ChR2 el cual es una proteína transmembrana.

A continuación, se obtuvieron rebanadas cerebrales coronales de la IPAG de animales GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) con edades entre los 2 a 6 meses, para la activación de neuronas glicinérgicas que inervan al nAc por optogenética. Haciendo uso de la configuración de fijación de voltaje de célula completa (*whole-cell voltage-clamp*) y la estimulación por luz (470 nm) por 1 ms, se registraron neuronas del mesencéfalo en presencia de líquido céfalo raquídeo artificial (aCSF) (E). Las estimulaciones optogenéticas condujeron a la generación de corrientes sinápticas inhibitorias totales (oIPSC) con una amplitud de promedio de 96 ± 12.9 pA, (n = 6 neuronas de 5 animales). La perfusión de estriquina 2 μ M (STN), bloqueó toda la corriente sináptica evocada por la luz a los 5 min de la aplicación del inhibidor. Finalmente, el lavado con ACSF, permitió la recuperación progresiva de las oIPSC, sugiriendo que las corrientes evocadas son sensibles a STN y que, por ende, responden a glicina. Estos datos además validan que las

neuronas del IPAG expresan ChR2 funcionales en neuronas glicinérgicas en nuestro modelo.

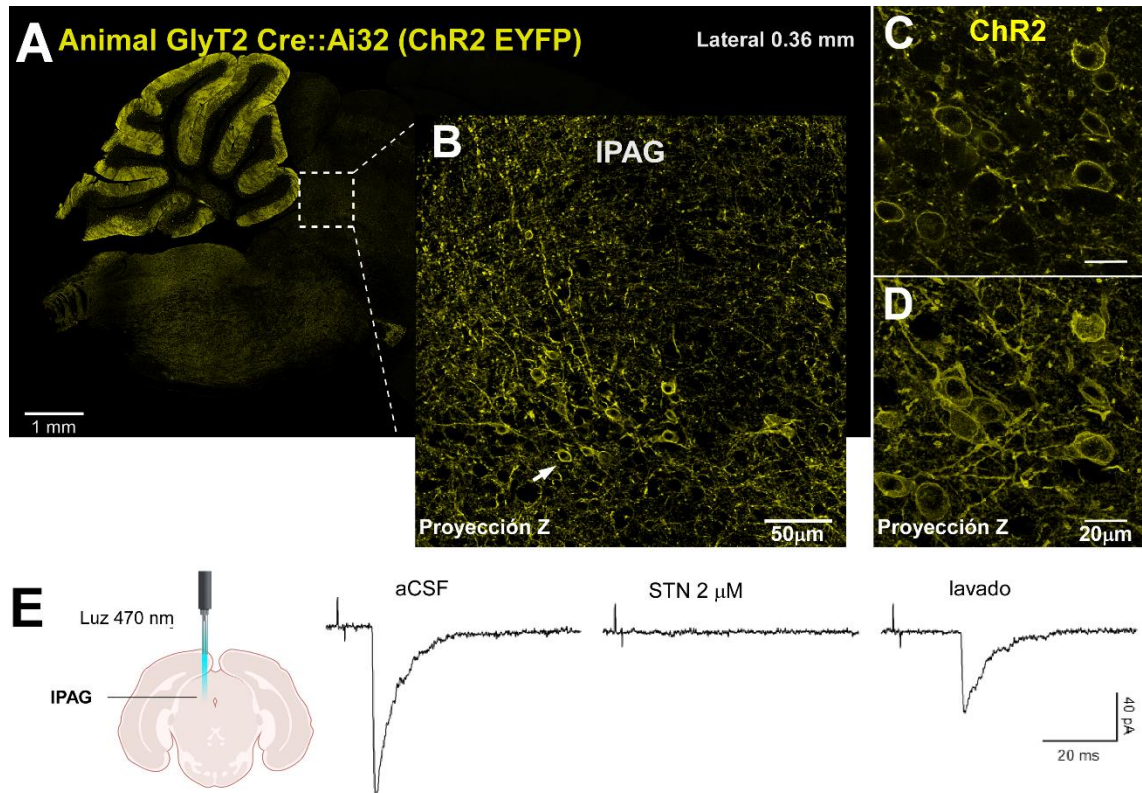


Figura 25. Expresión y activación de neuronas glicinérgicas por optogenética.

A. Corte sagital de ratón GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) que contiene mesencéfalo inmunomarcado con anticuerpo anti-EYFP. B. Fotografía ampliada de la región IPAG en A. C-D. Imágenes ampliadas denotando somas de neuronas ChR2+. E. Trazo representativo de la activación optogenética de una corriente de glicina (oIPSC) evocada por luz de 1 ms, 470 nm en IPAG. De izquierda a derecha: oIPSC con solo la perfusión de aCSF, oIPSC después de la perfusión de estriquina (STN) durante 5 minutos y oIPSC después de 5 minutos de lavado.

Después de validar la funcionalidad de nuestro modelo animal por optogenética en una región en la cual se ha reportado la presencia de neuronas glicinérgicas, quisimos evaluar la funcionalidad de la innervación glicinérgica que recibe el nAc. Primero, mediante microscopía confocal, evaluamos la expresión del ChR2 en el nAc de los ratones GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) en rebanadas coronales (Figura 26 A y B, amarillo). Se observaron fibras/axones positivos para EYFP, pero no somas EYFP⁺ en el nAc. Es importante destacar que la señal asociada a EYFP/ChR2 en el nAc exhibe una intensidad de fluorescencia visiblemente menor a la observada en regiones del cerebro medio o áreas caudales. Sin embargo, es posible evidenciar presencia de innervación glicinérgica en el nAc. Por ello, a continuación, se procedió a evaluar la funcionalidad de esta innervación. Se usaron rebanadas coronales que contienen nAc y se estimularon con luz de 470 nm por 1 ms, situando el estimulador a unos 500 μ m aproximadamente de la región de interés. La estimulación con luz dio origen a dos tipos de respuestas las cuales se muestran con trazos representativos en la figura 26.

La estimulación en presencia de aCSF aproximadamente el 90% de las veces que se registraron neuronas MSN del nAc, no originó un evento evocado por luz como muestra el trazo en C (n=31 neuronas de 18 animales). En 10% restante de las neuronas (n=5 neuronas de 2 animales) estimuladas dio origen a oIPSC de amplitud promedio de 54.3 ± 5.8 pA en presencia de aCSF (D), sin embargo, al perfundir las rebanadas con STN 2 μ M por 15 minutos, para inhibir las corrientes glicinérgicas, este evento no se abolió. Este tipo de respuestas que

fueron las menos frecuentes, coincidentemente provenían de animales que tenían un nivel de fluorescencia asociada a ChR2/EYFP alto en el nAc. En ese sentido, nosotros creemos que en estos animales pudo ocurrir una alteración genética que llevó a una expresión aberrante/ectópica del ChR2, lo cual podría explicar la respuesta a STN que no abolió los eventos glicinérgicos. Si bien, se evidenció la presencia de fibras ChR2+ en el nAc mediante inmunohistoquímica, la baja frecuencia (probabilidad) de este tipo de respuestas optogenéticas, no permitió una mayor caracterización de esta inervación. En este sentido, tan solo 2 neuronas evocaron respuesta a la luz de los 18 animales analizados. Nosotros atribuimos la falta de respuestas optogenéticas en el nAc, a la baja probabilidad de encontrar neuronas MSN que estén siendo inervadas por las neuronas glicinérgicas. Esta limitación, se acentúa aún más si se considera el gran volumen del nAc, haciendo aún más compleja la probabilidad de encontrar neuronas accumbales inervadas por las neuronas de la IPAG. Más aun, si consideramos que las neuronas de la IPAG representan una inervación discreta.

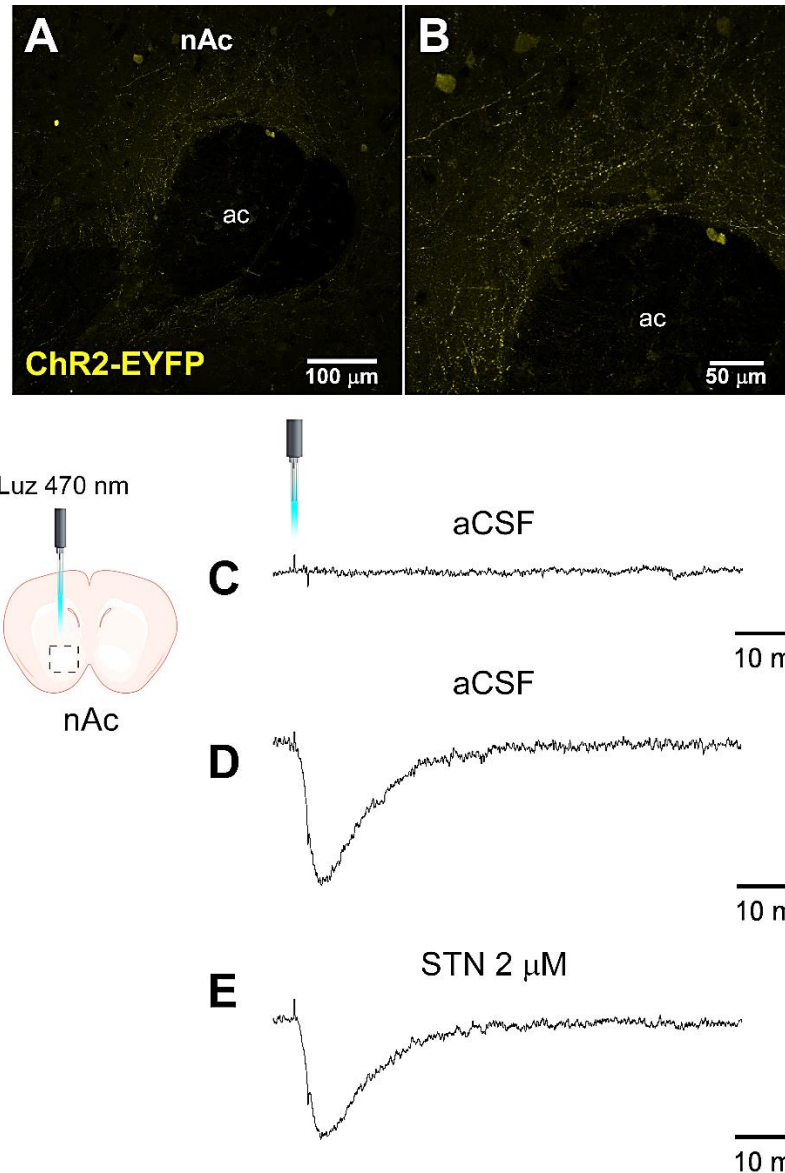


Figura 26. Expresión y activación de neuronas glicinérgicas en el nAc por optogenética. A-B. Rebanadas cerebrales coronales de ratón GlyT2 Cre:: Ai32 que contienen nAc inmunomarcadas con anticuerpo anti-EYFP (amarillo). ac: comisura anterior. B. Fotografía ampliada de la región en A para denotar fibras o invasión EYFP+. C-E. Trazos representativos de la estimulación optogenética mediante un pulso de evocada por una luz de 470 nm por 1 ms en el nAc. C. Trazo representativo que muestra la ausencia de corrientes glicinérgicas en

presencia de aCSF. D. Trazo representativo de la activación optogenética de una corriente de glicina (oIPSC) evocada por una luz en presencia de aCSF. E. Trazo de oIPSC de la misma neurona que en D luego de la perfusión de STN por 15 minutos. pA: picoampere. STN: estriquina. aCSF: líquido cefalorraquídeo artificial.

De manera interesante, la generación de la cepa GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP), nos permitió validar a través de una tercera cepa de animales transgénicos, la presencia de neuronas glicinérgicas en la IPAG del mesencéfalo (Figura 27), dando cuenta de la especificidad de los sistemas de expresión Cre-Lox, AAV DIO usados. En esta figura se muestran secciones sagitales que contienen IPAG de las tres cepas transgénicas utilizadas los tres sistemas utilizados: animales GlyT2::Cre inyectados con virus retrógrado en el nAc donde se evidencia marcaje retrógrado en la IPAG (A y B); animales GlyT2::EGFP que expresan EGFP endógenamente en neuronas glicinérgicas, mostrando somas EGFP+ en la IPAG (C y D); y por último los animales derivados de la cruce de ratones GlyT2::Cre con Ai32 (ChR2/EYFP), en donde se evidencia señal asociada a ChR2 en neuronas de la IPAG.

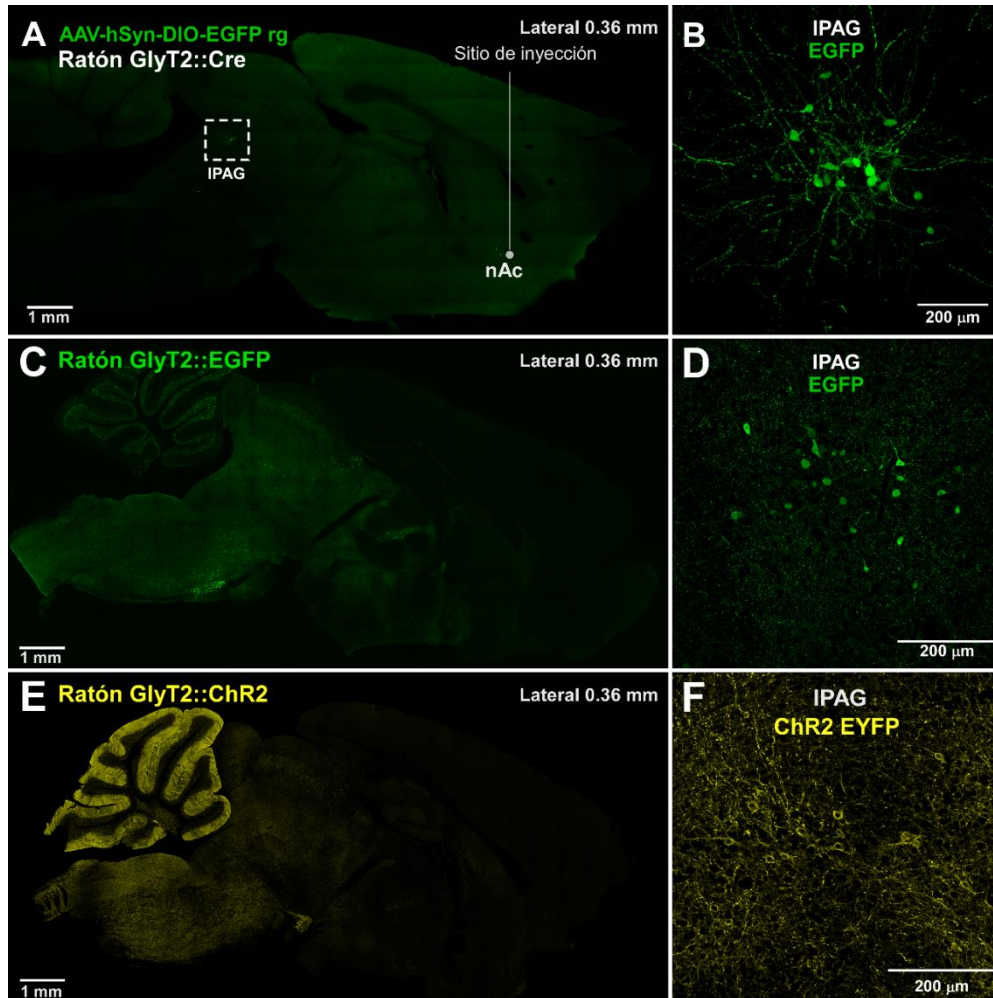


Figura 27. Análisis inmunohistoquímico de las cepas transgénicas utilizadas para el estudio de inervación glicinérgica. A y B. Marcaje retrógrado de redes neuronales glicinérgicas que contactan al nAc. Mediante la inyección del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP inyectado en el nAc de ratones GlyT2::Cre. C y D. Rebanadas de cerebro del animal transgénico GlyT2::EGFP el cual expresa endógenamente la proteína fluorescente EGFP exclusivamente en neuronas glicinérgicas. Las secciones fueron inmunomarcadas con anti-GFP (verde). E y F. Cortes sagitales de ratón GlyT2 Cre::Ai32 (ChR2-EYFP) inmunomarcados con el anticuerpo anti-EYFP. F. Magnificación donde se muestra IPAG.

En cuanto al estudio de la funcionalidad, debido a la discreta respuesta evidenciada mediante la estimulación optogenética, decidimos usar otra estrategia para evaluar la funcionalidad de la innervación glicinérgica de la IPAG. Para esta actividad, hicimos uso de un virus que expresa la Caspasa 3 de manera dependiente de la recombinasa Cre en animales GlyT2::Cre para generar la ablación específica de neuronas glicinérgicas en el mesencéfalo para posteriormente hacer un estudio conductual de consumo de etanol; ya que se reconoce que el nAc media respuestas a estímulos recompensantes como lo es el consumo de etanol y donde el receptor de glicina cumple un rol modulador. En este experimento, se inyectó el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple como virus control en la IPAG de animales GlyT2::Cre mediante estereotaxia. El virus AAV-flex-taCasp3-TEVp permite la expresión de la pro-caspasa 3 modificada genéticamente pro-taCasp3 y la proteasa TEVp (Tobacco Etch Virus) de manera dependiente de Cre (Figura 28 A) (Gray et al., 2010). La pro-taCasp3 codifica un sitio de escisión el cual es reconocido por la proteasa TEVp y permite el clivaje de la pro-Caspasa 3 llevándola a su forma activa. De esta forma la taCasp3 desencadena la apoptosis autónoma de las células, lo que minimiza la toxicidad para las células no Cre+ adyacentes. Como el virus que permite la ablación neuronal no expresa una proteína reportera, aquí se muestra la expresión de la proteína del virus control dependiente de Cre AAV-DIO-mApple (verde) inyectado en la IPAG usando las mismas coordenadas (B-E). La vista general en B en bregma -5.13 mm muestra la señal asociada a la proteína

mApple (verde) en la región del mesencéfalo cercana al 4to ventrículo replicando la señal vista con el virus retrógrado. Adicionalmente, se muestra el marcaje con DAPI para denotar la ubicación en el área cerebral. A continuación, se muestra una imagen ampliada de la señal mApple⁺ (C, verde), además de magnificación para denotar el patrón de expresión de la proteína reportera y la colocación con un marcador neuronal NeuN (magenta) para denotar la naturaleza de la célula (D-E). Demostrando que el sitio de inyección en el área del mesencéfalo se corresponde con el área en donde anteriormente se observó inervación glicinérgica con el virus retrógrado.

A continuación, para estudiar la efectividad de la ablación neuronal en la IPAG, inmunomarcamos secciones que contenían IPAG con el anticuerpo marcador neuronal anti-NeuN y el marcador nuclear TOPRO-3 (azul) en animales GlyT2::Cre inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple (F-I), para posteriormente cuantificar el número total de neuronas NeuN⁺ (magenta) en cada grupo de estudio (J), utilizando el plugin “3D Objects Counter” del software ImageJ. Se muestran imágenes representativas de la IPAG de ambos grupos de estudio, en donde se puede evidenciar una menor población neuronal en la IPAG del animal inyectado con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp (F). En de los animales inyectados con el virus control cuantificamos un promedio de 281 ± 23.8 neuronas la IPAG, mientras que en los animales inyectados con el virus para inducir ablación cuantificamos un promedio de 264 ± 27.3 neuronas en un área promedio de 46.05 ± 10.34 cm². Si bien el análisis estadístico no mostro

una diferencia significativa ($t(6)=0.9120$; Prueba t no pareada, $p = 0.3969$, $n=4$ c/grupo), se puede ver una tendencia a la disminución en el número de neuronas en la IPAG en los animales con ablación neuronal glicinérgica. En este sentido, era esperable que no hubiese una diferencia significativa en los grupos de estudio, dado el discreto número de neuronas que representan las neuronas glicinérgicas en la IPAG.

Adicionalmente, inmunomarcamos secciones que contenían IPAG con un anticuerpo anti-glicina para determinar si la ablación neuronal glicinérgica en la IPAG, se traduciría en una disminución de la glicina inmunodetectada. Para el grupo control, se muestra el sitio de inyección con las neuronas del IPAG expresando mApple (K, rojo) y la inmunotinción para glicina (verde) para ambos grupos de estudio (L y M). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a glicina en animales inyectados con el virus control AAV-DIO-mApple arrojó un valor promedio de 3273 ± 273 UA, mientras que los animales inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp exhiben niveles promedio de 2712 ± 81 UA. El análisis estadístico concluyó que estos valores no son estadísticamente significativos ($t(5)=1.701$; Prueba t no pareada, $p = 0.1498$, $n=4$ c/grupo), sin embargo es posible evidenciar una disminución en la intensidad de fluorescencia asociada a glicina en los animales con ablación, lo cual se podría atribuir al efecto de la muerte de un número discreto de neuronas glicinérgicas en la IPAG como se mostró previamente.

A
AAV-flex-taCasp3-TEVp
o AAV DIO mApple (control)

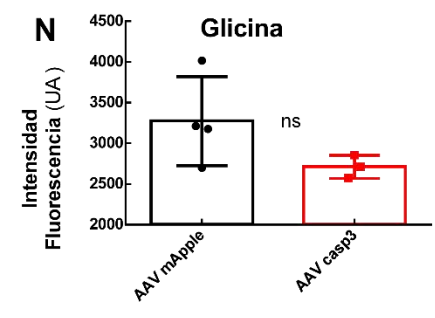
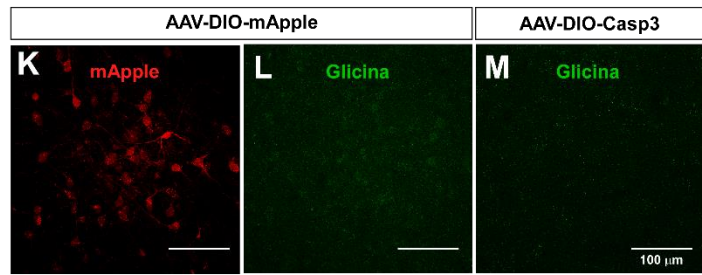
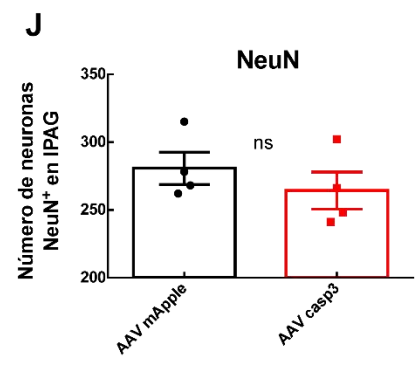
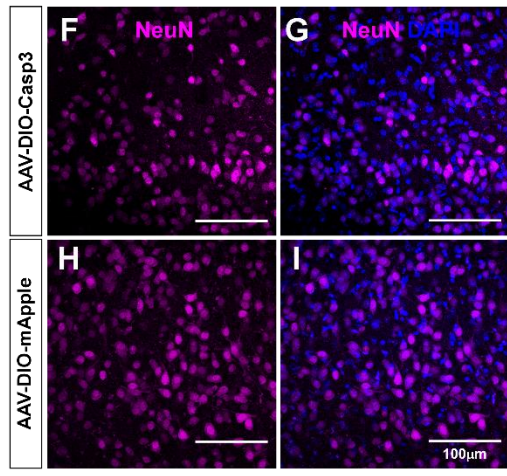
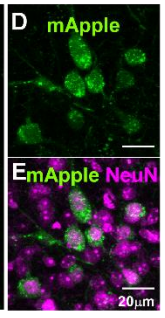
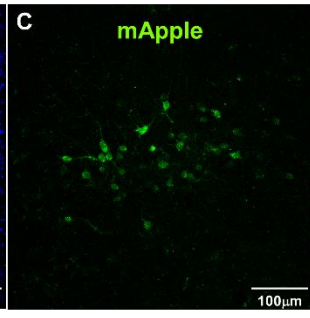
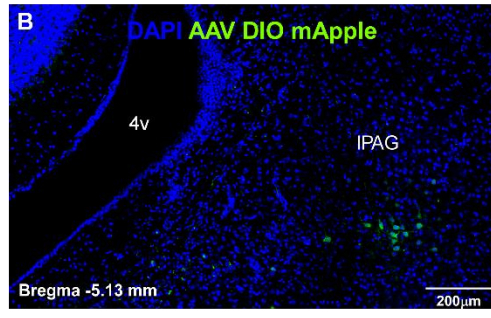
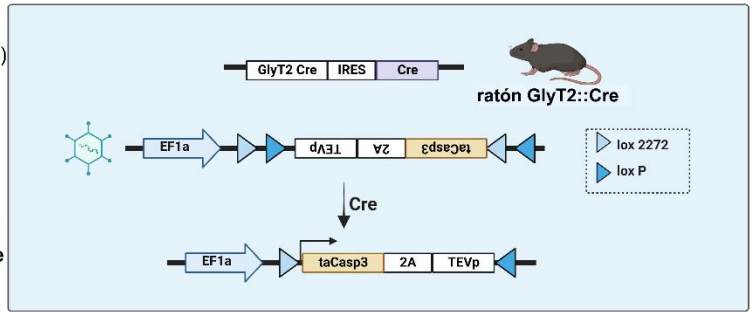
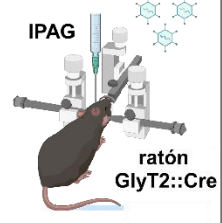


Figura 28. Ablación selectiva de neuronas glicinérgicas en la IPAG mediada por la expresión de caspasa-3 dependiente de la recombinasa Cre. A. Esquema experimental de la estrategia genética para la ablación neuronas de manera dependiente de Cre. Se inyectaron ratones GlyT2::Cre con AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple como virus control. B-E. Secciones sagitales de animales inyectados con el virus AAV-DIO-mApple (verde) para evidenciar el sitio de inyección y la especificidad. C. Imagen ampliada de la IPAG. D-E. Imágenes ampliadas indicando somas positivos para la proteína reportera mApple y el marcador neuronal NeuN (magenta). F-I. Análisis inmunohistoquímico de NeuN en neuronas de la IPAG, marcadas con el anticuerpo neuronal anti-NeuN (magenta) y el marcador nuclear TOPRO-3 (azul) en secciones sagitales de animales inyectados con AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple. J. Cuantificación del número de neuronas en la IPAG en función de NeuN en ambos grupos de estudio. K-L. Inmunohistoquímica en neuronas de la IPAG inmunomarcadas con anticuerpo anti-glicina (L, M, verde); se muestra el sitio de inyección en los animales inyectados con virus control mApple (K, rojo). N. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a glicina en ambos grupos de estudio.

Una vez validado el sitio de inyección, se inyectaron ratones con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple como virus control en la IPAG de animales GlyT2::Cre. Luego de dos semanas de la inyección estereotáxica, los animales se sometieron a la prueba de campo abierto u '*Open field test*' para evaluar actividad locomotora basal y exploratoria de ambos grupos (Seibenhener and Wooten, 2015) (Figura 29 A). En esta prueba, los ratones exploran el aparato de prueba durante 20 minutos. Las trayectorias observadas en animales del grupo control y las del grupo con la ablación glicinérgica sitio específica, no

mostraron cambios evidentes (A). Graficamos el tiempo que en que los ratones recorren el centro de la caja durante un tiempo total de 20 minutos (B). Se realizó el análisis del tiempo que los ratones pasan en el centro de la caja ya que, si los ratones pasan más tiempo en las esquinas versus el centro, esto podría sugerir la presencia de un comportamiento de tipo ansioso. Cuando se analizó el tiempo total que pasan en el centro de la caja, los animales inyectados con el virus control, pasaron en promedio 33.21 ± 4.4 segundos en el centro de la caja, mientras que los animales inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp permanecieron en promedio 38.48 ± 3.3 segundos en el centro de la caja (B). Si bien los animales a los cuales se les indujo la expresión de caspasa 3, exhiben un discreto aumento en el tiempo que pasan en el centro, este incremento no fue significativo según los resultados del análisis estadístico ($F(6,68)= 0.55$; $p=0.768$; Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test, $n= 9$ virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y $n= 7$ virus control), por lo que se puede afirmar que estos ratones no presentan comportamientos de tipo ansioso.

Paralelamente, se evaluó la distancia total recorrida por ambos grupos de animales: los inyectados con virus que expresa la caspasa (líneas en rojo) y los con virus control (líneas en negro) (C). Cuando se evaluó la distancia total recorrida se observó que los ratones inyectados con el virus control recorren en total (20 min) un promedio de 1755 ± 24.33 cm, mientras que los animales inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp recorren en promedio 1669 ± 69.96 cm de distancia; no mostrando diferencias significativas según los

resultados del análisis estadístico ($F(6,66) = 0.0993$; $p = 0.996$; Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test, $n = 9$ virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y $n = 7$ virus control). Esto se traduce en que los animales a los cuales se les indujo la expresión de Caspasa-3, exploran un ambiente nuevo al igual de cómo lo realizan los ratones inyectados con el virus control y que no presentan daño locomotor producto de la cirugía.

Finalmente, se registró el peso corporal de los animales en estudio para descartar posible pérdida del apetito asociada al procedimiento experimental. Se graficaron los valores de peso de los animales evaluados durante los 3 días previos a la prueba de consumo y el día 4 corresponde al peso del animal del 4to día de la prueba de consumo de etanol (D). De estas mediciones se obtuvo que los animales inyectados con el virus control pesaron en promedio 26.55 ± 0.1 gramos, mientras que los inyectados con el virus que induce la ablación, pesaron en promedio 27.71 ± 0.3 gramos. Estas variaciones no fueron significativas según el análisis estadístico ($F(3,61) = 0.0777$; $p = 0.972$; Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test, $n = 9$ virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y $n = 7$ virus control).

Estas pruebas mostraron que los ratones con ablación glicinérgica sitio específica, presentaron un comportamiento global normal con respecto a los ratones sin ablación, sin deficiencias motoras, comportamientos ansiosos ni cambios en el peso corporal, por lo tanto, se continuó con la prueba de consumo de etanol.

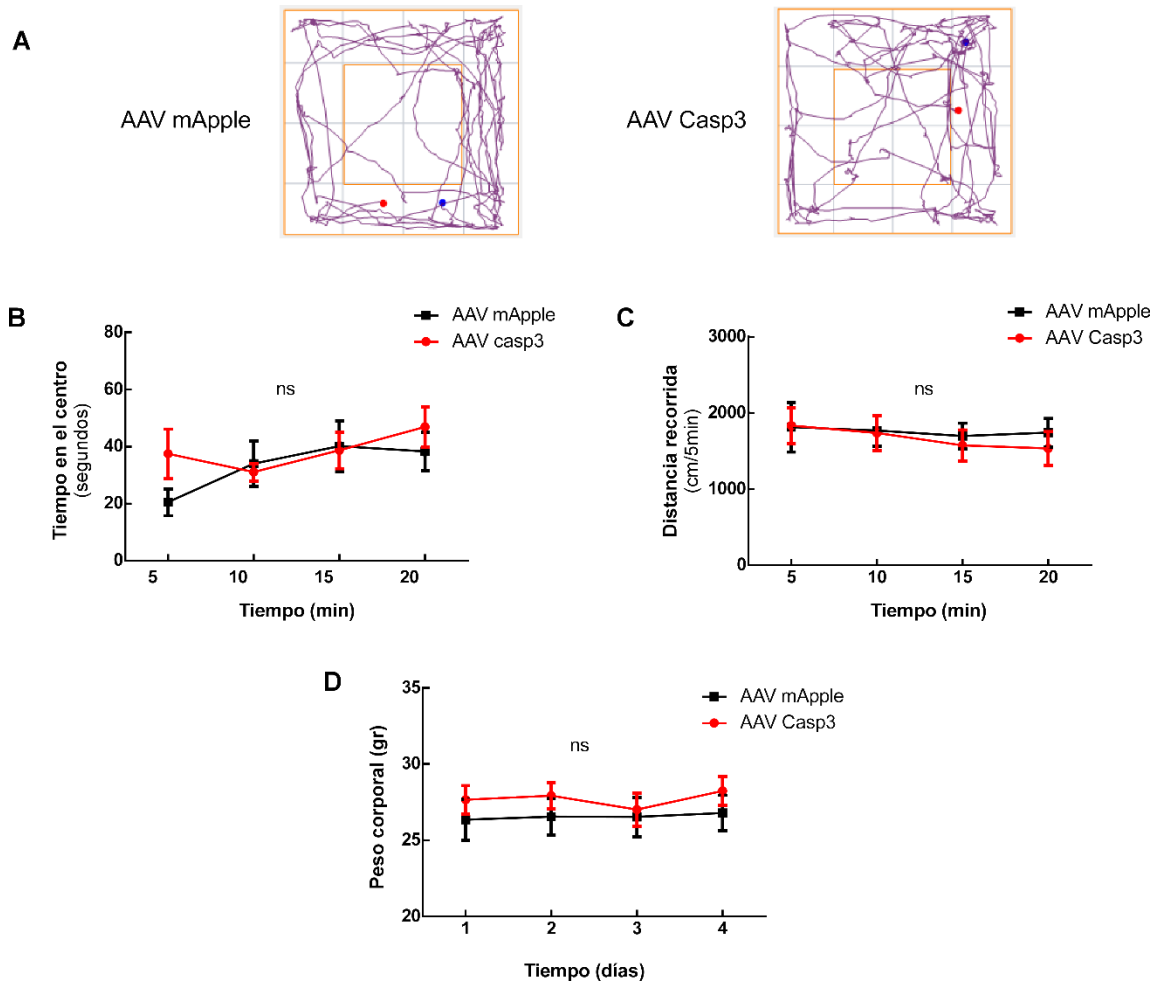


Figura 29. Evaluación de la actividad locomotora y del peso corporal en animales con ablación neuronal glicinérgica sitio específica en la IPAG. A. Trayectorias representativas de ratones inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o el virus control durante los primeros 5 min en la prueba de campo abierto. B. Gráfico del tiempo de permanencia de los ratones en el centro durante 20 min cuantificada cada 5 min. C. Gráfico de la distancia total recorrida durante 20 min cuantificada cada 5 min. D. Gráfico de los valores de peso de los animales evaluados durante los 3 días previos a la prueba de consumo y el día 4 corresponde al peso del animal del 4to día del DID.

En la prueba de consumo de etanol en la oscuridad (DID: drinking in the dark), los ratones, durante 3 días, pueden beber una solución de etanol al 15% durante 2 h en la fase oscura del día. El cuarto día, los ratones pueden beber de la solución con etanol durante 4 h como indica el esquema (Figura 30 A) (Thiele et al., 2014). Luego de dos semanas de la inyección del virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple, los animales se sometieron primero a la prueba de consumo de agua por 2 horas en oscuridad como control de la ingesta de líquido (B), en donde se observó que los animales inyectados con el virus control consumen en promedio 17.76 ± 5.36 gramos de agua por kilogramos de peso y los animales con el virus que expresa Caspasa-3 consumen en promedio 14.88 ± 4.14 gramos de agua por kilogramo de peso. Del análisis estadístico no se obtuvieron diferencias significativas, sugiriendo que los animales consumen valores similares de agua, representando un comportamiento de ingesta de líquidos normal ($t(14) = 0.327$; $p = 0.749$, Prueba t no pareada, $n = 9$ virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y $n = 7$ virus control). Al día siguiente, se realizó a la prueba de consumo de etanol, el cual se midió y graficó en gramos de etanol por kilogramo de peso (g/kg) (C). Los animales inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp consumen menos etanol que el grupo control. Esta diferencia se evidenció el primer día en donde en promedio los animales tratados consumieron 1.60 ± 0.39 gramos de etanol por kilogramo de peso mientras que el grupo control consumió en promedio 1.84 ± 0.39 g/Kg. Esta tendencia se mantuvo hasta el 4to día, sin embargo, el consumo de etanol en este último día se incrementó en

ambos grupos exhibiendo valores de 4.27 ± 0.42 g/Kg para el grupo inyectado con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y 5.80 ± 0.34 g/Kg para los animales inyectados con el virus control, implicando una disminución significativa en el consumo de etanol por parte de los animales con ablación neuronal glicinérgica en la IPAG comparados con el consumo del grupo control ($F(1,93)= 7.979$; $p= 0.0069$, Two-way ANOVA RM y Bonferroni post hoc test $**p<0.01$, $n= 9$ virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y $n= 7$ virus control). Como dato global, los animales inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp consumen en promedio 2.27 ± 0.67 g/Kg mientras que los animales inyectados con el virus control consumen en promedio 3.31 ± 0.87 g/Kg.

Finalmente, se midió la concentración de etanol en sangre después del 4to día de consumo para confirmar los datos encontrados en la prueba de DID (D). Se detectaron niveles de consumo de etanol promedio de 105.8 ± 26.3 miligramos de etanol por decilitro de sangre (mg/dL) en los animales inyectados con el virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y valores promedio de 261.8 ± 38.7 mg/dL en los animales inyectados con el virus control. La determinación del BEC en ambos grupos de estudio se correspondió con los datos colectados en el DID y replicaron la disminución significativa evidenciada en el DID ($t(14)= 3.450$; $p= 0.0039$, Prueba t no pareada, $n= 9$ virus AAV-flex-taCasp3-TEVp y $n= 7$ virus control). En resumen, estos resultados, mostraron que la ablación selectiva de las neuronas glicinérgicas que inervan al nAc ejerce un efecto sobre el consumo de etanol. Esto reflejado en un menor consumo de etanol que el grupo control. Esto podría

sugerir que las neuronas glicinérgicas de la IPAG que inervan el nAc podrían participar en la inhibición requerida para generar la respuesta asociada a la recompensa comúnmente generada en respuesta a drogas de abuso como el etanol.

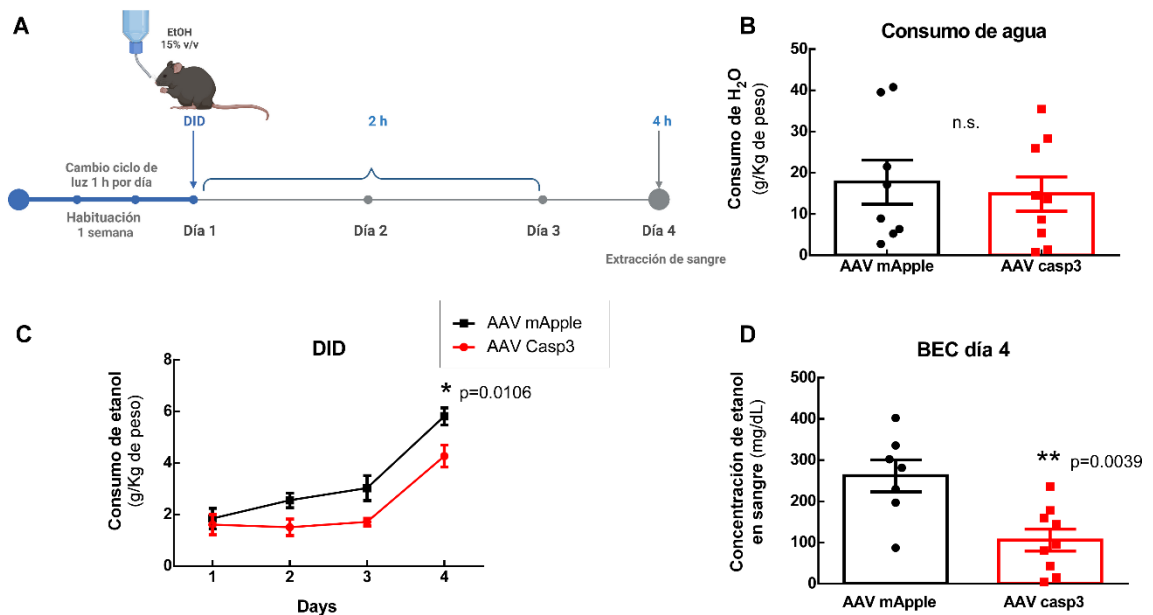


Figura 30. Evaluación del consumo de etanol en animales con ablación glicinérgica en la IPAG mediada por caspasa-3 activa. A. Esquema del experimento de consumo de etanol (DID: Drinking in the Dark). B. Consumo de agua medido durante el día previo al comienzo del DID (g/kg) como control de ingesta de líquido por 2 h en oscuridad. C. Consumo de etanol medido durante el DID (g/kg). Los datos son promedios \pm SEM, ANOVA RM bidireccional y prueba post hoc de Bonferroni. D. Concentración de etanol en sangre (BEC: Blood ethanol concentración) evaluado después del 4to día de consumo (prueba t de Student no pareada, n=9 ratones inyectados con AAV-flex-taCasp3-TEVp y n=7 animales inyectados con AAV-DIO-mApple). Los datos representan promedios \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01.

Las neuronas glicinérgicas no son exclusivas de regiones caudales y la LPAG. Cuando se caracterizó el animal transgénico generado en el laboratorio, el ratón GlyT2Cre: Ai32 (ChR2-EYFP), pudimos evidenciar marcaje EYFP+ en rebanadas que contenían VTA. Para determinar si efectivamente correspondía a esta región cerebral, que juega un rol crucial en la generación de respuestas a estímulos recompensantes y que tiene una estrecha relación funcional y estructural con el nAc, decidimos estudiar la posible presencia de neuronas glicinérgicas en esta región del cerebro medio. Para ello, mediante microscopía confocal, analizamos la expresión de EYFP asociado a ChR2 en rebanadas sagitales de ratones GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP), que contienen mesencéfalo y VTA (Figura 31). En secciones sagitales del área lateral 0.48 mm en el cerebro, se observó una expresión robusta de ChR2/EGFP (amarillo) en el bregma -3.5 mm correspondiente al VTA (A, B). Estas rebanadas se inmunomarcaron además con el anticuerpo anti-Tirosina hidroxilasa (TH, magenta) para marcar las neuronas dopaminérgicas canónicas del VTA (E). Al analizar las microfotografías y el atlas estereotáxico '*Allen Mouse Brain Atlas*', pudimos notar que las neuronas EGFP+ se localizaron en una región particular del VTA, específicamente, en el núcleo parainterfascicular (PIF) del VTA (F, ver esquema del VTA).

De manera interesante, la presencia de neuronas glicinérgicas en el VTA o en la PIF del VTA no ha sido reportado hasta la fecha y podría dar luces de un rol en la neurotransmisión glicinérgica en áreas relacionadas con el consumo de drogas de abuso.

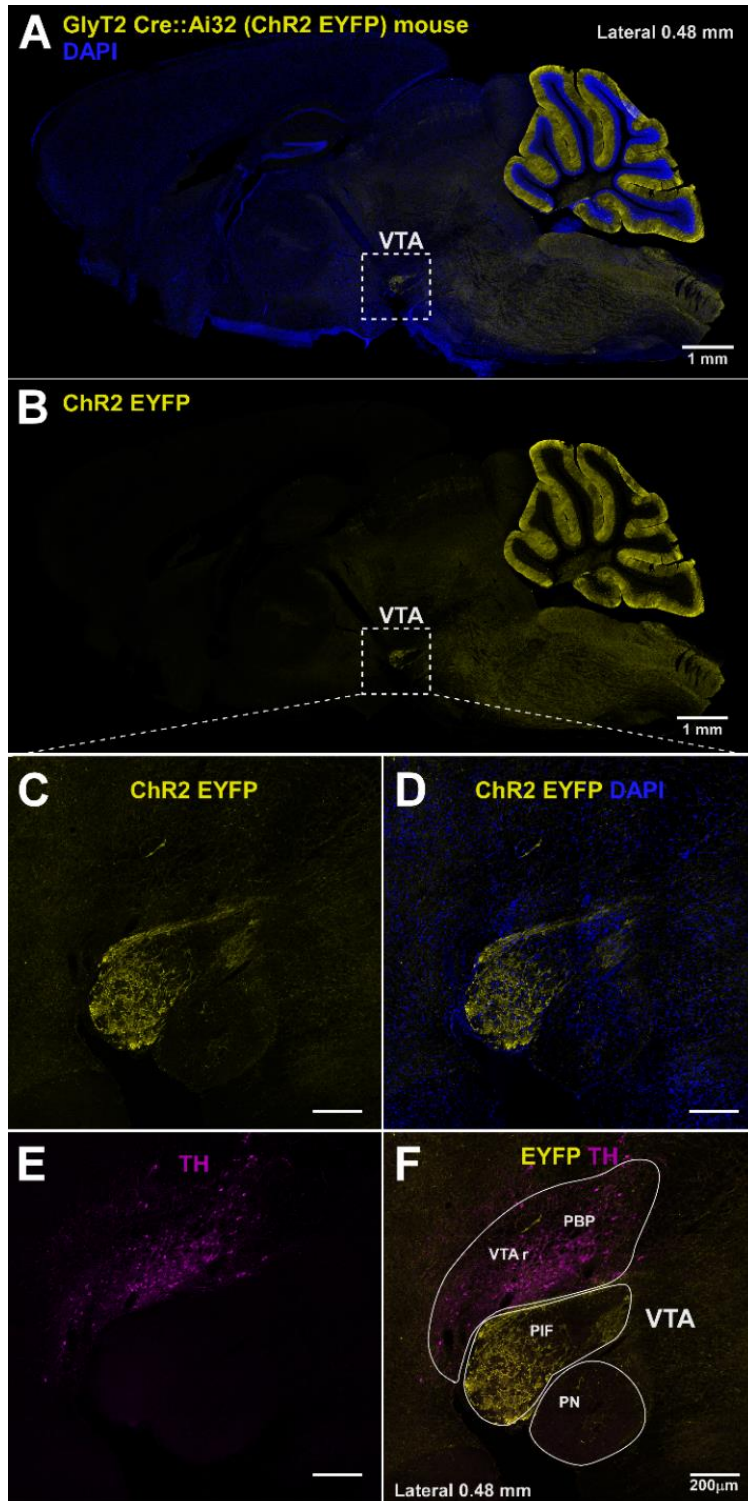


Figura 31. Expresión de ChR2 en neuronas glicinérgicas en núcleo parainterfascicular del VTA. A-B. Corte sagital de ratón GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) del área lateral 0.48 mm inmunomarcado con anticuerpo anti-EYFP (amarillo) y DAPI (azul). C-F. Fotografías ampliadas del VTA inmunomarcadas con EYFP (C), DAPI (D, azul), Tirosina hidroxilasa (TH, magenta) (E) y la sobreposición de los canales con esquema ilustrativo de las regiones del VTA (F). VTA_r: área tegmental ventral rostral; PBP: núcleo parabránquial pigmentado del VTA; PIF: núcleo parainterfascicular del VTA; PN: núcleo paranigral del VTA.

Cuando se analizaron secciones coronales del mesencéfalo el modelo animal GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) (Figura 32, A y B), evidenciamos que ChR2 no sólo se expresaba en la PIF del VTA, sino que además, se expresó, aunque en menor medida, en un área llamada región interpeduncular del mesencéfalo (IPR) (C y D), lo cual está en línea con lo reportado en literatura cuando se estudió la expresión de neuronas glicinérgicas en ratones (Melani et al., 2019) y en el modelo pez Zebra (Barreiro-Iglesias et al., 2013).

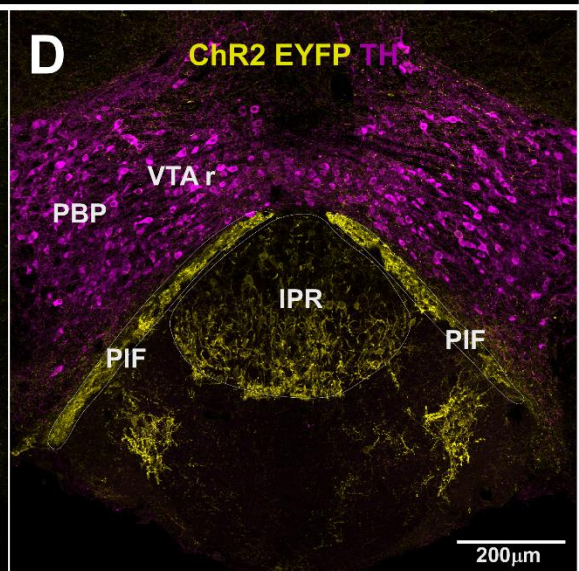
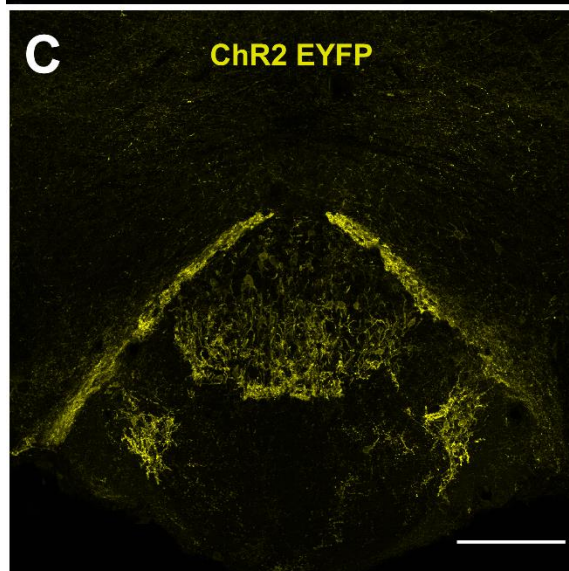
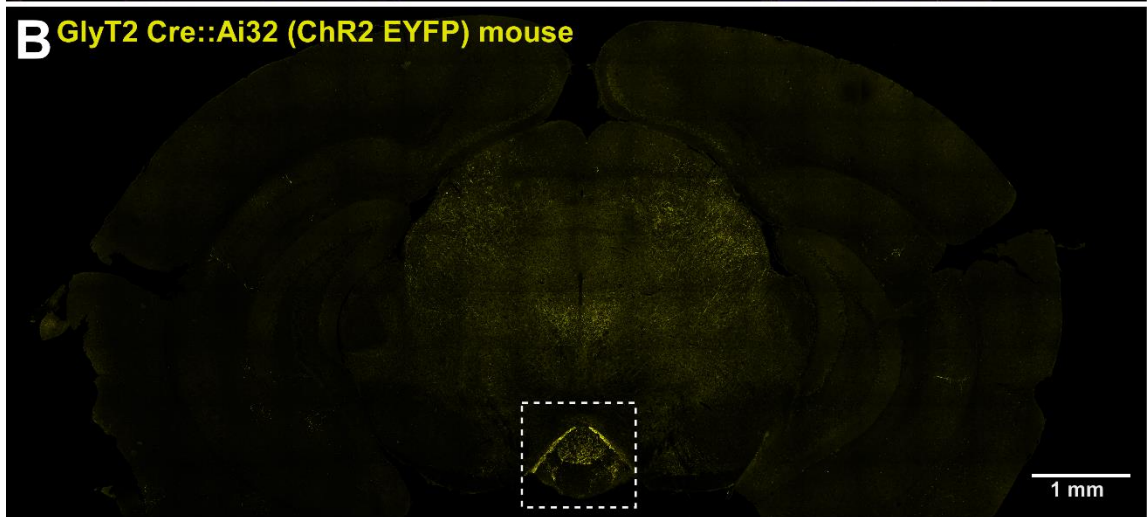


Figura 32. Expresión de ChR2 en neuronas glicinérgicas en núcleo parainterfascicular del VTA. Rebanadas coronales de ratón GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) inmunomarcadas con anticuerpo anti-EYFP (amarillo), Tirosina hidroxilasa (TH) y tinción con DAPI (azul) para marcaje nuclear. Cx: corteza, HC: hipocampo. C y D. Fotografías ampliadas del VTA inmunomarcadas con EYFP (C), y TH (D, magenta). VTAr: área tegmental ventral rostral; PBP: núcleo parabránqueal pigmentado; PIF: núcleo parainterfascicular del VTA; IPR: región interpeduncular del mesencéfalo.

El análisis adicional de rebanadas coronales del modelo animal GlyT2::EGFP (Figura 33, A y B), nos permitió confirmar la presencia de fibras glicinérgicas dentro del VTA rostral (C y D), además de la presencia de somas glicinérgicos EGFP+ en el PIF, tal como se evidencio en los animales GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP). Estas secciones coronales, además, se inmunomarcaron con el anticuerpo anti-GAD67/1 para analizar en detalle si las neuronas glicinérgicas EGFP+ compartían fenotipo GABAérgico (E); En la vista coronal, en donde se puede discriminar mejor las distintas regiones del VTA (F), se evidenció que las neuronas EGFP+ en el núcleo PIF no muestran marcaje positivo para GAD67, sugiriendo que el núcleo PIF del VTA alberga neuronas inhibitorias exclusivamente glicinérgicas. El área que mostró un marcaje positivo para GAD67 fue la región interpeduncular del mesencéfalo (IPR), la cual igualmente contiene neuronas EGFP+, pero en menor proporción cuando se compara con el núcleo PIF. La IPR se ha descrito por literatura como una región primariamente GABAérgica (Molas et al., 2017; Xu et al., 2023), lo cual apoya nuestros datos.

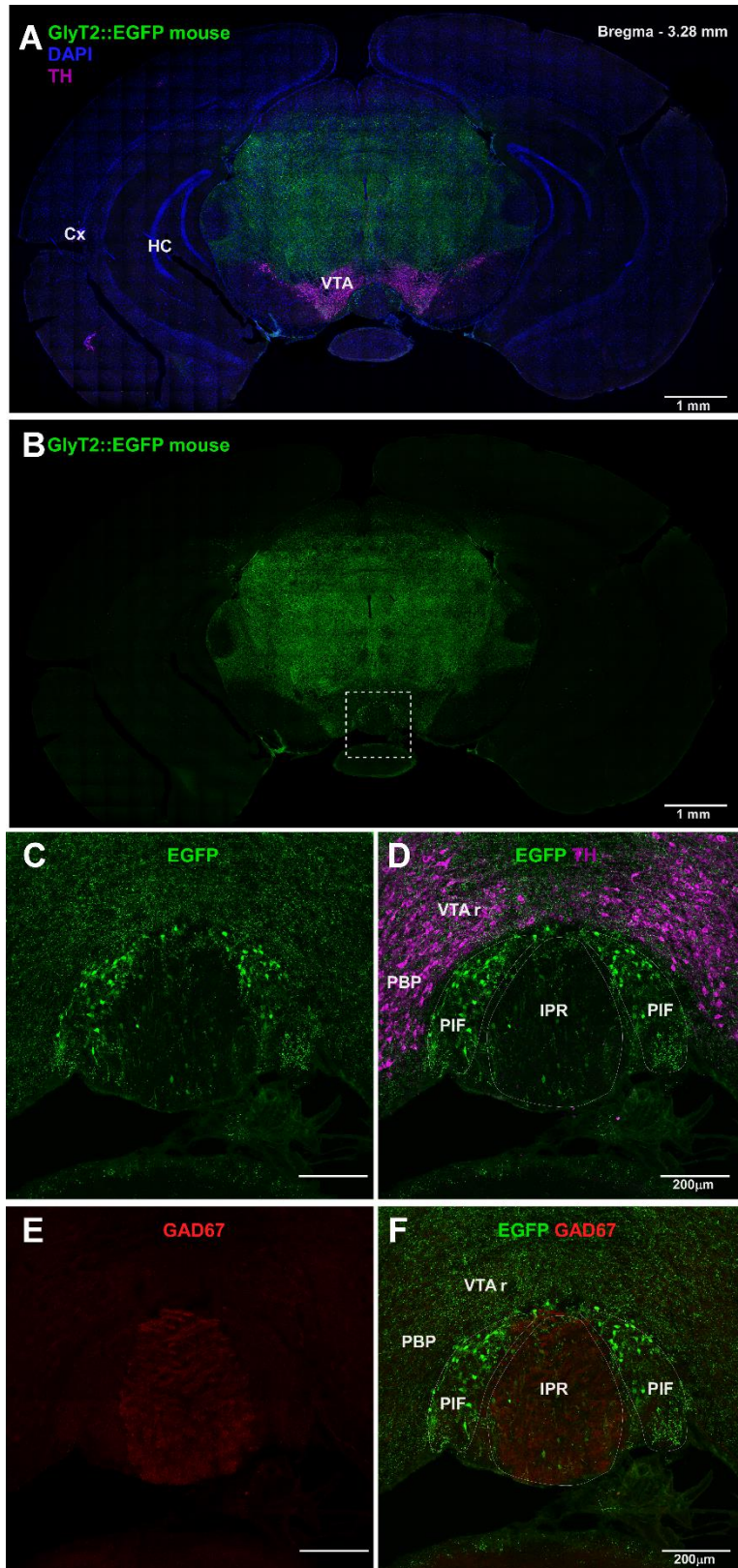


Figura 33. Análisis de la presencia de neuronas glicinérgicas en núcleo parainterfascicular del VTA. A y B. Corte coronal del cerebro del ratón GlyT2::EGFP, inmunomarcada con anti-EGFP (verde) y anti-TH (magenta). DAPI fue usado como tinción nuclear. Cx: corteza, HC: hipocampo. C-D. Magnificación de la microfotografía en B, destacando la localización del VTA y sus componentes (D): VTAr: área tegmental ventral rostral; PBP: núcleo parabránqueal pigmentado; PIF: núcleo parainterfascicular del VTA; y el la IPR: región interpeduncular del mesencéfalo. E. Inmunomarcaje con anti-GAD67. F. Superposición del marcaje con GAD67 y EGFP.

Con la finalidad de corroborar la naturaleza glicinérgica de las neuronas en el VTA, realizamos inyecciones estereotáxicas del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP en animales GlyT2::Cre (ver esquema Figura 34, A), para evidenciar fibras EGFP+ que demostraran la especificidad de la población neuronal glicinérgica (B). Las secciones sagitales se inmunomarcaron con anti-Tirosina hidroxilasa (TH, magenta) para marcar el VTA. De esta forma, pudimos observar fibras neuronales provenientes del VTA en dirección ascendente, lo cual nos permitió corroborar la inervación glicinérgica en esta área del cerebro medio (C). Estas fibras no mostraron inmunoreactividad para TH y se encontraron ubicadas a un costado de las neuronas TH+, en una orientación concordante con el núcleo parainterfascicular (PIF) del VTA, reforzando el hallazgo obtenido en animales GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP). De manera interesante e inesperada, evidenciamos somas neuronales EGFP+ en la región del mesencéfalo IPAG (F-H), la misma área que inerva al nAc según nuestra data.

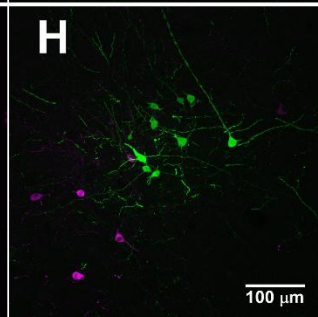
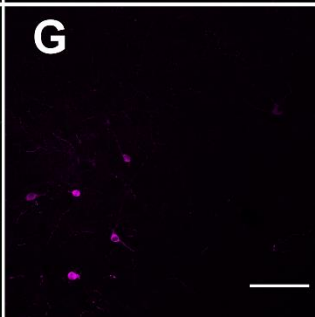
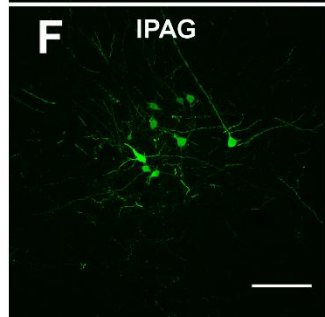
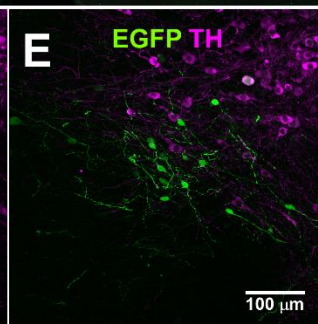
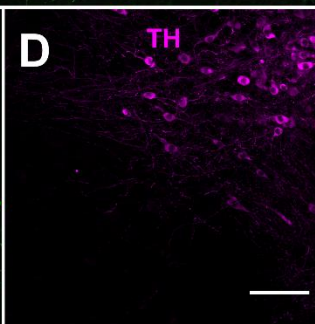
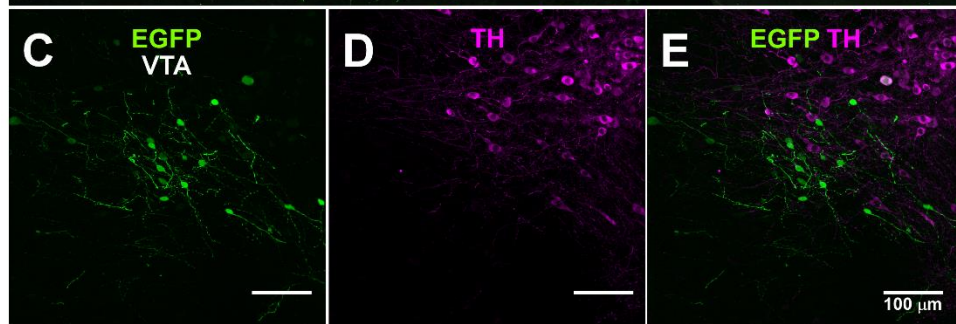
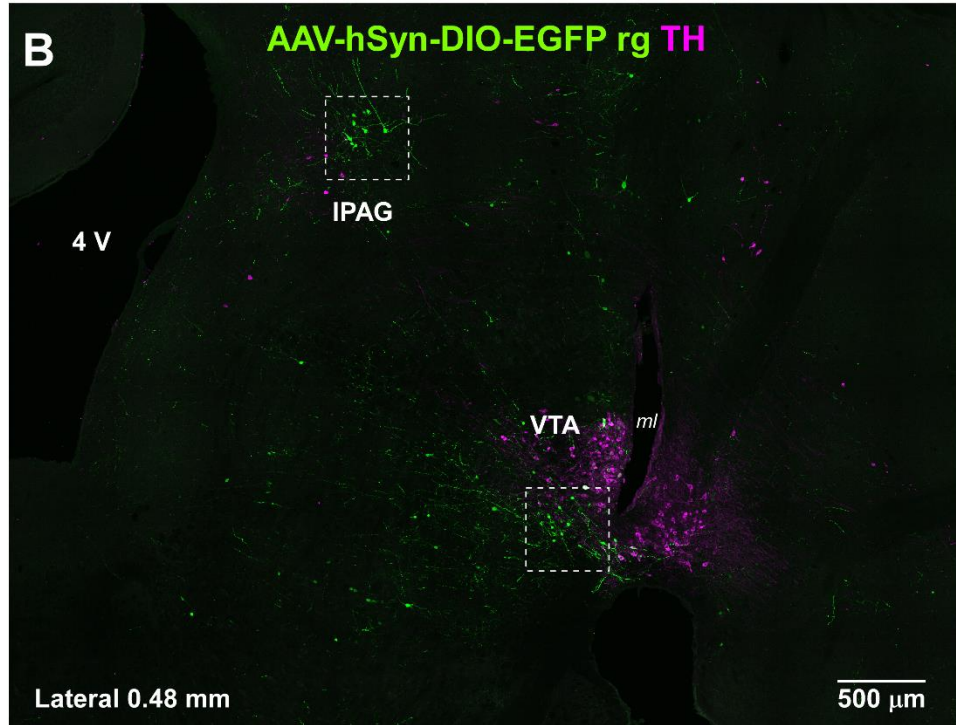
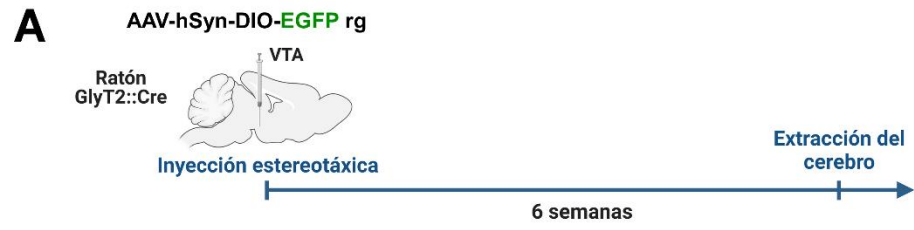


Figura 34. Marcaje retrógrado de redes neuronales glicinérgicas que contactan el VTA. A. Esquema experimental de la inyección del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP en el VTA de ratones GlyT2::Cre. B. Vista global que muestra el sitio de inyección: VTA y sitio en el mesencéfalo: IPAG donde se evidenció marcaje retrógrado asociado a EGFP. Se inmunodetectó con tirosina hidroxilasa (TH, magenta) para corroborar la ubicación de la inyección en el VTA C-E. Fotografía ampliada del VTA. F-H. Fotografías ampliadas de la IPAG.

Ahora para corroborar que la inervación glicinérgica que llega al VTA proviene de la misma región del mesencéfalo, la IPAG, inmunomarcamos las secciones coronales de animales inyectados con el virus retrógrado (EGFP) (Figura 35, ver esquema en A) ahora con tirosina hidroxilasa (TH, magenta) para marcar VTA rostral y además, Triptófano hidroxilasa-2 (TH-2, rojo) un marcador de neuronas serotoninérgicas como marcador de núcleo dorsal del rafe, el cual se encuentra cercano a la sustancia gris periacueductal o IPAG para efectos de orientación. De esta manera, los somas neuronales EGFP+ positivos se evidenciaron sobre el núcleo dorsal de rafe y un poco más anterior; se observaron, además, neuronas TH+ en esta región cerebral (C). En el VTA, de acuerdo a la magnificación de la imagen en B (D), se evidencia con claridad la presencia de fibras glicinérgicas que se proyectan de manera ascendente hacia el mesencéfalo. Estos datos sugieren que esta área del mesencéfalo alberga poblaciones neuronales de diversa naturaleza y entre ellas, poblaciones neuronales de naturaleza glicinérgica que proyectan sus terminales axonales a

regiones mesolímbicas como el VTA y el nAc. Esta comunicación estructural tan estrecha entre estas tres regiones cerebrales la IPAG, nAc y el VTA, podrían dar cuenta de una red neuronal funcional para el flujo de información neuroquímica en procesos de adicción.

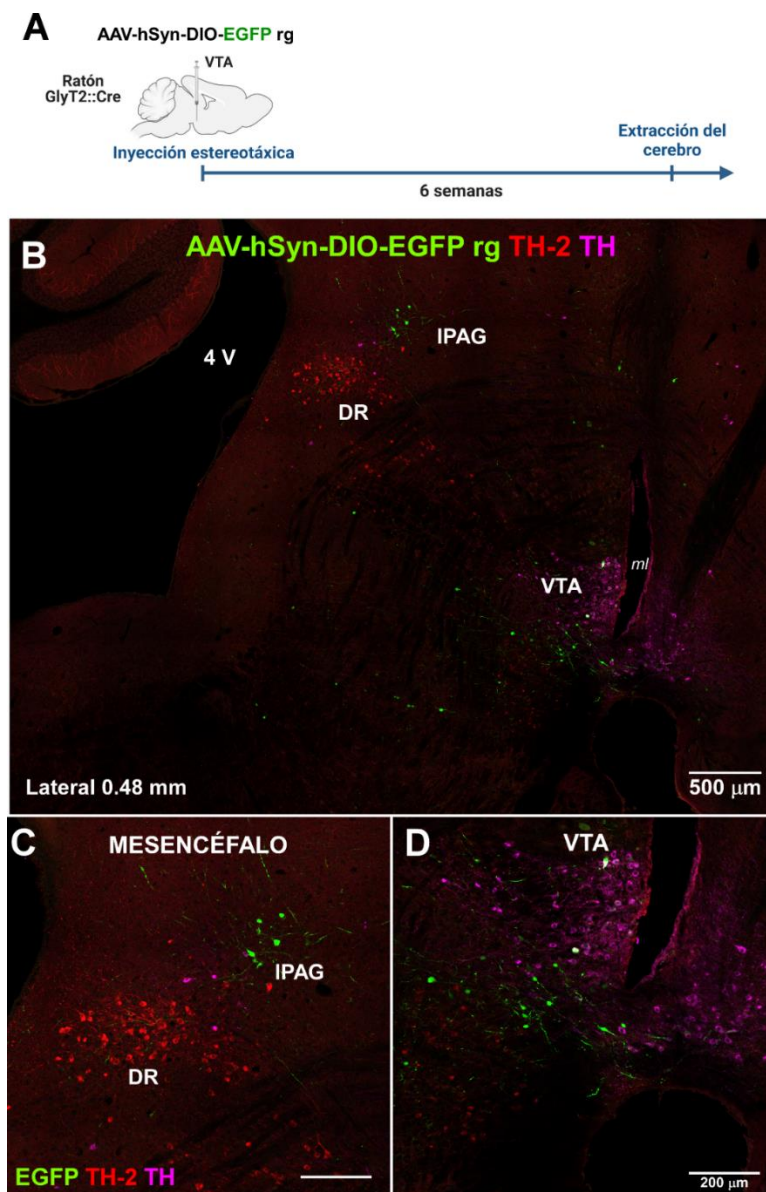


Figura 35. Estudio de la ubicación de neuronas glicinérgicas que contactan el VTA y la IPAG. A. Esquema experimental de la inyección del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP en el VTA de ratones GlyT2::Cre. B. Sección sagital donde se evidencia el sitio de inyección con el virus (EGFP): VTA y la IPAG, inmunomarcada con tirosina hidroxilasa (TH, magenta), triptófano hidroxilasa-2 (TH-2). C. Fotografía ampliada del mesencéfalo denotando la variedad de poblaciones neuronales en esta región cerebral y su ubicación para referencias de ubicación de las neuronas que se proyectan al VTA D. Fotografía ampliada del VTA.

DISCUSIÓN

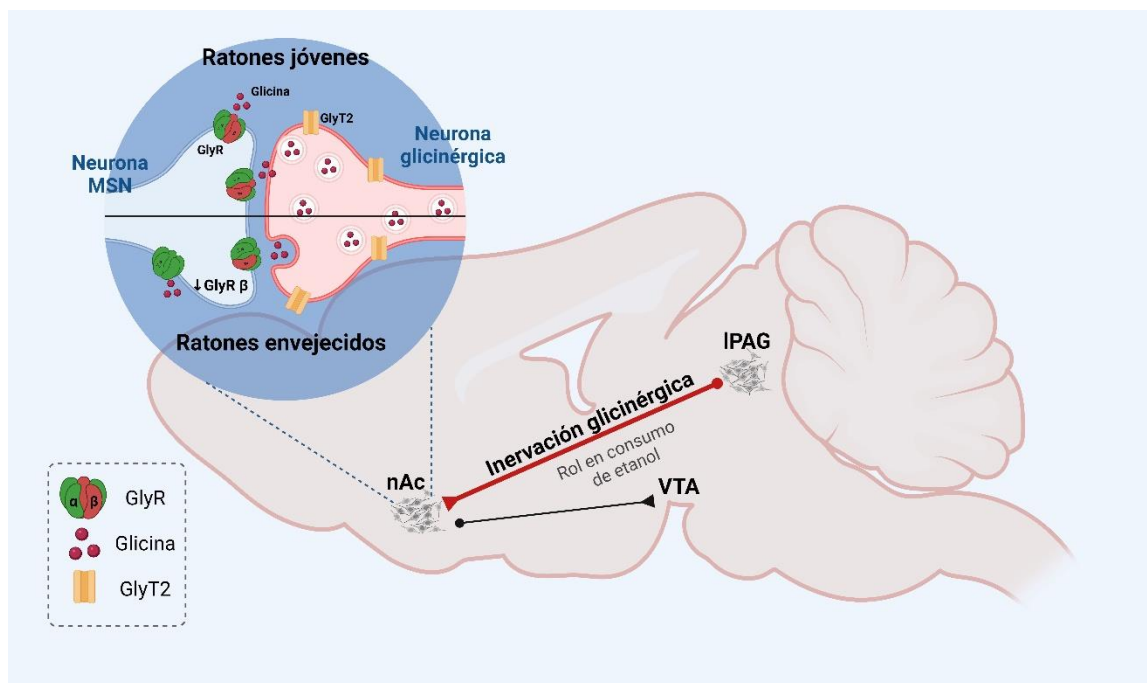
El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar cómo el componente glicinérgico en el nAc, que juega un rol clave en el balance inhibitorio accumbal, es afectado por el envejecimiento. En este sentido, esta investigación dio cuenta de que la expresión de las subunidades de los GlyRs es en efecto, susceptible al envejecimiento en el nAc. Además, por primera vez, informamos de la existencia de nuevas proyecciones glicinérgicas de largo alcance que conectan la IPAG con el nAc, las cuales parecieran ser claves para el consumo de etanol (ver esquema 3).

De manera simplificada, aquí enumeramos los principales hallazgos realizados en el marco de esta tesis:

1. La expresión proteica de la subunidad β del GlyR disminuye durante el envejecimiento.
2. Las transcripciones de la subunidad $\alpha 2$ del GlyR predominan en el nAc durante todo el ciclo vital.
3. El ARNm del GlyR $\alpha 2$ y $\alpha 3$ disminuye en el envejecimiento.
4. En el nAc, la expresión de GlyT2 no se altera con envejecimiento.
5. Los componentes GABAérgicos GABA A $\alpha 1$, VGAT y GAD1/67 en el nAc no se alteran con el envejecimiento.
6. La IPAG provee inervación glicinérgica al nAc, la cual se mantiene estable en el envejecimiento a nivel estructural.

7. En los ratones GlyT2::EGP se demostró la presencia de neuronas glicinérgicas en el IPAG y fibras en nAc.
8. La ablación glicinérgica en el IPAG indujo una disminución en el consumo de etanol.
9. La inyección de virus retrógrados en el VTA sugirió que esta área recibe innervación glicinérgica desde la IPAG similar al nAc.

A continuación, se discuten los hallazgos más relevantes en este trabajo de tesis.



Esquema 3. Resumen gráfico. Se esquematizan los principales hallazgos de esta tesis que incluyen el reporte de la innervación glicinérgica accumbal proveniente de la IPAG. Así como la disminución de la subunidad β de los GlyR en las neuronas MSN accumbales durante el envejecimiento. IPAG: sustancia gris periacudectal; nAc: núcleo Accumbens; GlyR: receptor de glicina; GlyT2: transportador de glicina 2.

1. Alteraciones en la expresión temporal del GlyR en el nAc durante el envejecimiento

El estudio de la expresión temporal del GlyR en el nAc nos permitió demostrar por primera vez que estos receptores se expresan aún en etapas tardías en el nAc, ya que los estudios publicados hasta la fecha fueron realizados en animales de edades no mayores a dos meses de edad, lo cual es considerado, en modelos murinos, animales en adolescencia tardía (Ver esquema 1) (Spear, 2016; Spear and Silveri, 2016).

La detección del GlyR con el anticuerpo pan- α -GlyR en lisados de proteínas de nAc mostró una disminución significativa en los animales de 18 meses comparados con los de 6 meses. Cabe destacar la presencia de una doble banda asociada a pan α -GlyR, de un par de ~ 3 kDa, la cual podría deberse a las distintas modificaciones postraduccionales del GlyR. En concreto, se reconoce que las subunidades del GlyR contienen secuencias consenso para glicosilación (Griffon et al., 1999; Schaefer et al., 2018) y sitios de fosforilación por proteínas quinasas A, y C dependientes de Ca^{2+} (Han et al., 2013a; Nishizaki and Ikeuchi, 1995). En este sentido se ha reportado que las N-glicosilaciones como las que presenta el GlyR, son capaces de modificar la migración electroforética de las proteínas, propiciando la aparición de una doble banda de usualmente menor peso molecular a lo esperado debido al aumento de la tasa de migración al reducir la masa y el arrastre por fricción (Unal et al., 2008). Este efecto es el que

se observa en el *Western blot* para el pan- α -GlyR y se ha observado también en el transportador de glicina tipo 1 (GlyT1) (Olivares et al., 1997).

De manera interesante, encontramos que la subunidad β del GlyR experimentó una disminución en los niveles de GlyR β en animales de 12 y 18 meses. La subunidad β es la subunidad que permite al receptor anclarse a la sinapsis (Maric et al., 2011), por lo que la disminución en la expresión de ésta podría reflejarse en un menor número de receptores sinápticos en la membrana de las MSNs accumbales y por ende ser menos susceptibles a la inhibición neuronal mediada por la glicina fásica. Estos resultados están en línea con los datos electrofisiológicos obtenidos por nuestro laboratorio en donde se muestra que las neuronas accumbales de animales de 12 meses presentan menos eventos glicinérgicos que animales de 2 meses. Estos hallazgos no han sido hasta hoy reportados (ver tabla 6).

Alteraciones electrofisiológicas de la actividad glicinérgica en MSNs del nAc en ratones respecto a animales de 2 meses		
	6 meses	12 meses
Neuronas con eventos sinápticos glicinérgicos	↓	↓↓↓
Frecuencia (% normalizado a la frecuencia total de eventos)	↓	↓↓↓
Amplitud de los eventos	=	=
Neuronas con corrientes evocadas de glicina	↓	↓↓↓
Densidad de corriente de glicina	↓	↓↓↓*
EC₅₀ de glicina	↑#	↑↑↑***
Potenciación de los GlyR con 100 mM etanol	↓	↓↓↓*

Tabla 6. Alteraciones electrofisiológicas de la actividad glicinérgica en MSNs del nAc en ratones. Datos no publicados del laboratorio obtenidos mediante la técnica de patch-clamp en neuronas accumbales de ratones de 2, 6 y 12 meses. Las flechas indican aumento o disminución comparado con animales de 2 meses. En los análisis estadísticos, el * muestra significancia de 2 versus 12 meses; # muestra significancia entre 6 y 12 meses.

2. Estudio de la expresión génica de las subunidades durante el envejecimiento

La evaluación de la expresión absoluta del nivel de ARNm de las subunidades α 1-3 mediante qRT-PCR nos permitió determinar que la subunidad α 2 es la subunidad que predomina en el nAc y esta expresión predominante se mantiene en todas las edades evaluadas. Estos resultados están en línea con la literatura

disponible en donde se realizó el mismo análisis de expresión, pero en ratas de dos meses. Aquí también se determinó que la subunidad $\alpha 2$ era la subunidad predominante en el nAc apoyando nuestros resultados (Jonsson et al., 2012).

En línea con nuestros hallazgos, un reporte previo indicó que los análisis de expresión por PCR cuantitativa realizados a partir de nAc de ratones, muestran una robusta expresión del gen de la subunidad $\alpha 2$ y una discreta expresión del gen de la subunidad $\alpha 3$, lo cual está completamente en línea con nuestros resultados (Forstera et al., 2017). En este reporte se evaluó también la expresión del gen asociado a la subunidad $\alpha 1$, sin embargo, la presencia de dos bandas como producto de PCR en el gel que se reportó, no nos permitió realizar una comparación entre nuestros resultados, los cuales se realizaron usando reacciones con un único producto de PCR.

De los análisis de expresión relativa de ARNm en este trabajo, se extrajo que la subunidad $\alpha 2$ disminuyó significativamente en el nAc de ratones de 6 y 12 meses, sin embargo, a los 18 meses la disminución no alcanzó a tener significancia estadística. Sumado a esto, la expresión del ARNm para la subunidad $\alpha 3$ disminuyó de manera significativa en animales de 6, 12 y 18 meses. La disminución de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en el nAc de animales envejecidos, sumado a la disminución de la subunidad β podrían implicar a un cambio en la composición del GlyR y/o disminuir la funcionalidad del receptor a nivel de respuesta fásica. Es decir, si existe una menor presencia de receptores

heteroméricos en las neuronas accumbales, podría traducirse en una respuesta postsináptica disminuida durante el arribo de glicina fásica al nAc. Esto podría explicar la disminución en el número de neuronas MSNs que presentan eventos glicinérgicos en animales de edad avanzada según los datos publicados del laboratorio. En el caso de los receptores homoméricos, la disminución de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$, podrían representar un cambio en el control inhibitorio en las corrientes tónicas mediadas por el GlyR, sin embargo, esta premisa no ha sido abordada hasta ahora.

A nivel funcional, se reconoce que las subunidades del GlyR son susceptibles a modulaciones alostéricas las cuales pueden llevar a un cambio en la funcionalidad del receptor (Farley and Mihic, 2015; Munoz et al., 2021). Además, se sabe que el etanol es un modulador alostérico clave en los GlyRs (Mascia et al., 1996; Yevenes et al., 2010) y se ha reportado que los ratones $Gla3^{-/-}$ muestran una mayor preferencia por el etanol en un modelo de elección de dos botellas (Blednov et al., 2015). De manera interesante, el gen $Gla3$ se ha relacionado genéticamente con el alcoholismo en humanos (Han et al., 2013b). En línea con esto, datos recientemente obtenidos en nuestro laboratorio, muestran que los ratones envejecidos (12 meses) consumen menos etanol que los animales de 6 meses (datos no publicados). Tomados en conjuntos, estos resultados están en línea con nuestro hallazgo que sugiere una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 3$ en el nAc de animales envejecidos, el cual podría explicar los cambios a nivel funcional como por ejemplo el consumo de etanol

que se mencionó anteriormente. Sin embargo, también pudiese deberse a la disminución de la subunidad β .

Estas diferencias de expresión de las subunidades que componen al GlyR, sugieren que este receptor podría estar cambiando su composición y probablemente su función en el nAc con relación a la edad.

Es necesario destacar, que la expresión del gen de la subunidad β (Glr β) en el nAc, no se cuantificó debido a no fue posible obtener una banda única en el producto de PCR, requisito obligado para una correcta cuantificación por qPCR. Esta dificultad en el diseño de partidores adecuados se debió a la amplia variedad de empalmes (*splicing* en inglés) alternativos que derivan del gen Glr β en el nAc dando origen a más de una isoforma, lo cual no ha sido reportado previamente. Además, la búsqueda en la base de datos NCBI (Gene ID: 14658) apoya la existencia de más de 9 isoformas de la subunidad β en el cerebro de ratón; lo cual está en línea con la obtención de más de un producto de PCR obtenidos al realizar la amplificación para la subunidad β en el nAc. Por lo tanto, no podemos ahondar más en ese aspecto.

3. Presencia de aferencias glicinérgicas que llegan hasta el nAc

El nAc recibe inervación de diversas áreas del cerebro como se describió previamente. En cuanto a la naturaleza de estas inervaciones, se reconoce que al nAc llega inervación dopaminérgica y GABAérgica proveniente del VTA

(Aransay et al., 2015; Han et al., 2017; Van Bockstaele and Pickel, 1995),
inervación glutamatérgica proveniente de la corteza prefrontal, el VTA y el
hipocampo (Kelley and Domesick, 1982; Montaron et al., 1996; Qi et al., 2016),
etc. **De manera interesante nuestro grupo reportó, además, la presencia de
neurotransmisión glicinérgica fásica en el nAc** (Munoz et al., 2018), no
obstante, aún se desconoce el área cerebral que inerva y provee al nAc de
neurotransmisión inhibitoria mediada por glicina. Bajo este contexto, nosotros
decidimos investigar el origen de la inervación glicinérgica que llega al nAc
usando herramientas que permiten el trazamiento retrógrado de redes
neuronales. La visualización de las rebanadas cerebrales de animales inyectados
con la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B) asociada a un fluoróforo, un
trazador retrógrado monosináptico, en el nAc de ratones, nos permitió evidenciar
señal retrograda en áreas canónicas que inervan al nAc como el área tegmental
ventral tal como se reporta en literatura (Van Bockstaele and Pickel, 1995; Yu et
al., 2019). Lo nuevo que pudimos visualizar, fue la señal retrógrada encontrada
en una región del mesencéfalo cercana al acueducto y al 4to ventrículo. Estos
datos están en línea con un estudio publicado en el transcurso de esta tesis en
donde, usando la misma metodología (animales WT e inyecciones de CT-B en el
nAc), evidenciaron inervación proveniente de diversas áreas entre ellas las áreas
olfatorias y el mesencéfalo (Ma et al., 2020). Si bien CT-B es un marcador
retrógrado útil, este no permite la diferenciación entre tipos neuronales
(GABAérgicas, Dopaminérgicas, etc.), ya que se une al receptor de superficie

celular del gangliósido GM1 presente en neuronas en general (Ericson and Blomqvist, 1988). Entonces para conocer las inervaciones específicamente glicinérgicas que recibe el nAc, usamos un enfoque el cual incluyó la expresión de un virus retrógrado dependiente de la recombinasa Cre (AAV-hSyn-DIO-EGFP) en el nAc de ratones GlyT2::Cre. El uso de este animal transgénico nos permitió la expresión del virus exclusivamente en neuronas glicinérgicas; de esta forma pudimos determinar que las células marcadas retrógradamente en el mesencéfalo eran, en efecto, neuronas glicinérgicas. Si bien la cuantificación neuronal en esta región mostró valores pequeños, estos sugieren una inervación discreta pero conservada en el mesencéfalo.

4. El nAc recibe inervación glicinérgica de la IPAG

Dada la gran diversidad de núcleos que componen al mesencéfalo, fue de real importancia explorar la región específica del mesencéfalo que inerva al nAc. El uso de marcadores retrógrados y el estudio del atlas de coordenadas de ratón '*The Allen Mouse Brain Atlas*', nos permitió determinar que la región en donde evidenciamos marcaje retrógrado al inyectar en el nAc era la región de la sustancia gris periacueductal lateral (IPAG). La IPAG participa en el procesamiento de señales nociceptivas, comportamientos defensivos y de estrés, respuestas gratificantes a los opiáceos y al alcohol (Bandler and Shipley, 1994; Behbehani, 1995; Brandao, 1993; Carrive, 1993; Heinz et al., 2011; Jia et al., 2012; Lovick, 1993a; b; McBride et al., 1999). De manera interesante, se ha

demostrado la expresión de GlyT2 en la PAG y específicamente en el área lateral o IPAG (Bandler and Keay, 1996). En línea con nuestros resultados, se ha reportado la inervación proveniente de la PAG hasta al nAc. Por ejemplo, Ma y colaboradores, a través del marcaje con CT-B en el nAc, encontró inervación de naturaleza desconocida proveniente de al menos nueve nuevas áreas cerebrales, entre las cuales se evidencio el mesencéfalo (Ma et al., 2020).

Hasta ahora, se ha reportado que la PAG proporciona entradas glutamatérgicas al VTA (Geisler et al., 2007), entradas dopaminérgicas a la amígdala y el nAc (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002) y transmisión serotoninérgica al nAc (Li et al., 1989) (ver esquema 2). Dando cuenta de una estrecha comunicación entre estas regiones mesolímbicas. Dado que el IPAG recibe una variedad de entradas sensoriales de la periferia y es un componente clave en muchos comportamientos defensivos y aversivos (Behbehani, 1995), la inervación glicinérgica descrita aquí puede contribuir al control de la activación de nAc por entradas sensoriales y su potencial rol en comportamientos motivacionales, recompensantes o aversivos. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren un nuevo rol de la inhibición glicinérgica en las regiones supraespinales del SNC.

A continuación, la naturaleza inhibitoria exclusivamente glicinérgica de las neuronas detectadas en la IPAG, fue corroborada con la inmunotinción con el marcador clásico de neuronas GABAérgicas, la enzima glutamato descarboxilasa 1 (GAD 1/67) que cataliza la síntesis de GABA, la cual no mostro colocalización

con las neuronas EGFP+ sugiriendo que las neuronas EGFP+ del mesencéfalo expresan exclusivamente glicina como neurotransmisor inhibitorio y no un fenotipo mixto.

Adicionalmente, la naturaleza glicinérgica de estas neuronas, fue verificada usando la cepa transgénica GlyT2::EGFP, la cual nos permitió identificar las neuronas glicinérgicas en el cerebro sin uso adicional de virus o cruces. En estos animales, pudimos evidenciar que efectivamente existe un núcleo de neuronas glicinérgicas/EGFP+ en la IPAG, demostrando por una tercera aproximación experimental, la presencia de este núcleo neuronal de naturaleza glicinérgica, GlyT2+, en el mesencéfalo. Sumado a esto, la generación de la cepa transgénica GlyT2 Cre::Ai32 (ChR2-EYFP) también nos permitió evidenciar este grupo neuronal glicinérgico en la IPAG, validando por tres cepas transgénicas la existencia de un núcleo neuronal glicinérgico en la IPAG.

5. Inervación glicinérgica del mesencéfalo en animales durante el ciclo vital

Una vez determinada el área del mesencéfalo que inerva al nAc, quisimos indagar si el envejecimiento podía afectar la integridad de esta inervación. Esto tomando en consideración que a nivel post-sináptico, el GlyR presentó cambios de expresión en el envejecimiento y cambios en las propiedades electrofisiológicas (según la data no publicada), se quiso estudiar las posibles alteraciones a nivel de pre-sinapsis. En este sentido, la cuantificación del número

de neuronas EGFP+ en el IPAG de ratones GlyT2::Cre de 6, 12 y 18 meses inyectados con el virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP (Figura 20), no mostró diferencias significativas en los grupos de estudio. Este estudio estructural, nos permitió dilucidar que la inervación glicinérgica del mesencéfalo al nAc se conserva durante el envejecimiento.

Tomando en cuenta que la inervación glicinérgica a nivel estructural no mostró alteraciones en animales envejecidos, decidimos indagar si los componentes moleculares que participan en la transmisión glicinérgica accumbal eran susceptible al envejecimiento.

El transportador de glicina de tipo 2 (GlyT2), un transportador presináptico localizado en los terminales axonales glicinérgicos, esencial para la captación de glicina en la terminal presináptica para finalizar la señalización glicinérgica y, además media el posterior llenado de vesículas sinápticas con glicina (Bradaia et al., 2004). En este sentido, se ha reportado la presencia de GlyT2 en el nAc y más aún, en línea con nuestra data, se han visualizado fibras GlyT2+ en el nAc (Forstera et al., 2017; Zeilhofer et al., 2005), por lo que nos pareció apropiado estudiar si su expresión se altera en el envejecimiento.

La disminución en la expresión de este transportador podría implicar una pérdida de neurotransmisión glicinérgica funcional en el nAc, la cual podría explicar la disminución de corrientes glicinérgicas registradas en rebanadas cerebrales de ratones de 12 meses (antecedentes del laboratorio). El análisis de la expresión

de GlyT2 en el nAc no mostro diferencias significativas entre los grupos de estudio, sugiriendo que la expresión proteica de este transportador no se altera con la edad. Estos resultados, están en línea con el estudio estructural que sugiere que la inervación glicinérgica no se altera con la edad. Hasta hoy no se había evaluado la expresión de este transportador en el nAc en el contexto del envejecimiento no patológico, por lo que estos resultados son la primera evidencia que sugiere una preservación en la expresión del transportador neuronal GlyT2 en el nAc durante el envejecimiento. De manera interesante, cuando fuimos a evaluar la expresión del ARNm de este transportador para descartar alteraciones a nivel de expresión génica, no evidenciamos amplificación del gen para GlyT2 en el nAc. Si bien se reconoce la expresión de este transportador en el nAc, la data sugiere que el ARNm para GlyT2 estaría expresándose en el soma de las neuronas glicinérgicas (en este caso en particular, en la IPAG), mientras que el transportador ya sintetizado se localizaría en los terminales presinápticos que llegan al nAc; en ese sentido la literatura está en línea con estos datos ya que se ha demostrado que GlyT2 se encuentra en botones sinápticos glicinérgicos (Spike et al., 1997), dando cuenta la localización polarizada del transportador. Esto, sumada a la larga distancia del soma de las neuronas glicinérgicas y sus terminales axonales, es posible inferir que los ARNm nacientes se traducirán en las vecindades del núcleo celular y por ende el soma de las neuronas glicinérgicas el cual está ubicado a más de 4 mm de distancia que sus proyecciones en el cerebro de ratón.

En cuanto a los niveles de glicina en el nAc en animales envejecidos, no existen reportes en donde se evalúe el efecto del envejecimiento en los niveles de glicina accumbal. Nosotros, usando el anticuerpo sintético que reconoce glicina y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia, no evidenciamos diferencias significativas en los niveles de fluorescencia asociada a glicina en el nAc de animales de 6, 12 y 18 meses, sugiriendo que la glicina en el nAc no sería un componente que se altere con el envejecimiento. Si bien este enfoque es sencillo, este resultado da el primer reporte acerca de los niveles de glicina en el nAc envejecido. Sin embargo, se hace necesario realizar mediciones de alta precisión en el nAc para estudiar los efectos del envejecimiento en los niveles de este neurotransmisor inhibitorio indispensable para mantener el balance inhibitorio-excitatorio en el nAc y el SNC.

6. Expresión de componentes GABAérgicos en el nAc durante el ciclo vital

Debido a que no evidenciamos alteraciones relacionadas al envejecimiento en los componentes glicinérgicos como los niveles de glicina, la expresión de GlyT2 y la innervación glicinérgica, evaluamos la expresión de componentes del sistema GABAérgico, los cuales podrían contribuir a la disminución en la transmisión inhibitoria observada en el nAc según la data no publicada de nuestro grupo. Si bien, nosotros no evidenciamos alteraciones en la transmisión inhibitoria en el nAc relacionadas con la edad, quisimos corroborar que los componentes moleculares de dicha transmisión no estaba siendo afectados, y además como

el sistema glicinérgico y GABAérgico comparten ciertas proteínas como el transportador de aminoácidos inhibidores vesiculares (VIAAT o VGAT), quisimos evaluar si el envejecimiento alteraba su expresión en el nAc y en efecto alterar también la transmisión glicinérgica ya que VGAT se encarga de la captación de GABA y glicina en vesículas sinápticas (Bormann, 2000). En este contexto, los niveles proteicos de VGAT en el nAc no mostraron diferencias en los grupos de estudio. La alteración de la expresión de la enzima Ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD1/67) o la subunidad $\alpha 1$ del receptor de GABA (GABA-A $\alpha 1$) en el nAc de animales envejecidos, podrían dar cuenta de una alteración en la síntesis de GABA o una disminución en la neurotransmisión GABAérgica mediada por receptor respectivamente. Sin embargo, al efectuar las cuantificaciones densitométrica de los niveles de estas proteínas en el nAc de animales a 6, 12 y 18 meses, tampoco vimos diferencias significativas. Estos datos apoyan los antecedentes electrofisiológicos no publicados de nuestro laboratorio y están en línea con el reporte en donde se ha evidenciado que los niveles de GABA en el nAc no muestran diferencias significativas de ratas jóvenes y envejecidas (Segovia and Mora, 2005). La expresión estable y conservada en el tiempo de los distintos componentes GABAérgicos, sugieren que este sistema inhibitorio no se vería afectado en el nAc durante el envejecimiento (Konar-Nie et al., 2022).

7. Activación selectiva de ChR2 en neuronas glicinérgicas en la IPAG y el nAc

El uso de ratones transgénicos GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP) nos permitió expresar el canalrodopsina-2 en las neuronas glicinérgicas de manera estable y endógena. La expresión de ChR2 en este modelo se caracterizó por exhibir un patrón de membrana, esperado para un canal con dominios transmembrana (Nagel et al., 2003; Terakita, 2005). Este es el primer reporte donde se muestra la generación de un animal que expresa el ChR2 en neuronas glicinérgicas de manera endógena, dando origen a una nueva herramienta útil para el estudio del sistema glicinérgico en el SNC.

En este modelo logramos evidenciar la expresión de ChR2 en neuronas en la IPAG del mesencéfalo. La estimulación por luz de las neuronas de la IPAG, donde se evidenció marcaje con el virus retrógrado, condujo a la generación de corrientes sinápticas, las cuales fueron sensibles a STN, el cual, a bajas concentraciones, se reconoce como un antagonista del GlyR y de los efectos mediados por glicina (Curtis et al., 1971), dando cuenta de la naturaleza glicinérgica y funcionalidad de las neuronas en la IPAG.

La expresión de ChR2 en el nAc mostró ser más discreta que en regiones del cerebro medio o áreas caudales, y se limitó a fibras EYFP⁺, dando cuenta de la presencia de inervación glicinérgica llegando hasta el nAc. La activación por luz de los terminales presinápticos inhibitorios que llegan al nAc dio origen a la

generación de corrientes sinápticas en las MSNs accumbales. Esta activación optogenética en el nAc, sin embargo, se caracterizó por ser de menor amplitud comparada con las corrientes evocadas en el mesencéfalo. Además, la probabilidad de registrar neuronas en el nAc que evocaran corrientes en respuesta a luz fue considerablemente baja, significando una limitación al momento de hacer registros electrofisiológicos; sugiriendo que la innervación glicinérgica en el Accumbens es discreta, lo cual no es inesperado dado el acotado número de neuronas contabilizadas en los estudios inmunohistoquímicos realizados en animales inyectados con el virus retrógrado. A pesar de la discreta respuesta a la activación optogenética, la generación de este animal que expresa ChR2 en neuronas glicinérgicas y la presencia de fibras ChR2+ en el nAc apoyan la presencia de transmisión glicinérgica en el nAc reportada previamente por nuestro grupo (Munoz et al., 2018).

8. Consumo de etanol en animales con ablación neuronal glicinérgica sitio específica en la IPAG

Se reconoce que el nAc participa activamente en la respuesta a estímulos recompensantes como lo es el consumo de etanol (Ferreira et al., 2021; Molander and Soderpalm, 2005). Más específicamente, se ha relacionado la activación de los GlyRs en el nAc con el consumo de etanol, dando cuenta que los GlyRs son un punto de acceso para el etanol al sistema de recompensa (Gallegos et al., 2019; Molander et al., 2007; Molander et al., 2005).

Dado estos antecedentes, indujimos la ablación neuronal glicinérgica sitio específica en la IPAG usando un virus que expresa la pro-caspasa3 en neuronas glicinérgicas para evaluar la funcionalidad de esta inervación. De esta forma, la ablación de las neuronas de la IPAG que liberan glicina a las MSNs del nAc podría inducir un cambio en el consumo de etanol bajo la premisa de que hay una menor entrada glicinérgica inhibitoria fásica al nAc. El etanol es un modulador alostérico positivo de los GlyRs que potencia las corrientes de glicina en las neuronas del nAc (Aguayo et al., 1996). La potenciación de las corrientes de glicina lleva a un aumento en la inhibición de las MSNs accumbales, en pos de un efecto homeostático para impedir la sobre activación del sistema de recompensa en presencia de etanol (Gallegos et al., 2019).

En la prueba de consumo de etanol en la oscuridad (DID: drinking in the dark), realizada luego de dos semanas de la inyección del virus AAV-flex-taCasp3-TEVp o AAV-DIO-mApple, se observó que los animales inyectados a los cuales se les indujo la ablación glicinérgica en el IPAG consumen menos etanol que el grupo control. Esta disminución se hizo significativa al 4to día de la prueba de DID, lo cual se confirmó al momento de evaluar la concentración de etanol en sangre una vez finalizada la prueba de DID. En resumen, estos resultados, mostraron que la ablación selectiva de las neuronas glicinérgicas que inervan al nAc ejerce un efecto sobre el consumo de etanol, sugiriendo que las neuronas glicinérgicas de la IPAG que inervan el nAc podrían participar en la inhibición requerida para generar la respuesta recompensante comúnmente generada en

respuesta a drogas de abuso como el etanol. En este sentido, se plantea que la ablación selectiva significó una menor presencia de glicina sináptica proveniente de la inervación de la IPAG, lo cual estaría alterando el balance activación/inhibición del nAc. Nosotros creemos que, en menor presencia de glicina, el etanol (por sí solo) no es capaz de potenciar suficientemente a los GlyRs para generar la inhibición suficiente que motive al animal a buscar más del estímulo recompensante. Estos datos, son distintos con lo reportado por Molander y colaboradores en donde el aumento de glicina en el nAc mediante la inhibición de la recaptación de glicina tónica (Org 25935: inhibidor de GlyT1, glial) indujo una disminución en la ingesta de etanol y la preferencia de etanol, en comparación con el vehículo (Molander et al., 2007). Sin embargo, dado el importante rol que cumplen los GlyR tónicos en el nAc y en la modulación por etanol (Forstera et al., 2017), no es una condición comparable con la ablación de la inervación glicinérgica fásica discreta que representa la IPAG.

Por otro lado, existen reportes que revelan y apoyan que la PAG (dorsal y lateral) participa en el procesamiento de información relacionada con la recompensa en el consumo alimenticio (Tryon and Mizumori, 2018), específicamente, se reportó que la inactivación farmacológica de la PAG, usando muscimol (agonista de GABAA) mediante infusión intracraneal, condujo a una ingesta de alimentos reducida durante una tarea de memoria de trabajo espacial en ratas. Si bien nuestros resultados no sugieren alteraciones en el consumo de alimentos (basados en el peso corporal), esto podría deberse a que en nuestros

experimentos realizamos la ablación de neuronas de la PAG lateral (IPAG) y que la ablación se dirige a neuronas glicinérgicas. Los autores también reportaron la existencia de variadas respuestas neuronales en la PAG; donde en un subgrupo de neuronas de la PAG, los encuentros de recompensa provocaron excitación fásica, mientras que en otro subgrupo de neuronas que se inhibieron durante los encuentros de recompensa, dando cuenta de la heterogeneidad de poblaciones neuronales en la PAG. Este es el primer reporte que da cuenta de la PAG puede desempeñar un papel en el procesamiento relacionado con la recompensa para regular la ingesta de alimentos.

Desde otra mirada, diversos reportes han sugerido que la IPAG participa en la respuesta de aversión condicionada al gusto, específicamente en la extinción de los miedos condicionados (Blair and Amit, 1981; McNally, 2005; McNally et al., 2005; McNally et al., 2004; Mickley et al., 2013; Mickley et al., 2011). Concretamente, se ha reportado que la estimulación de la sustancia gris periacueductal dorsal lateral promueve la recuperación espontánea de la aversión al gusto condicionada (Mickley et al., 2013). De manera interesante, se ha reportado que el etanol induce aversión condicionada al gusto (Sklar and Amit, 1977). Mas aun, Blair and Amit, décadas atrás, demostraron que la lesión en la PAG de ratas Wistar combinada con la administración de etanol intraperitoneal (inductor de aversión), indujo una disminución significativa del consumo de una solución con sacarina al 0.1% en las ratas con ablación, comparado con las ratas sin ablación (Blair and Amit, 1981).

Estos datos, en conjunto con la data obtenida en esta tesis, podrían sugerir que el sabor del etanol en un principio de la prueba de consumo DID, podría inducir aversión, como sería en un contexto normal, sin embargo, en los días siguientes en donde se vuelve a presentar el etanol, se debería estimular la IPAG para desencadenar el fenómeno de extinción de los miedos condicionados para permitir el consumo del etanol. Cuando se ha lesionado o ablacionado la IPAG, este fenómeno parece no ocurrir u ocurrir en menor medida, lo cual podría explicar el menor consumo de etanol en los ratones que recibieron el virus que media la ablación y el menor consumo de sacarina en las ratas Wistar.

Hasta ahora no existen reportes en donde se haya bloqueado la liberación fásica de glicina en el nAc. Así, los resultados obtenidos en esta tesis podrían plantear un nuevo rol para la glicina sináptica y la IPAG en la modulación del consumo de etanol, sin embargo, se requieren más estudios para determinar el posible rol de la inervación glicinérgica en las respuestas aversivas al etanol.

9. Redes neuronales glicinérgicas que comunican a la IPAG con el sistema mesolímbico

El sistema mesolímbico comprende un conjunto de estructuras cerebrales que se comunican entre sí para mediar respuestas a estímulos recompensantes; el cual a través del balance entre la excitación/inhibición, determinará si se buscará nuevamente la recompensa o se evitará (Bjorklund and Dunnett, 2007; Haber and

Knutson, 2010). En presencia de estímulos recompensantes el nAc recibe inervación dopaminérgica proveniente del VTA (Chen et al., 1996; Han et al., 2017; Rahman and McBride, 2001; Sasa et al., 1991). El accumbens a su vez provee de inervación GABAérgica al VTA (Kalivas et al., 1993; Van Bockstaele and Pickel, 1995), conformando el *loop* mesolímbico que permite la regulación de los niveles de excitabilidad de las neuronas de esta vía (Yang et al., 2018). De manera interesante, cuando se caracterizó el animal transgénico generado en el laboratorio, el ratón GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP), pudimos evidenciar fibras y neuronas que expresaban EYFP bajo el promotor de GlyT2 en el VTA, sugiriendo la presencia de neuronas glicinérgicas en esta área mesolímbica. Concretamente, las neuronas ChR2-EYFP+ se localizaron en una región particular del VTA, específicamente, en el núcleo parainterfascicular (PIF) del VTA, dando cuenta por primera vez de la presencia de neuronas glicinérgicas en el VTA. Más tarde, los análisis inmunohistoquímicos de animales GlyT2::EGFP apoyaron estos resultados. En este sentido, se reconoce que el VTA contiene predominantemente dos tipos neuronales diferentes: neuronas dopaminérgicas (70-80%) y GABAérgicas (20-30%) (Olson and Nestler, 2007), sin embargo la presencia de neuronas que expresaron ChR2/EYFP bajo el promotor condicional de GlyT2, en nuestro modelo animal, sugiere la presencia de neuronas inhibitorias de naturaleza glicinérgica en el VTA. El hallazgo de esta nueva población neuronal glicinérgica en el núcleo parainterfascicular del VTA, está en línea con reportes recientes que sugieren que el VTA es ampliamente

heterogéneo, y alberga neuronas dopaminérgicas, GABAérgicas, colinérgicas, y otras de naturaleza desconocida (Walsh and Han, 2014). Además, dada la estrecha conectividad funcional del nAc y el VTA reportada ampliamente en literatura, la presencia de una población neuronal glicinérgica en el VTA, podría dar luces de un rol en la neurotransmisión glicinérgica en comportamientos relacionados estrechamente con el sistema mesolímbico como la recompensa, motivación y el consumo de drogas de abuso.

Por otro lado la inyección del virus retrógrado AAV-hSyn-DIO-EGFP en el VTA de animales GlyT2::Cre, y su expresión específicamente en el PIF del VTA, nos permitió corroborar la naturaleza glicinérgica de las neuronas en el VTA evidenciada también en los animales GlyT2::Cre Ai32 (ChR2-EYFP). La validación de nuestra data con un segundo enfoque, donde se usó un animal distinto (GlyT2::Cre) y un sistema de expresión ectópica de un trazador dependiente de Cre, nos permite describir con mayor robustez la presencia de neuronas glicinérgicas en el VTA.

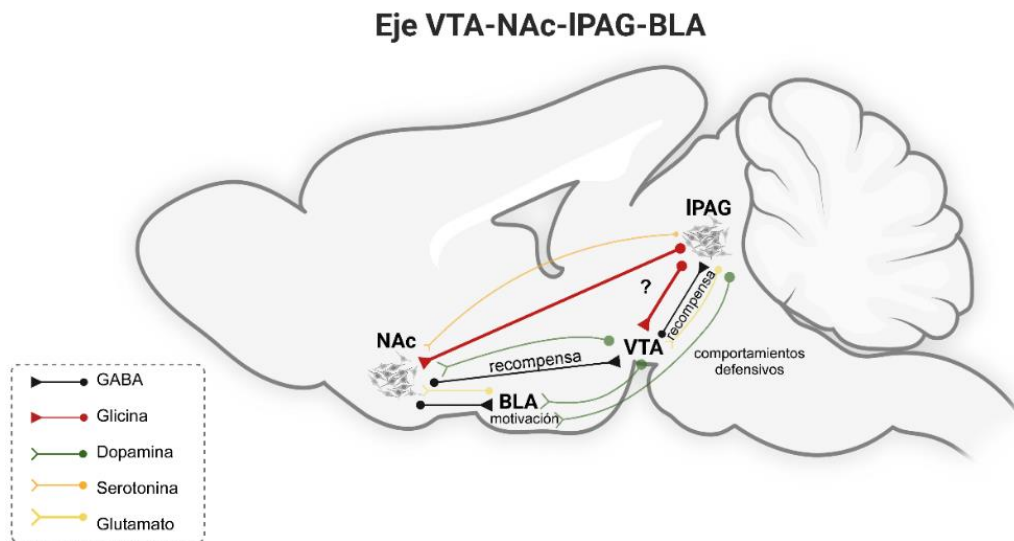
Las fibras y neuronas EGFP+ no fueron exclusivas del VTA. La presencia de somas neuronales EGFP+ en la región del mesencéfalo específicamente la IPAG, fue un hallazgo novedoso. Es decir, una parte de los terminales axonales glicinérgicos presentes en el VTA, provienen de neuronas ubicadas en la IPAG. En este sentido, se reconoce la presencia de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en la IPAG que inervan al VTA (Geisler et al., 2007; Kirouac et al.,

2004), sin embargo, no se ha reportado inervación glicinérgica hacia el VTA por parte de la IPAG.

Resulta interesante que la IPAG provea de entradas glicinérgicas tanto al VTA como al nAc. Además de la inervación glutamatérgica y GABAérgica hacia el VTA anteriormente mencionada, la IPAG inerva al nAc a través de neuronas serotoninérgicas (Li et al., 1989) y provee de dopamina a la amígdala basolateral (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002). El nAc y el VTA se comunican mediante transmisión GABAérgica y dopaminérgica estableciendo la vía mesolímbica canónica (Yang et al., 2018) (Ver esquema 3). Si bien las redes neuronales que aquí se mencionan son complejas de comprender, como se mencionó antes, la estrecha conectividad funcional del nAc y el VTA, y ahora la IPAG proveyendo de inervación glicinérgica a estas regiones, podría dar luces de un rol en la neurotransmisión de naturaleza glicinérgica en comportamientos relacionados con el sistema mesolímbico como la recompensa, motivación y el consumo de drogas de abuso. La comunicación IPAG-VTA-amígdala-nAc podría además dar cuenta de un nuevo *loop* neuronal que responda a comportamientos defensivos y aversivos a estímulos, dado el importante rol en la mediación de respuestas defensivas y evasión que se ha descrito para la IPAG (Carrive, 1993; Kirouac and Pittman, 2000; Lovick, 1993a). Dado que se ha descrito la participación de la IPAG en la mediación de respuestas al consumo de sustancias de abuso como opioides y alcohol (Brandao, 1993; Li et al., 2013), la IPAG podría ser parte del ampliamente estudiado *loop* mesolímbico VTA-nAc activado en respuesta a

consumo de sustancias de abuso dando origen a un nuevo eje IPAG-VTA-amígdala-nAc.

Estos datos en conjunto nos permiten aportar un poco más en la neurobiología del sistema límbico. Sin embargo, se requieren estudios conductuales de mayor complejidad que nos permitan estudiar estas conexiones neuronales y su real funcionalidad. Aquí se describen nuevas redes neuronales que se comunican entre sí probablemente para mediar respuestas y conductas integradas y funcionales en el individuo.



Esquema 4. Eje VTA-nAc-IPAG-BLA. El nAc y el VTA se comunican mediante transmisión GABAérgica y dopaminérgica (Yang et al., 2018). La IPAG inerva al nAc a través de neuronas serotoninérgicas (Li et al., 1989), provee de dopamina a la amígdala basolateral (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002) y aporta inervación glutamatérgica y GABAérgica hacia el VTA (Geisler et al., 2007; Kirouac et al., 2004).

CONCLUSIONES

- El envejecimiento tiene un impacto considerable sobre los elementos postsinápticos de la transmisión glicinérgica en el nAc, mientras que los componentes glicinérgicos presinápticos parecen estar menos afectados por el envejecimiento.
- Utilizando una serie de modelos experimentales se confirmó la presencia de una conexión IPAG-nAc de naturaleza glicinérgica.
- La ablación de la vía glicinérgica en la IPAG produjo una disminución en el consumo de alcohol.
- Se identificaron dos regiones glicinérgicas anteriormente desconocidas: la IPAG y el VTA, cuya implicancia fisiológica y conductual son desconocidas.

Finalmente, la data tomada en conjunto nos condujo a confirmar parcialmente nuestra hipótesis conformada por el siguiente enunciado: “El envejecimiento induce cambios en las subunidades presentes en el GlyR, junto a una disminución en la innervación glicinérgica en el nAc”. Particularmente, la primera parte de la hipótesis fue confirmada dado que los estudios moleculares mostraron que los niveles de expresión de las subunidades del GlyR en el nAc se modificaron en función de la edad.

Por otro lado, la segunda parte donde se hipotetiza acerca de la disminución de la innervación glicinérgica fue refutada dado que los experimentos para abordar

este t3pico de la investigaci3n dieron cuenta que los componentes glicin3rgicos presinápticos en el nAc no se alteran con el envejecimiento.

GLOSARIO

AAV: Virus adenoasociado

AAVrg: Virus retrógrado adenoasociado

ac: comisura anterior (del inglés: anterior commissure)

aCSF: líquido céfalo-raquídeo artificial (del inglés: artificial cerebrospinal fluid)

BLA: amígdala basolateral

ChR2: canalrodopsina-2

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DID: Drinking in the dark

EGFP: proteína fluorescente verde mejorada

EYFP: proteína fluorescente amarilla mejorada

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GlyR: receptor de glicina

GlyT1: Transportador de glicina 1

GlyT2: Transportador de glicina 2

HC: hipocampo

IPR: región interpeduncular del mesencéfalo

IPAG: sustancia gris periacueductal lateral (del inglés: lateral periaqueductal gray)

mIPSC: corriente postsináptica inhibitoria en miniatura (del inglés: miniature inhibitory postsynaptic current)

MSN: neurona espinosa mediana (del inglés: medium spiny neurons)

nAc: núcleo accumbens

PBP: núcleo parabránqueal pigmentado

PBS: tampón fosfato salino (del inglés: phosphate buffered saline)

PFA: paraformaldehído

PFC: corteza prefrontal

PIF: parainterfascicular núcleo del VTA

SEM: error estándar de la media (del inglés: standard error of the mean)

STN: estriquina

TH: Tirosina hidroxilasa

TH-2: Triptófano hidroxilasa 2

VGAT: transportador vesicular de GABA (del inglés: vesicular GABA transporter)

VTA: área tegmental ventral

WT: animal silvestre (del inglés: wild type)

BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo LG, Tapia JC and Pancetti FC (1996) Potentiation of the glycine-activated Cl⁻ current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **279**:1116-1122.
- Akiyama G, Ikeda H, Matsuzaki S, Sato M, Moribe S, Koshikawa N and Cools AR (2004) GABA(A) and GABA(B) receptors in the nucleus accumbens shell differentially modulate dopamine and acetylcholine receptor-mediated turning behaviour. *Neuropharmacology* **46**:1082-1088.
- Al-Muhtasib N, Forcelli PA and Vicini S (2018) Differential electrophysiological properties of D1 and D2 spiny projection neurons in the mouse nucleus accumbens core. *Physiol Rep* **6**:e13784.
- Alejandro Borja GP, Alejandro Navarro E, Beatriz GC, Ignacio M and Milagros G (2020) Accumbens and amygdala in taste recognition memory: The role of d1 dopamine receptors. *Neurobiol Learn Mem* **174**:107277.
- Alexander P, Mushtaq F, Osmond C and Amoaku W (2012) Microperimetric changes in neovascular age-related macular degeneration treated with ranibizumab. *Eye (Lond)* **26**:678-683.
- Allin R, Russell V, Lamm M and Taljaard J (1989) Regional distribution of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Res* **501**:389-391.
- Aransay A, Rodriguez-Lopez C, Garcia-Amado M, Clasca F and Prensa L (2015) Long-range projection neurons of the mouse ventral tegmental area: a single-cell axon tracing analysis. *Front Neuroanat* **9**:59.
- Aroeira RI, Ribeiro JA, Sebastiao AM and Valente CA (2011) Age-related changes of glycine receptor at the rat hippocampus: from the embryo to the adult. *J Neurochem* **118**:339-353.
- Avila A, Vidal PM, Dear TN, Harvey RJ, Rigo JM and Nguyen L (2013) Glycine receptor alpha2 subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep* **4**:738-750.
- Avila A, Vidal PM, Tielens S, Morelli G, Laguesse S, Harvey RJ, Rigo JM and Nguyen L (2014) Glycine receptors control the generation of projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cell Death Differ* **21**:1696-1708.
- Baer K, Waldvogel HJ, During MJ, Snell RG, Faull RL and Rees MI (2003) Association of gephyrin and glycine receptors in the human brainstem and spinal cord: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **122**:773-784.
- Baer K, Waldvogel HJ, Faull RL and Rees MI (2009) Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Front Mol Neurosci* **2**:25.
- Bandler R and Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res* **107**:285-300.
- Bandler R and Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* **17**:379-389.
- Barreiro-Iglesias A, Mysiak KS, Adrio F, Rodicio MC, Becker CG, Becker T and Anadon R (2013) Distribution of glycinergic neurons in the brain of glycine transporter-2 transgenic

- Tg(glyt2:Gfp) adult zebrafish: relationship to brain-spinal descending systems. *J Comp Neurol* **521**:389-425.
- Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol* **184**:43-62.
- Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* **46**:575-605.
- Berendse HW and Groenewegen HJ (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol* **299**:187-228.
- Bjorklund A and Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* **30**:194-202.
- Blair R and Amit Z (1981) Morphine conditioned taste aversion reversed by periaqueductal gray lesions. *Pharmacol Biochem Behav* **15**:651-653.
- Blednov YA, Benavidez JM, Black M, Leiter CR, Osterndorff-Kahanek E and Harris RA (2015) Glycine receptors containing alpha2 or alpha3 subunits regulate specific ethanol-mediated behaviors. *J Pharmacol Exp Ther* **353**:181-191.
- Bode A and Lynch JW (2014) The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain* **7**:2.
- Boisgontier MP, van Ruitenbeek P, Leunissen I, Chalavi S, Sunaert S, Levin O and Swinnen SP (2016) Nucleus accumbens and caudate atrophy predicts longer action selection times in young and old adults. *Hum Brain Mapp* **37**:4629-4639.
- Bond CW, Trinko R, Foscue E, Furman K, Groman SM, Taylor JR and DiLeone RJ (2020) Medial Nucleus Accumbens Projections to the Ventral Tegmental Area Control Food Consumption. *J Neurosci* **40**:4727-4738.
- Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **21**:16-19.
- Borrego MB, Grigsby KB, Townsley KG, Chan A, Firsick EJ, Tran A, Savarese A and Ozburn AR (2022) Central nucleus of the amygdala projections onto the nucleus accumbens core regulate binge-like alcohol drinking in a CRF-dependent manner. *Neuropharmacology* **203**:108874.
- Bradaia A, Schlichter R and Trouslard J (2004) Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *J Physiol* **559**:169-186.
- Brandao ML (1993) Involvement of opioid mechanisms in the dorsal periaqueductal gray in drug abuse. *Rev Neurosci* **4**:397-405.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY and Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* **338**:255-278.
- Buck SA, Torregrossa MM, Logan RW and Freyberg Z (2020) Roles of dopamine and glutamate co-release in the nucleus accumbens in mediating the actions of drugs of abuse. *FEBS J*.
- Burke SN and Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* **7**:30-40.
- Burzomato V, Groot-Kormelink PJ, Sivilotti LG and Beato M (2003) Stoichiometry of recombinant heteromeric glycine receptors revealed by a pore-lining region point mutation. *Recept Channels* **9**:353-361.

- Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* **58**:27-47.
- Chang YM, Rosene DL, Killiany RJ, Mangiamele LA and Luebke JI (2005) Increased action potential firing rates of layer 2/3 pyramidal cells in the prefrontal cortex are significantly related to cognitive performance in aged monkeys. *Cereb Cortex* **15**:409-418.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH and Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* **18**:9733-9750.
- Chen SY, Burger RI and Reith ME (1996) Extracellular dopamine in the rat ventral tegmental area and nucleus accumbens following ventral tegmental infusion of cocaine. *Brain Res* **729**:294-296.
- Chen X, Webb TI and Lynch JW (2009) The M4 transmembrane segment contributes to agonist efficacy differences between alpha1 and alpha3 glycine receptors. *Mol Membr Biol* **26**:321-332.
- Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Dimitrov IE, Pascual JM, Bachoo R, Mickey BE, Malloy CR and Maher EA (2011) Measurement of glycine in the human brain in vivo by 1H-MRS at 3 T: application in brain tumors. *Magn Reson Med* **66**:609-618.
- Collins AL, Aitken TJ, Greenfield VY, Ostlund SB and Wassum KM (2016) Nucleus Accumbens Acetylcholine Receptors Modulate Dopamine and Motivation. *Neuropsychopharmacology* **41**:2830-2838.
- Curtis DR, Duggan AW and Johnston GA (1971) The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the mammalian spinal cord. *Exp Brain Res* **12**:547-565.
- de Oliveira PG, Ramos MLS, Amaro AJ, Dias RA and Vieira SI (2019) Gi/o-Protein Coupled Receptors in the Aging Brain. *Front Aging Neurosci* **11**:89.
- Delaney AJ, Esmaeili A, Sedlak PL, Lynch JW and Sah P (2010) Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala. *Neurosci Lett* **469**:237-242.
- Deleuze C, Runquist M, Orcel H, Rabie A, Dayanithi G, Alonso G and Hussy N (2005) Structural difference between heteromeric somatic and homomeric axonal glycine receptors in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Neuroscience* **135**:475-483.
- Dlugaiczek J, Hecker D, Neubert C, Buerbank S, Campanelli D, Becker CM, Betz H, Knipper M, Ruttiger L and Schick B (2016) Loss of glycine receptors containing the alpha3 subunit compromises auditory nerve activity, but not outer hair cell function. *Hear Res* **337**:25-34.
- Dreher JC, Meyer-Lindenberg A, Kohn P and Berman KF (2008) Age-related changes in midbrain dopaminergic regulation of the human reward system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:15106-15111.
- Dutertre S, Becker CM and Betz H (2012) Inhibitory glycine receptors: an update. *J Biol Chem* **287**:40216-40223.
- Dykiert D, Der G, Starr JM and Deary IJ (2012) Age differences in intra-individual variability in simple and choice reaction time: systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **7**:e45759.
- Egimendia A, Minassian A, Diedenhofen M, Wiedermann D, Ramos-Cabrera P and Hoehn M (2019) Aging Reduces the Functional Brain Networks Strength—a Resting State fMRI Study of Healthy Mouse Brain. *Front Aging Neurosci* **11**:277.

- Ericson H and Blomqvist A (1988) Tracing of neuronal connections with cholera toxin subunit B: light and electron microscopic immunohistochemistry using monoclonal antibodies. *J Neurosci Methods* **24**:225-235.
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ and Houser CR (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* **14**:1834-1855.
- Fallon JH and Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* **180**:545-580.
- Farley NM and Mihic SJ (2015) Allosteric modulation of the glycine receptor activated by agonists differing in efficacy. *Brain Res* **1606**:95-101.
- Fenu S, Bassareo V and Di Chiara G (2001) A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J Neurosci* **21**:6897-6904.
- Fernandez-Perez EJ, Gallegos S, Armijo-Weingart L, Araya A, Riffo-Lepe NO, Cayuman F and Aguayo LG (2020) Changes in neuronal excitability and synaptic transmission in nucleus accumbens in a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Sci Rep* **10**:19606.
- Ferreira S, Soares LM, Lira CR, Yokoyama TS, Engi SA, Cruz FC and Leao RM (2021) Ethanol-induced locomotor sensitization: Neuronal activation in the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* **749**:135745.
- Floresco SB (2015) The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annu Rev Psychol* **66**:25-52.
- Flurkey K, M. Curren J and Harrison DE (2007) Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research, in *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)* (Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE and Smith AL eds) pp 637-672, Academic Press, Burlington.
- Fong AY, Stornetta RL, Foley CM and Potts JT (2005) Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and processes in the rat brainstem: subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol* **493**:274-290.
- Forstera B, Dzaye O, Winkelmann A, Semtner M, Benedetti B, Markovic DS, Synowitz M, Wend P, Fahling M, Junier MP, Glass R, Kettenmann H and Meier JC (2014) Intracellular glycine receptor function facilitates glioma formation in vivo. *J Cell Sci* **127**:3687-3698.
- Forstera B, Munoz B, Lobo MK, Chandra R, Lovinger DM and Aguayo LG (2017) Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *J Physiol* **595**:5285-5300.
- Fox ME, Figueiredo A, Menken MS and Lobo MK (2020) Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. *Sci Rep* **10**:12393.
- Freels TG, Gabriel DBK, Lester DB and Simon NW (2020) Risky decision-making predicts dopamine release dynamics in nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology* **45**:266-275.
- Gallegos S, Munoz B, Araya A and Aguayo LG (2019) High ethanol sensitive glycine receptors regulate firing in D1 medium spiny neurons in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* **160**:107773.
- Geisler S, Derst C, Veh RW and Zahm DS (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci* **27**:5730-5743.
- Gomez J, Ohno K and Betz H (2003) Glycine transporter isoforms in the mammalian central nervous system: structures, functions and therapeutic promises. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**:675-682.

- Gorelova N and Yang CR (1997) The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* **76**:689-706.
- Govoni S, Memo M, Saiani L, Spano PF and Trabucchi M (1980) Impairment of brain neurotransmitter receptors in aged rats. *Mech Ageing Dev* **12**:39-46.
- Grau-Perales AB, Gomez-Chacon B and Gallo M (2019) Differential activity pattern of c-Fos in the nucleus accumbens between adult and aged rats during flavor recognition memory. *Behav Brain Res* **371**:111935.
- Gray DC, Mahrus S and Wells JA (2010) Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* **142**:637-646.
- Griffon N, Buttner C, Nicke A, Kuhse J, Schmalzing G and Betz H (1999) Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J* **18**:4711-4721.
- Guadarrama-Bazante IL and Rodriguez-Manzo G (2019) Nucleus accumbens dopamine increases sexual motivation in sexually satiated male rats. *Psychopharmacology (Berl)* **236**:1303-1312.
- Haber SN and Knutson B (2010) The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology* **35**:4-26.
- Hahr JY (2019) Physiology of aging. *Med Hypotheses* **123**:83-85.
- Hammelrath L, Skokic S, Khmelinskii A, Hess A, van der Knaap N, Staring M, Lelieveldt BPF, Wiedermann D and Hoehn M (2016) Morphological maturation of the mouse brain: An in vivo MRI and histology investigation. *Neuroimage* **125**:144-152.
- Han L, Talwar S, Wang Q, Shan Q and Lynch JW (2013a) Phosphorylation of alpha3 glycine receptors induces a conformational change in the glycine-binding site. *ACS Chem Neurosci* **4**:1361-1370.
- Han NL, Clements JD and Lynch JW (2004) Comparison of taurine- and glycine-induced conformational changes in the M2-M3 domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* **279**:19559-19565.
- Han S, Gelernter J, Kranzler HR and Yang BZ (2013b) Ordered subset linkage analysis based on admixture proportion identifies new linkage evidence for alcohol dependence in African-Americans. *Hum Genet* **132**:397-403.
- Han X, Jing MY, Zhao TY, Wu N, Song R and Li J (2017) Role of dopamine projections from ventral tegmental area to nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in reinforcement behaviors assessed using optogenetic manipulation. *Metab Brain Dis* **32**:1491-1502.
- Harvey VL, Caley A, Muller UC, Harvey RJ and Dickenson AH (2009) A Selective Role for alpha3 Subunit Glycine Receptors in Inflammatory Pain. *Front Mol Neurosci* **2**:14.
- Hasue RH and Shammah-Lagnado SJ (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* **454**:15-33.
- Hawthorne R and Lynch JW (2005) A picrotoxin-specific conformational change in the glycine receptor M2-M3 loop. *J Biol Chem* **280**:35836-35843.
- He J and Crews FT (2007) Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol Biochem Behav* **86**:327-333.
- Heinz AJ, Beck A, Meyer-Lindenberg A, Sterzer P and Heinz A (2011) Cognitive and neurobiological mechanisms of alcohol-related aggression. *Nat Rev Neurosci* **12**:400-413.

- Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL and Edwards RH (2012) Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *J Neurosci* **32**:15076-15085.
- Huang RL, Wang CT, Tai MY, Tsai YF and Peng MT (1995) Effects of age on dopamine release in the nucleus accumbens and amphetamine-induced locomotor activity in rats. *Neurosci Lett* **200**:61-64.
- Hunter C, Chung E and Van Woert MH (1989) Age-dependent changes in brain glycine concentration and strychnine-induced seizures in the rat. *Brain Res* **482**:247-251.
- Hurley SW and Carelli RM (2020) Activation of Infralimbic to Nucleus Accumbens Shell Pathway Suppresses Conditioned Aversion in Male but not Female Rats. *J Neurosci*.
- Jansen KL, Dragunow M and Faull RL (1989) [3H]glycine binding sites, NMDA and PCP receptors have similar distributions in the human hippocampus: an autoradiographic study. *Brain Res* **482**:174-178.
- Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst AC, Stout JC, Bonner J and Hesselink JR (2001) Effects of age on tissues and regions of the cerebrum and cerebellum. *Neurobiol Aging* **22**:581-594.
- Ji X, Saha S, Kolpakova J, Guildford M, Tapper AR and Martin GE (2017) Dopamine Receptors Differentially Control Binge Alcohol Drinking-Mediated Synaptic Plasticity of the Core Nucleus Accumbens Direct and Indirect Pathways. *J Neurosci* **37**:5463-5474.
- Jia X, Yan J, Xia J, Xiong J, Wang T, Chen Y, Qi A, Yang N, Fan S, Ye J and Hu Z (2012) Arousal effects of orexin A on acute alcohol intoxication-induced coma in rats. *Neuropharmacology* **62**:775-783.
- Johnson LR, Aylward RL, Hussain Z and Totterdell S (1994) Input from the amygdala to the rat nucleus accumbens: its relationship with tyrosine hydroxylase immunoreactivity and identified neurons. *Neuroscience* **61**:851-865.
- Jonsson S, Kerekes N, Hyytia P, Ericson M and Soderpalm B (2009) Glycine receptor expression in the forebrain of male AA/ANA rats. *Brain Res* **1305 Suppl**:S27-36.
- Jonsson S, Morud J, Pickering C, Adermark L, Ericson M and Soderpalm B (2012) Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development. *Brain Res* **1446**:12-21.
- Jun SB, Cuzon Carlson V, Ikeda S and Lovinger D (2011) Vibrodissociation of neurons from rodent brain slices to study synaptic transmission and image presynaptic terminals. *J Vis Exp*.
- Kalivas PW, Churchill L and Klitenick MA (1993) GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience* **57**:1047-1060.
- Karrer TM, Josef AK, Mata R, Morris ED and Samanez-Larkin GR (2017) Reduced dopamine receptors and transporters but not synthesis capacity in normal aging adults: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* **57**:36-46.
- Kashyap G, Bapat D, Das D, Gowaiakar R, Amritkar RE, Rangarajan G, Ravindranath V and Ambika G (2019) Synapse loss and progress of Alzheimer's disease -A network model. *Sci Rep* **9**:6555.
- Kelley AE and Domesick VB (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* **7**:2321-2335.
- Kelly KM, Nadon NL, Morrison JH, Thibault O, Barnes CA and Blalock EM (2006) The neurobiology of aging. *Epilepsy Res* **68 Suppl 1**:S5-20.

- Kirouac GJ, Li S and Mabrouk G (2004) GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* **469**:170-184.
- Kirouac GJ and Pittman QJ (2000) A projection from the ventral tegmental area to the periaqueductal gray involved in cardiovascular regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**:R1643-1650.
- Kogias G, Zheng F, Kalinichenko LS, Kornhuber J, Alzheimer C, Mielenz D and Muller CP (2020) Swiprosin1/EFhd2 is involved in the monoaminergic and locomotor responses of psychostimulant drugs. *J Neurochem* **154**:424-440.
- Konar-Nie M, Guzman-Castillo A, Armijo-Weingart L and Aguayo LG (2022) Aging in nucleus accumbens and its impact on alcohol use disorders. *Alcohol*.
- Laube B, Maksay G, Schemm R and Betz H (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* **23**:519-527.
- Lee KH, Yoo JH, Lee J, Kim SH, Han JY, Hong SB, Shin J, Cho SC, Kim JW and Brent DA (2020) The indirect effect of peer problems on adolescent depression through nucleus accumbens volume alteration. *Sci Rep* **10**:12870.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* **58**:760-793.
- Li C, McCall NM, Lopez AJ and Kash TL (2013) Alcohol effects on synaptic transmission in periaqueductal gray dopamine neurons. *Alcohol* **47**:279-287.
- Li P and Slaughter M (2007) Glycine receptor subunit composition alters the action of GABA antagonists. *Vis Neurosci* **24**:513-521.
- Li YQ, Rao ZR and Shi JW (1989) Serotonergic projections from the midbrain periaqueductal gray to the nucleus accumbens in the rat. *Neurosci Lett* **98**:276-279.
- Lido HH, Ericson M, Marston H and Soderpalm B (2011) A role for accumbal glycine receptors in modulation of dopamine release by the glycine transporter-1 inhibitor org25935. *Front Psychiatry* **2**:8.
- Liu H, Liu T, Jiang J, Cheng J, Liu Y, Li D, Dong C, Niu H, Li S, Zhang J, Brodaty H, Sachdev P and Wen W (2020a) Differential longitudinal changes in structural complexity and volumetric measures in community-dwelling older individuals. *Neurobiol Aging* **91**:26-35.
- Liu Y, Montgomery SE, Juarez B, Morel C, Zhang S, Kong Y, Calipari ES, Nestler EJ, Zhang L and Han MH (2020b) Different adaptations of dopamine release in Nucleus Accumbens shell and core of individual alcohol drinking groups of mice. *Neuropharmacology* **175**:108176.
- Lopes da Silva FH, Arnolds DE and Neijt HC (1984) A functional link between the limbic cortex and ventral striatum: physiology of the subiculum accumbens pathway. *Exp Brain Res* **55**:205-214.
- Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M and Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* **153**:1194-1217.
- Lorenc-Koci E, Konieczny J and Wolfarth S (1998) Contribution of the glycine site of NMDA receptors in rostral and intermediate-caudal parts of the striatum to the regulation of muscle tone in rats. *Brain Res* **793**:315-320.
- Lorenzo LE, Barbe A, Portalier P, Fritschy JM and Bras H (2006) Differential expression of GABA_A and glycine receptors in ALS-resistant vs. ALS-vulnerable motoneurons: possible implications for selective vulnerability of motoneurons. *Eur J Neurosci* **23**:3161-3170.

- Lovick TA (1993a) The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms. *Behav Brain Res* **58**:19-25.
- Lovick TA (1993b) Serotonergic influence from nucleus raphe obscurus on neurones in the periaqueductal grey matter in the rat. *Brain Res* **606**:92-98.
- Lynch JW (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* **84**:1051-1095.
- Ma L, Chen W, Yu D and Han Y (2020) Brain-Wide Mapping of Afferent Inputs to Accumbens Nucleus Core Subdomains and Accumbens Nucleus Subnuclei. *Front Syst Neurosci* **14**:15.
- Maguire EP, Mitchell EA, Greig SJ, Corteen N, Balfour DJ, Swinny JD, Lambert JJ and Belelli D (2014) Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: a sensitive target for ethanol. *Neuropsychopharmacology* **39**:1232-1244.
- Manzoni O, Michel JM and Bockaert J (1997) Metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* **9**:1514-1523.
- Maric HM, Mukherjee J, Tretter V, Moss SJ and Schindelin H (2011) Gephyrin-mediated gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptor clustering relies on a common binding site. *J Biol Chem* **286**:42105-42114.
- Martin G and Siggins GR (2002) Electrophysiological evidence for expression of glycine receptors in freshly isolated neurons from nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:1135-1145.
- Mascia MP, Mihic SJ, Valenzuela CF, Schofield PR and Harris RA (1996) A single amino acid determines differences in ethanol actions on strychnine-sensitive glycine receptors. *Mol Pharmacol* **50**:402-406.
- McBride WJ, Murphy JM and Ikemoto S (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* **101**:129-152.
- McCracken LM, Lowes DC, Salling MC, Carreau-Vollmer C, Odean NN, Blednov YA, Betz H, Harris RA and Harrison NL (2017) Glycine receptor alpha3 and alpha2 subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:E7179-E7186.
- McDonald AJ (1991) Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience* **44**:15-33.
- McNally GP (2005) Facilitation of fear extinction by midbrain periaqueductal gray infusions of RB101(S), an inhibitor of enkephalin-degrading enzymes. *Behav Neurosci* **119**:1672-1677.
- McNally GP, Lee BW, Chiem JY and Choi EA (2005) The midbrain periaqueductal gray and fear extinction: opioid receptor subtype and roles of cyclic AMP, protein kinase A, and mitogen-activated protein kinase. *Behav Neurosci* **119**:1023-1033.
- McNally GP, Pigg M and Weidemann G (2004) Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* **24**:6912-6919.
- Melani R, Von Itter R, Jing D, Koppensteiner P and Ninan I (2019) Opposing effects of an atypical glycinergic and substance P transmission on interpeduncular nucleus plasticity. *Neuropsychopharmacology* **44**:1828-1836.

- Mell T, Wartenburger I, Marschner A, Villringer A, Reischies FM and Heekeren HR (2009) Altered function of ventral striatum during reward-based decision making in old age. *Front Hum Neurosci* **3**:34.
- Melzer N, Villmann C, Becker K, Harvey K, Harvey RJ, Vogel N, Kluck CJ, Kneussel M and Becker CM (2010) Multifunctional basic motif in the glycine receptor intracellular domain induces subunit-specific sorting. *J Biol Chem* **285**:3730-3739.
- Meredith GE, Agolia R, Arts MP, Groenewegen HJ and Zahm DS (1992) Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* **50**:149-162.
- Mickley GA, Ketchesin KD, Ramos L, Luchsinger JR, Rogers MM, Wiles NR and Hoxha N (2013) Stimulation of the dorsal periaqueductal gray enhances spontaneous recovery of a conditioned taste aversion. *Brain Res* **1493**:27-39.
- Mickley GA, Wilson GN, Remus JL, Ramos L, Ketchesin KD, Biesan OR, Luchsinger JR and Prodan S (2011) Periaqueductal gray c-Fos expression varies relative to the method of conditioned taste aversion extinction employed. *Brain Res* **1423**:17-29.
- Miller PS and Smart TG (2010) Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci* **31**:161-174.
- Mingote S, Chuhma N, Kusnoor SV, Field B, Deutch AY and Rayport S (2015) Functional Connectome Analysis of Dopamine Neuron Glutamatergic Connections in Forebrain Regions. *J Neurosci* **35**:16259-16271.
- Molander A, Lido HH, Lof E, Ericson M and Soderpalm B (2007) The glycine reuptake inhibitor Org 25935 decreases ethanol intake and preference in male wistar rats. *Alcohol Alcohol* **42**:11-18.
- Molander A, Lof E, Stomberg R, Ericson M and Soderpalm B (2005) Involvement of accumbal glycine receptors in the regulation of voluntary ethanol intake in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* **29**:38-45.
- Molander A and Soderpalm B (2005) Accumbal strychnine-sensitive glycine receptors: an access point for ethanol to the brain reward system. *Alcohol Clin Exp Res* **29**:27-37.
- Molas S, DeGroot SR, Zhao-Shea R and Tapper AR (2017) Anxiety and Nicotine Dependence: Emerging Role of the Habenulo-Interpeduncular Axis. *Trends Pharmacol Sci* **38**:169-180.
- Montaron MF, Deniau JM, Menetrey A, Glowinski J and Thierry AM (1996) Prefrontal cortex inputs of the nucleus accumbens-nigro-thalamic circuit. *Neuroscience* **71**:371-382.
- Morelli G, Avila A, Ravanidis S, Aourz N, Neve RL, Smolders I, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L and Brone B (2017) Cerebral Cortical Circuitry Formation Requires Functional Glycine Receptors. *Cereb Cortex* **27**:1863-1877.
- Morrison JH and Baxter MG (2012) The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci* **13**:240-250.
- Morrison SE, McGinty VB, du Hoffmann J and Nicola SM (2017) Limbic-motor integration by neural excitations and inhibitions in the nucleus accumbens. *J Neurophysiol* **118**:2549-2567.
- Muller WE and Snyder SH (1978) Strychnine binding associated with synaptic glycine receptors in rat spinal cord membranes: ionic influences. *Brain Res* **147**:107-116.
- Munoz B, Mariqueo T, Murath P, Peters C, Yevenes GE, Moraga-Cid G, Peoples RW and Aguayo LG (2021) Modulatory Actions of the Glycine Receptor beta Subunit on the Positive

- Allosteric Modulation of Ethanol in alpha2 Containing Receptors. *Front Mol Neurosci* **14**:763868.
- Munoz B, Yevenes GE, Forstera B, Lovinger DM and Aguayo LG (2018) Presence of Inhibitory Glycinergic Transmission in Medium Spiny Neurons in the Nucleus Accumbens. *Front Mol Neurosci* **11**:228.
- Murphy SM, Pilowsky PM and Llewellyn-Smith IJ (1998) Pre-embedding staining for GAD67 versus postembedding staining for GABA as markers for central GABAergic terminals. *J Histochem Cytochem* **46**:1261-1268.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P and Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13940-13945.
- Narvacan K, Treit S, Camicioli R, Martin W and Beaulieu C (2017) Evolution of deep gray matter volume across the human lifespan. *Hum Brain Mapp* **38**:3771-3790.
- Nerlich J, Kuenzel T, Keine C, Korenic A, Rubsam R and Milenkovic I (2014) Dynamic fidelity control to the central auditory system: synergistic glycine/GABAergic inhibition in the cochlear nucleus. *J Neurosci* **34**:11604-11620.
- Nishizaki T and Ikeuchi Y (1995) Activation of endogenous protein kinase C enhances currents through alpha 1 and alpha 2 glycine receptor channels. *Brain Res* **687**:214-216.
- Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N and Hattori N (2020) Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice. *Mol Brain* **13**:46.
- Oertel J, Villmann C, Kettenmann H, Kirchhoff F and Becker CM (2007) A novel glycine receptor beta subunit splice variant predicts an unorthodox transmembrane topology. Assembly into heteromeric receptor complexes. *J Biol Chem* **282**:2798-2807.
- Olivares L, Aragon C, Gimenez C and Zafra F (1997) Analysis of the transmembrane topology of the glycine transporter GLYT1. *J Biol Chem* **272**:1211-1217.
- Olson VG and Nestler EJ (2007) Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* **61**:87-95.
- Ostapoff EM, Benson CG and Saint Marie RL (1997) GABA- and glycine-immunoreactive projections from the superior olivary complex to the cochlear nucleus in guinea pig. *J Comp Neurol* **381**:500-512.
- Ouda L, Profant O and Syka J (2015) Age-related changes in the central auditory system. *Cell Tissue Res* **361**:337-358.
- Pedroza-Llinas R, Ramirez-Lugo L, Guzman-Ramos K, Zavala-Vega S and Bermudez-Rattoni F (2009) Safe taste memory consolidation is disrupted by a protein synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiol Learn Mem* **92**:45-52.
- Phillipson OT and Griffiths AC (1985) The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* **16**:275-296.
- Pilorge M, Fassier C, Le Corronc H, Potey A, Bai J, De Gois S, Delaby E, Assouline B, Guinchat V, Devillard F, Delorme R, Nygren G, Rastam M, Meier JC, Otani S, Cheval H, James VM, Topf M, Dear TN, Gillberg C, Leboyer M, Giros B, Gautron S, Hazan J, Harvey RJ, Legendre P and Betancur C (2016) Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry* **21**:936-945.
- Pressman PS, Noniyeva Y, Bott N, Dutt S, Sturm V, Miller BL and Kramer JH (2016) Comparing Volume Loss in Neuroanatomical Regions of Emotion versus Regions of Cognition in Healthy Aging. *PLoS One* **11**:e0158187.

- Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J and Betz H (1992) The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J* **11**:4305-4311.
- Purohit K, Parekh PK, Kern J, Logan RW, Liu Z, Huang Y, McClung CA, Crabbe JC and Ozburn AR (2018) Pharmacogenetic Manipulation of the Nucleus Accumbens Alters Binge-Like Alcohol Drinking in Mice. *Alcohol Clin Exp Res* **42**:879-888.
- Qi J, Zhang S, Wang HL, Barker DJ, Miranda-Barrientos J and Morales M (2016) VTA glutamatergic inputs to nucleus accumbens drive aversion by acting on GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* **19**:725-733.
- Radulescu CI, Cerar V, Haslehurst P, Kopanitsa M and Barnes SJ (2021) The aging mouse brain: cognition, connectivity and calcium. *Cell Calcium* **94**:102358.
- Rahman S and McBride WJ (2001) D1-D2 dopamine receptor interaction within the nucleus accumbens mediates long-loop negative feedback to the ventral tegmental area (VTA). *J Neurochem* **77**:1248-1255.
- Ramirez-Lugo L, Nunez-Jaramillo L and Bermudez-Rattoni F (2007) Taste memory formation: role of nucleus accumbens. *Chem Senses* **32**:93-97.
- Richter A, Reinhard F, Kraemer B and Gruber O (2020) A high-resolution fMRI approach to characterize functionally distinct neural pathways within dopaminergic midbrain and nucleus accumbens during reward and salience processing. *Eur Neuropsychopharmacol* **36**:137-150.
- Rosenzweig ES, Redish AD, McNaughton BL and Barnes CA (2003) Hippocampal map realignment and spatial learning. *Nat Neurosci* **6**:609-615.
- Salling MC and Harrison NL (2014) Strychnine-sensitive glycine receptors on pyramidal neurons in layers II/III of the mouse prefrontal cortex are tonically activated. *J Neurophysiol* **112**:1169-1178.
- Samarakoon SM, Chandola HM and Ravishankar B (2011) Effect of dietary, social, and lifestyle determinants of accelerated aging and its common clinical presentation: A survey study. *Ayu* **32**:315-321.
- Sanchez-Chavez G, Velazquez-Flores MA, Ruiz Esparza-Garrido R and Salceda R (2017) Glycine receptor subunits expression in the developing rat retina. *Neurochem Int* **108**:177-182.
- Sasa M, Hara M and Takaori S (1991) Dopamine D-1 receptor-mediated inhibition of nucleus accumbens neurons from the ventral tegmental area. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **15**:119-128.
- Scahill RI, Frost C, Jenkins R, Whitwell JL, Rossor MN and Fox NC (2003) A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* **60**:989-994.
- Schaefer N, Roemer V, Janzen D and Villmann C (2018) Impaired Glycine Receptor Trafficking in Neurological Diseases. *Front Mol Neurosci* **11**:291.
- Schall TA, Wright WJ and Dong Y (2020) Nucleus accumbens fast-spiking interneurons in motivational and addictive behaviors. *Mol Psychiatry*.
- Schott BH, Niehaus L, Wittmann BC, Schutze H, Seidenbecher CI, Heinze HJ and Duzel E (2007) Ageing and early-stage Parkinson's disease affect separable neural mechanisms of mesolimbic reward processing. *Brain* **130**:2412-2424.

- Segovia G, Del Arco A and Mora F (1999) Effects of aging on the interaction between glutamate, dopamine, and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat. *J Neurochem* **73**:2063-2072.
- Segovia G and Mora F (2005) Dopamine and GABA increases produced by activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens are decreased during aging. *Neurobiol Aging* **26**:91-101.
- Seibenhener ML and Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*:e52434.
- Sigel E and Steinmann ME (2012) Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem* **287**:40224-40231.
- Sklar LS and Amit Z (1977) Manipulations of catecholamine systems block the conditioned taste aversion induced by self-administered drugs. *Neuropharmacology* **16**:649-655.
- Soares-Cunha C, Coimbra B, David-Pereira A, Borges S, Pinto L, Costa P, Sousa N and Rodrigues AJ (2016) Activation of D2 dopamine receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens increases motivation. *Nat Commun* **7**:11829.
- Spear LP (2016) Consequences of adolescent use of alcohol and other drugs: Studies using rodent models. *Neurosci Biobehav Rev* **70**:228-243.
- Spear LP and Silveri MM (2016) Special Issue on the Adolescent Brain. *Neurosci Biobehav Rev* **70**:1-3.
- Spike RC, Watt C, Zafra F and Todd AJ (1997) An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* **77**:543-551.
- Svennerholm L, Bostrom K and Jungbjer B (1997) Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol* **94**:345-352.
- Tarazi FI, Campbell A, Yeghiayan SK and Baldessarini RJ (1998) Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse* **30**:227-235.
- Tepper JM and Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* **14**:685-692.
- Terakita A (2005) The opsins. *Genome Biol* **6**:213.
- Thiele TE, Crabbe JC and Boehm SL, 2nd (2014) "Drinking in the Dark" (DID): a simple mouse model of binge-like alcohol intake. *Curr Protoc Neurosci* **68**:9 49 41-49 49 12.
- Trollor JN and Valenzuela MJ (2001) Brain ageing in the new millennium. *Aust N Z J Psychiatry* **35**:788-805.
- Tryon VL and Mizumori SJY (2018) A Novel Role for the Periaqueductal Gray in Consummatory Behavior. *Front Behav Neurosci* **12**:178.
- Tziridis K, Buerbank S, Eulenburg V, Dlugaiczyk J and Schulze H (2017) Deficit in acoustic signal-in-noise detection in glycine receptor alpha3 subunit knockout mice. *Eur J Neurosci* **45**:581-586.
- Unal ES, Zhao R, Qiu A and Goldman ID (2008) N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT). *Biochim Biophys Acta* **1778**:1407-1414.
- Utkin YN (2019) Aging Affects Nicotinic Acetylcholine Receptors in Brain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **19**:119-124.

- Uusisaari M and Knopfel T (2010) GlyT2+ neurons in the lateral cerebellar nucleus. *Cerebellum* **9**:42-55.
- Van Bockstaele EJ and Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* **682**:215-221.
- Waldvogel HJ, Baer K, Allen KL, Rees MI and Faull RL (2007) Glycine receptors in the striatum, globus pallidus, and substantia nigra of the human brain: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* **502**:1012-1029.
- Walhovd KB, Fjell AM, Reinvang I, Lundervold A, Dale AM, Eilertsen DE, Quinn BT, Salat D, Makris N and Fischl B (2005) Effects of age on volumes of cortex, white matter and subcortical structures. *Neurobiol Aging* **26**:1261-1270; discussion 1275-1268.
- Walhovd KB, Westlye LT, Amlie I, Espeseth T, Reinvang I, Raz N, Agartz I, Salat DH, Greve DN, Fischl B, Dale AM and Fjell AM (2011) Consistent neuroanatomical age-related volume differences across multiple samples. *Neurobiol Aging* **32**:916-932.
- Walsh JJ and Han MH (2014) The heterogeneity of ventral tegmental area neurons: Projection functions in a mood-related context. *Neuroscience* **282**:101-108.
- Walsh JP and Akopian G (2019) Physiological aging at striatal synapses. *J Neurosci Res* **97**:1720-1727.
- Wan M, Xia R, Lin H, Qiu P, He J, Ye Y, Tao J, Chen L and Zheng G (2020) Volumetric and Diffusion Abnormalities in Subcortical Nuclei of Older Adults With Cognitive Frailty. *Front Aging Neurosci* **12**:202.
- Wang H, Turner JG, Ling L, Parrish JL, Hughes LF and Caspary DM (2009) Age-related changes in glycine receptor subunit composition and binding in dorsal cochlear nucleus. *Neuroscience* **160**:227-239.
- Wang Z, Yue L, Cui C, Liu S, Wang X, Li Y and Ma L (2019) Top-down control of the medial orbitofrontal cortex to nucleus accumbens core pathway in decisional impulsivity. *Brain Struct Funct* **224**:2437-2452.
- Winner BM, Zhang H, Farthing MM, Karchalla LM, Lookingland KJ and Goudreau JL (2017) Metabolism of Dopamine in Nucleus Accumbens Astrocytes Is Preserved in Aged Mice Exposed to MPTP. *Front Aging Neurosci* **9**:410.
- Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, Friauf E, Rosenmund C, Brose N and Rhee JS (2006) A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* **50**:575-587.
- Woodruff GN, Watling KJ, Andrews CD, Poat JA and McDermed JD (1977) Dopamine receptors in rat striatum and nucleus accumbens; conformational studies using rigid analogues of dopamine. *J Pharm Pharmacol* **29**:422-427.
- Wright CI, Beijer AV and Groenewegen HJ (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci* **16**:1877-1893.
- Xu X, Li N, Wen J, Yang P, Lu X, Wang Z, He T, Fan Y, Xu B, Ge F and Guan X (2023) Specific Inhibition of Interpeduncular Nucleus GABAergic Neurons Alleviates Anxiety-Like Behaviors in Male Mice after Prolonged Abstinence from Methamphetamine. *J Neurosci* **43**:803-811.
- Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM and Ferguson SM (2015) The ins and outs of the striatum: role in drug addiction. *Neuroscience* **301**:529-541.

- Yang CR and Mogenson GJ (1984) Electrophysiological responses of neurones in the nucleus accumbens to hippocampal stimulation and the attenuation of the excitatory responses by the mesolimbic dopaminergic system. *Brain Res* **324**:69-84.
- Yang H, de Jong JW, Tak Y, Peck J, Bateup HS and Lammel S (2018) Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron* **97**:434-449 e434.
- Yang Z, Cromer BA, Harvey RJ, Parker MW and Lynch JW (2007) A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem* **103**:580-589.
- Yevenes GE, Moraga-Cid G, Avila A, Guzman L, Figueroa M, Peoples RW and Aguayo LG (2010) Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation. *J Biol Chem* **285**:30203-30213.
- Yoo HB, De Ridder D and Vanneste S (2016) The Importance of Aging in Gray Matter Changes Within Tinnitus Patients Shown in Cortical Thickness, Surface Area and Volume. *Brain Topogr* **29**:885-896.
- Yu J, Ishikawa M, Wang J, Schluter OM, Sesack SR and Dong Y (2019) Ventral Tegmental Area Projection Regulates Glutamatergic Transmission in Nucleus Accumbens. *Sci Rep* **9**:18451.
- Zaborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L and Palkovits M (1985) Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* **14**:427-453.
- Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bosl MR and Fritschy JM (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* **482**:123-141.
- Zhang Y, Ho TNT, Harvey RJ, Lynch JW and Keramidis A (2017) Structure-Function Analysis of the GlyR alpha2 Subunit Autism Mutation p.R323L Reveals a Gain-of-Function. *Front Mol Neurosci* **10**:158.
- Zhang Y, Zhu Y, Cao SX, Sun P, Yang JM, Xia YF, Xie SZ, Yu XD, Fu JY, Shen CJ, He HY, Pan HQ, Chen XJ, Wang H and Li XM (2020) MeCP2 in cholinergic interneurons of nucleus accumbens regulates fear learning. *Elife* **9**.
- Haines, D. E., & Mihailoff, G. A. (2018). In: *Fundamental neuroscience for basic and clinical applications*, pp. 183–194 (chapter 13). Elsevier.