

**Universidad de Concepción**



**“La potenciación del receptor de glicina por etanol en neuronas D1 MSN del núcleo Accumbens regula el consumo y preferencia por etanol”**

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y  
Molecular

Scarlet Soledad Gallegos Gallegos

2020

~ 1 ~

Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Neurofisiología, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Luis G. Aguayo H.

Profesor Guía

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

---

Dr. Gonzalo Yévenes C.

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción



---

Dr. Francisco Nualart S.

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

---

Dr. Ramón Sotomayor S.

Facultad de Ciencias

Universidad de Valparaíso

---

Dr. Juan Pablo Henríquez H.

Director Subrogante Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas área

Biología Celular y Molecular

Universidad de Concepción

## Índice general

Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	7
Lista de abreviaciones .....	8
Resumen .....	13
Abstract.....	15
Introducción .....	17
Sistema de Recompensa.....	18
Núcleo Accumbens (nAc) .....	19
Etanol en sistema nervioso central .....	23
Receptor de Glicina (R-Gli).....	24
Potenciación del R-Gli por etanol.....	29
Contexto de estudio.....	32
Hipótesis .....	41
Objetivos.....	42
Materiales y Métodos .....	44
Resultados .....	58
<b>Objetivo Específico 1: Caracterizar los efectos de etanol sobre las corrientes mediadas por el receptor de glicina en neuronas D1 MSN del nAc, y analizar la excitabilidad de estas neuronas expresando un receptor es sensible o menos sensible a etanol.</b> .....	58
Actividad 1.1 Determinar la presencia de corrientes mediadas por el R-Gli en el nAc e identificación del origen de las fibras glicinérgicas. ....	58
Actividad 1.2 Analizar los efectos de concentraciones farmacológicas de etanol en las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en las D1 MSN y como etanol puede afectar la excitabilidad de estas neuronas. ....	67
Actividad 1.3 Análisis de la sensibilidad a glicina y etanol del R-Gli en el nAc de un modelo de ratón con R-Gli alfa 2 menos sensible a etanol. ....	77
<b>Objetivo Específico 2: Evaluar el consumo y preferencia de etanol en ratones con R-Gli insensibles a la potenciación por etanol.</b> .....	90

Actividad 2.1. Evaluación de la actividad motora del ratón KI $\alpha 2$ en condiciones controles y en respuesta a etanol. ....	90
Actividad 2.2 Evaluación del consumo de etanol en ratones KI $\alpha 2$ . ....	104
Actividad 2.3 Análisis de la preferencia por etanol. ....	109
Discusión .....	111
Inervación glicinérgica en el nAc. ....	113
Potenciación por etanol del R-Gli en el nAc y el impacto en la excitabilidad. ..	117
La potenciación por etanol del R-Gli depende de las subunidades que lo componen. ....	119
Presencia de R-Gli heteroméricos en el nAc. ....	119
Presencia de la subunidad $\alpha 2$ del R-Gli en el nAc. ....	120
Función de la subunidad $\alpha 2$ del R-Gli en el nAc. ....	125
Rol de la subunidad $\alpha 2$ en el comportamiento frente a los efectos de etanol. .	128
El consumo compulsivo ( <i>binge drinking</i> ) del KI $\alpha 2$ en la prueba DID. ....	130
Las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del R-Gli son importantes para comportamientos inducidos por etanol. ....	132
Conclusión .....	137
Agradecimientos .....	138
Referencias .....	141

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema resumido del sistema de recompensa .....	22
Figura 2. Transmisión glicinérgica en nAc y tipos de R-Gli .....	28
Figura 3. Esquema de potenciación del R-Gli por etanol mediado por $G\beta\gamma$ .....	31
Figura 4. Antecedentes de la mutación KR389-390AA en el R-Gli $\alpha 2\beta$ .....	38
Figura 5. Modelo de trabajo .....	40
Figura 6. Estrategia de la generación del ratón KI $\alpha 2$ mediante edición genética con CRISPR Cas9.....	57
Figura 7. Corrientes sinápticas de glicina en el nAc .....	60
Figura 8. Fibras y neuronas glicinérgicas en el nAc .....	64
Figura 9. Neuronas glicinérgicas que inervan el nAc.....	65
Figura 10. Neuronas glicinérgicas en los núcleos reticulares del mesencéfalo que inervan el nAc.....	66
Figura 11. Corrientes tónicas de glicina sensibles a bajas concentraciones de etanol.....	69
Figura 12. Etanol disminuye la excitabilidad de las D1 MSN de manera dependiente del R-Gli.....	72
Figura 13. Etanol no altera la excitabilidad de las D1(-) del nAc .....	75
Figura 14. Activación de los R-Gli en el nAc del ratón KI $\alpha 2$ .....	79
Figura 15. La potenciación por etanol se encuentra disminuida en el nAc del ratón KI $\alpha 2$ .....	82
Figura 16. La potenciación por etanol en nAc del KI $\alpha 2$ está disminuida (activación con glicina 10 $\mu$ M).....	83
Figura 17. Análisis de las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en el ratón KI $\alpha 2$ .....	85
Figura 18. La excitabilidad neuronal del nAc del KI $\alpha 2$ no se afecta por etanol .....	88
Figura 19. Características generales de los ratones KI $\alpha 2$ .....	93
Figura 20. Los ratones KI $\alpha 2$ no presentan alteración locomotora .....	94

<b>Figura 21. Los ratones KI <math>\alpha</math>2 no presentan alteraciones en el comportamiento exploratorio ni comportamiento de tipo ansioso.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 22. Las hembras KI <math>\alpha</math>2 no presentan alteraciones locomotoras o en el comportamiento exploratorio.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 23. Los ratones KI <math>\alpha</math>2 se recuperan más rápido de los efectos atáxicos de etanol.....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 24. Los ratones KI <math>\alpha</math>2 se recuperan más rápido de los efectos sedativos de etanol.....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 25. Recuperación más rápida de las hembras KI <math>\alpha</math>2 frente a los efectos atáxicos de etanol. ....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 26. Ratones KI <math>\alpha</math>2 consumen más etanol que ratones WT .....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 27. Alto consumo de etanol en ratones hembras.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 28. Los ratones KI <math>\alpha</math>2 y WT se condicionan a preferir el lugar asociado a etanol.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 29. Regiones del mesencéfalo y protuberancia que liberan glicina en áreas del prosencéfalo.....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 30. Modelo propuesto del trabajo.....</b>	<b>136</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Características de los potenciales de acción registrados en las MSN del nAc en condiciones controles y en presencia de 50 mM etanol .....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 2. Comparación de resultados de electrofisiología en el nAc entre ratones KI <math>\alpha</math>1 y KI <math>\alpha</math>2 .....</b>	<b>127</b>
<b>Tabla 3. Comparación de resultados de comportamiento entre ratones KI <math>\alpha</math>1 y KI <math>\alpha</math>2.....</b>	<b>135</b>



## Lista de abreviaciones

A: aminoácido alanina

AAV: adenovirus asociado

aca: comisura anterior (del inglés: anterior part of the anterior commissure)

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

ADH: enzima alcohol deshidrogenada

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALDH: enzima aldehído deshidrogenasa

AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

ARN: ácido ribonucleico

BAC: cromosoma artificial bacteriano (del inglés: bacterial artificial chromosome)

BEC: concentración de etanol en sangre (del inglés: blood ethanol concentration)

Cl<sup>-</sup>: ion cloruro

CNQX: Cianquixalina

CPP: preferencia condicionada a un lugar (del inglés: conditioned place preference)

Cre: recombinasa

CREB: elemento modulador de respuesta a AMPc (del inglés: cAMP response element modulator)

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (del inglés: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Cs<sup>+</sup>: estímulo condicionante positivo (del inglés: conditioned stimulus)

Cs<sup>-</sup>: estímulo condicionante negativo (del inglés: conditioned stimulus)

D1 MSN: MSN que expresa el receptor tipo D<sub>1</sub> de dopamina

D2 MSN: MSN que expresa el receptor tipo D<sub>2</sub> de dopamina

D<sub>1</sub>R: receptor de dopamina de tipo 1

D<sub>2</sub>R: receptor de dopamina de tipo 2

D-APV: ácido D-2-Amino-5-fosfonovalerianico

DA: dopamina

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

DID: consumo en la oscuridad (del inglés: drinking in the dark)

EC<sub>10</sub>: concentración de agonista correspondiente al 10% del efecto máximo

EC<sub>50</sub>: concentración de agonista correspondiente al 50% del efecto máximo

ECD: dominio extracelular (del inglés: extracellular domain)

F: aminoácido fenilalanina

FDA: Administración de alimentos y medicamentos de EEUU (del inglés: Food and drug administration)

g/kg: gramos por kilogramo de peso

Gβγ: dímero G beta gamma

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GABA<sub>A</sub>R: receptor de GABA de tipo A

GFP: proteína fluorescente verde (del inglés: Green fluorescent protein)

GlyT1: Transportador de glicina 1

GlyT2: Transportador de glicina 2

GST: glutatión-S-transferasa

GTP: guanosin trifosfato

GTPγS: análogo no hidrolizable de GTP



HEK293: Células embrionarias de riñón humano (del inglés: human embryonic kidney)

IL: loop intracelular (del inglés: intracellular loop)

IHC: inmunohistoquímica (del inglés: immunohistochemistry)

i.p.: inyección intraperitoneal

K: aminoácido lisina

KI: Animal modificado genéticamente (del inglés: knock in)

KO: Animal que no expresa un gen particular (del inglés: knock out)

LC: locus Cerúleo

LORR: pérdida del reflejo de enderezamiento (del inglés: Loss of righting reflex)

mg/dl: miligramo por decilitro

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



mM: mili molar

mOsm: mili osmol

mPSC: corriente postsináptica en miniatura (del inglés: miniature postsynaptic current)

MRN: núcleos reticulares del mesencéfalo (del inglés: midbrain reticular nucleus)

MSN: Neuronas espinosas medianas (del inglés: medium spiny neurons)

mV: mili voltio

Na<sup>+</sup>: sodio

nAc: núcleo Accumbens

nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina

NMDA: N-metil-D-apartato

NIAAAA: Instituto nacional sobre el abuso de alcohol y alcoholismo de EEUU (del inglés: National institute on alcohol abuse and alcoholism)

NIH: Instituto nacional de salud de Estados Unidos (del inglés: National Institute of Health)

P: aminoácido prolina

pA: pico amperio

PA: Potencial de acción

PAG: sustancia gris periacueductal (del inglés: periaqueductal gray)

PAM: motivo adyacente al protoespaciador (del inglés: protospacer adjacent motif)

pb: pares de bases

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

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: polymerase chain reaction)

pF: pico Faraday

PFA: paraformaldehído

PFC: Corteza pre-frontal

PKA: proteína quinasa A

PRN: núcleos reticulares de la protuberancia (del inglés: pontine reticular nucleus)

pS: pico Siemens

R: aminoácido arginina

R-Gli: receptor de glicina

REM: movimientos oculares rápidos (del inglés: rapid eye movement)

RM: núcleo magno del Rafe (del inglés: Raphe magnus)

Rpm: revoluciones por minuto

RR: retrorubral

S: aminoácido serina

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

sgRNA: ARN guía (del inglés: single guide RNA)

SI: sustancia innominada

SNC: sistema nervioso central

SNr: sustancia nigra *pars reticulata*

STN: estriquina

T: aminoácido treonina

TH: tirosina hidroxilasa

TM: transmembrana

TTX: tetrodotoxina

VIAAT: transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios (del inglés: vesicular inhibitory aminoacid transporter)

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

VP: núcleo pálido ventral (del inglés: ventral pallidum)

VTA: área tegmental ventral (del inglés: ventral tegmental area)

WT: animal silvestre (del inglés: wild type)

Y: aminoácido tirosina

$\mu\text{M}$ : micro molar

$\mu\text{m}$ : micrometro

$\mu\text{l}$ : microlitro



## Resumen

Las áreas cerebrales que forman el circuito neuronal de recompensa también participan en el control del consumo de etanol. El núcleo Accumbens (nAc) es una importante región de este circuito que expresa receptores de glicina (R-Gli), un canal iónico inhibitorio activado por ligando. Estudios recientes reportaron la presencia de distintas subunidades del R-Gli en el nAc, siendo la  $\alpha 1$  la más prevalente. Se reportó también una mayor sensibilidad a glicina del R-Gli, así como una mayor densidad de corriente en neuronas de tipo D1 MSN del nAc al comparar con las neuronas de tipo D2 MSN. Sin embargo, existe un número de interrogantes que necesitan responderse sobre el rol en el control de la excitabilidad neuronal, la sensibilidad a etanol y la conformación del R-Gli en el nAc.

Este trabajo de tesis, utilizando técnicas como inyección de adenovirus asociados y modelos de ratones modificados genéticamente, se aportó información por primera vez sobre el origen de la inervación glicinérgica en el nAc, la que provenía del mesencéfalo. Además, detectamos corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en neuronas D1 MSN, las que fueron sensibles a bajas concentraciones de etanol (desde 10 mM). Encontramos que etanol causó una disminución significativa en el disparo de potenciales de acción solo en neuronas D1 MSN, implicando un efecto en la denominada vía directa, que favorece las conductas adictivas.

Utilizamos, además un ratón modificado genéticamente, generado por nuestro grupo de colaboradores, denominado KI  $\alpha 2$ , el cual presenta una mutación en residuos que son importantes para la potenciación por etanol cuando se expresa el R-Gli con conformación  $\alpha 2\beta$ . Los R-Gli en neuronas del nAc de este ratón se

potenciaban significativamente menos por etanol que en el ratón WT. Estas neuronas presentaron corrientes tónicas insensibles a etanol, lo cual tampoco provocó cambios en la excitabilidad del nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , lo que si ocurría en el ratón WT. Por lo tanto, apoyando la idea que la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli tendría un rol en la regulación inhibitoria del nAc.

Los resultados obtenidos en los estudios de comportamiento mostraron que el ratón KI  $\alpha 2$  se comportaba de manera similar al ratón WT, lo que implicó que la mutación no afectaba la funcionalidad del receptor. La administración de dosis intoxicantes de etanol (> 2 g/kg) en el ratón KI  $\alpha 2$  mostró que estos se recuperaban más rápido que los WT. Adicionalmente, los ratones KI  $\alpha 2$  consumieron más etanol que los ratones WT en los primeros días de prueba (modelo de *binge drinking*), apoyando una función protectora del R-Gli contra la ingesta excesiva de alcohol.

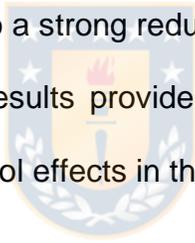
En conclusión, esta tesis permitió responder varias interrogantes sobre la función del R-Gli en el nAc, específicamente en neuronas D1 MSN y su sensibilidad a etanol. La subunidad  $\alpha 2$  posee una función inhibitoria sobre la excitabilidad en el nAc en presencia de etanol, lo que se pierde en el modelo KI. La disminución de la sensibilidad del R-Gli mutado se traduce en una marcada reducción de la sedación y un aumento del consumo de etanol. Todos estos resultados proporcionan nuevos elementos que ayudan a entender las bases neurobiológicas de los efectos de etanol en el cerebro.

## Abstract

The main brain areas that form the neuronal reward circuitry also participate in the control of ethanol consumption. The nucleus Accumbens (nAc) is an important region in this circuitry that expresses glycine receptors (GlyR), an inhibitory ligand activated ion channel. Recent studies reported the presence of different subunits of the GlyR in nAc,  $\alpha 1$  being the most prevalent. Additionally, higher GlyR sensitivity to glycine and a higher current density in D1 MSNs of nAc compared to D2 MSNs. However, there are still remaining questions about the role in excitability, ethanol sensitivity and conformation of the GlyR in nAc. In this thesis, by using techniques such as injections of associated adenovirus and genetically-modified mouse models we provided for the first time, information about the origin of the glycinergic innervation in the nAc. We detected GlyR-mediated tonic currents in D1 MSN, that were potentiated by low concentrations of ethanol. We found that ethanol caused a significant reduction in the number of action potentials only in D1 MSNs, implying an effect in the direct pathway, which is related to addicted behaviors.

We also used a genetically-modified mouse, generated by our collaborators, denoted KI  $\alpha 2$ , which has a mutation in residues that are important for ethanol potentiation when the  $\alpha 2\beta$  GlyR is expressed. In this mouse, the GlyRs in nAc were significantly less potentiated with ethanol than in WT mice. The tonic currents mediated by GlyRs were insensitive to ethanol, which did not change the number of action potentials in nAc of the KI  $\alpha 2$  mouse. This supported the idea that GlyR  $\alpha 2$  subunit would have a role in the inhibitory regulation of the nAc.

The results from behavior studies showed that KI  $\alpha 2$  mice do not have motor impairments and behaved similar to WT mice, which implies that the mutation does not affect the functionality of the receptor. When administrating intoxicating doses of ethanol (> 2 g/kg), KI  $\alpha 2$  mice recovered faster than WT mice. In addition, KI  $\alpha 2$  mice consumed more ethanol than WT mice, in the firsts days of the test (binge drinking behavior), supporting a protective role of GlyRs in terms of excessive ethanol intake. In conclusion, this thesis helped to answer different questions about the role of GlyRs in nAc, specifically in D1 MSNs and their sensitivity to ethanol. The  $\alpha 2$  subunit participates in the regulation of the excitability of the nAc in the presence of ethanol, a role that is lost in the KI mouse model. The reduction of the ethanol sensitivity in the mutated GlyR is translated into a strong reduction of sedation and an increased ethanol consumption. All these results provide new elements to understand the neurobiological bases of the ethanol effects in the brain.



## Introducción

El abuso del consumo de alcohol y alcoholismo constituyen una problemática mundial, con un alto costo médico, social y económico (Edelman and Fiellin 2016, GBD Collaborators 2018). En 2016, el abuso de alcohol resultó en 3 millones de muertes en el mundo (5.3% de todas las muertes). Un mayor número de casos de los causados por tuberculosis, VIH y diabetes juntos (World Health Organization 2018). Entre las principales causas de muerte atribuibles al consumo de alcohol están los accidentes e injurias (28.7%), trastornos digestivos (21.3%), enfermedades cardiovasculares (19%), enfermedades infecciosas (12.9%), cáncer (12.6%), trastornos asociados al uso de alcohol (4.9%) y epilepsia (0.6%). Según la Organización Mundial de la Salud, el consumo total *per cápita* en la población mundial sobre 15 años, aumentó de 5.5 litros de alcohol puro a 6.4 desde el 2005 al 2016. Siendo los países de la región europea del este los de mayor consumo a nivel mundial. Por otro lado, Chile está dentro de los países con mayor consumo en toda América (World Health Organization 2018). Lo anterior convierte el estudio del abuso de alcohol y alcoholismo en un área de alto interés en la disciplina de investigación biomédica.

A pesar de esto, actualmente el tratamiento efectivo para el abuso de alcohol y alcoholismo alcanza sólo un bajo porcentaje de los individuos que padecen estos trastornos (World Health Organization 2018). Dentro de los medicamentos aprobados por la FDA se encuentran acamprosato (comercializado en Chile como Campral), disulfiram (Antabus) y naltrexona (Nalerona), los cuales no son muy efectivos y poseen muy baja adherencia en los pacientes (Farokhnia, Browning et

al. 2019). Por esta razón, es necesario enfocar el estudio a la generación de nuevas opciones terapéuticas. Teniendo en consideración que para poder lograr identificar un blanco terapéutico óptimo, primero es importante conocer el funcionamiento de las regiones cerebrales que controlan los procesos adictivos y como se ven afectadas por alcohol.

### Sistema de Recompensa.

La adicción a una droga se define como una búsqueda compulsiva de una sustancia a pesar las consecuencias desfavorables que pueda traer, esto ocurre por la inducción de cambios celulares duraderos en regiones cerebrales específicas (Nestler 2001, Nestler 2013). Algunos de estos cambios incluyen el aumento de transmisión sináptica, aumento en vías de señalización, sobre-activación de CREB y  $\Delta$ FosB, lo que provoca cambios a nivel genómico para finalmente llegar a tener cambios sinápticos permanentes como potenciación a largo plazo y aumento del número de espinas dendríticas (Nestler 2001, Hyman, Malenka et al. 2006). Estas regiones cerebrales que se ven principalmente afectadas componen un circuito neuronal que es crucial para el procesamiento de estímulos recompensantes naturales como la comida, el agua y el sexo, y para promover la búsqueda de la recompensa asociada a su ejecución. Este circuito es denominado sistema de recompensa, que también es utilizado por las drogas de abuso, como alcohol, para promover su consumo (Russo and Nestler 2013, Koob and Volkow 2016).

Este sistema mesolímbico incluye neuronas dopaminérgicas desde el área tegmental ventral (VTA) que inervan las neuronas del núcleo Accumbens (nAc) y la

corteza prefrontal (PFC) (Nestler 2013). El nAc es una región integradora importante que recibe aferencias excitatorias glutamatérgicas desde la amígdala, PFC e hipocampo, cuya activación determinará si finalmente promueve la búsqueda de un estímulo recompensante o placentero mediante la desinhibición del tálamo y la corteza cerebral (Russo and Nestler 2013, Volkow and Morales 2015). A pesar de los distintos blancos y mecanismos de acción de algunas drogas de abuso, todas tendrían un final común, que es el aumento de la liberación de dopamina (DA) desde terminales de neuronas del VTA hacia el nAc (Di Chiara and Imperato 1988). Por lo tanto, es relevante el estudio de la regulación inhibitoria de este núcleo cuando se ve sobre-activado por la acción de alguna droga.



### Núcleo Accumbens (nAc)

El nAc es un núcleo del prosencéfalo basal ubicado en la región ventral del cuerpo estriado. Está formado por neuronas GABAérgicas denominadas neuronas espinosas medianas (MSN, del inglés: medium spiny neurons), las cuales pueden ser D1 MSN si expresan el receptor de dopamina de tipo D<sub>1</sub>, o D2 MSN si expresan el receptor de tipo D<sub>2</sub> de dopamina (Russo and Nestler 2013, Volkow and Morales 2015). Los receptores de DA pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. Los D<sub>1</sub>R están acoplados a proteínas G<sub>s</sub> y los D<sub>2</sub>R a proteínas G<sub>i/o</sub> (Brunton, Chabner et al. 2011). Se ha reportado que la activación de los receptores de tipo D<sub>1</sub> provocan un aumento en la excitabilidad neuronal, mediante la activación de la adenilil ciclasa y PKA, lo que resulta en la activación de

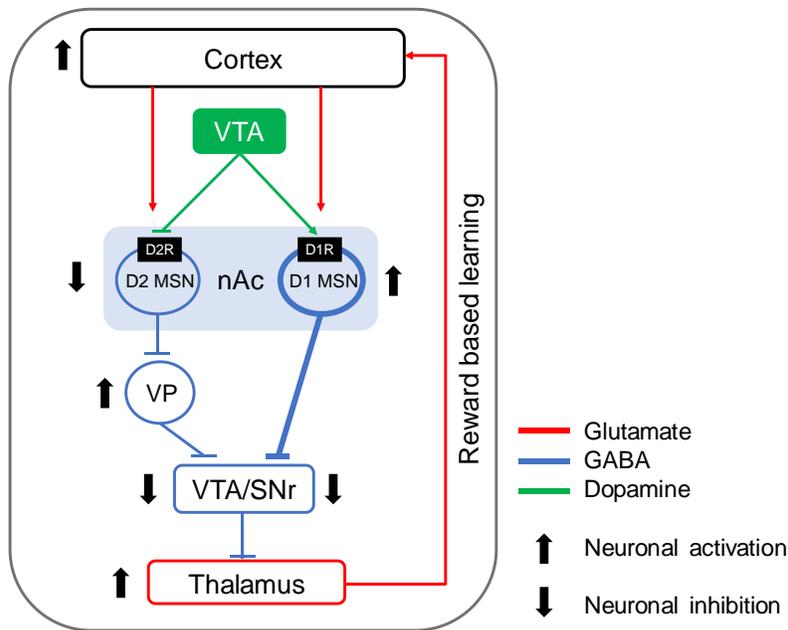
canales de calcio de tipo L y en la inhibición de canales de potasio (Lavin and Grace 2001, Lobo and Nestler 2011, Cui, Li et al. 2017).

Las neuronas MSN son morfológicamente idénticas y componen alrededor del 95% del nAc, pero se diferencian no solo por el receptor de DA que expresan, sino que también por la expresión de otros receptores de membrana y la co-liberación de neuropéptidos junto con GABA. Por ejemplo, las D1 MSN expresan los receptores metabotrópicos de adenosina A1, los receptores colinérgicos M<sub>4</sub> y co-liberan dinorfinas y sustancia P junto con GABA; en cambio las D2 MSN expresan los receptores metabotrópicos de adenosina A2a y co-liberan encefalinas y neurotensinas con GABA (Smith, Lobo et al. 2013).

Varios estudios han identificado que las eferencias del nAc determinan 2 vías, una directa dada por las neuronas D1 MSN y una indirecta dada por las neuronas D2 MSN (Smith, Lobo et al. 2013). Ambas vías finalmente convergen en el VTA y en la sustancia nigra *pars reticulata* (SNr), las cuales se desinhiben para posteriormente regular la activación del tálamo y la corteza cerebral (figura 1). Las neuronas D1 MSN proyectan directamente hacia el VTA y la SNr, y las D2 MSN proyectan al núcleo pálido ventral y luego neuronas de ese núcleo finalizan en el VTA y SNr (Nakanishi, Hikida et al. 2014). Con respecto al rol de cada una de estas vías, se ha postulado que el comportamiento adictivo de búsqueda de alguna droga está asociado a la vía directa, y el comportamiento aversivo a la vía indirecta (Bahi and Dreyer 2012, Hikida, Yawata et al. 2013, Nakanishi, Hikida et al. 2014). Por ejemplo, cocaína produce potenciación a largo plazo en sinapsis glutamatérgicas en las D1 MSN del nAc (Dobi, Seabold et al. 2011, Bock, Shin et al. 2013, Roberts-Wolfe and Bobadilla 2018), y también provoca la formación y mantención de nuevas espinas

dendríticas (Lee, Kim et al. 2006). Cambios funcionales y estructurales han sido también reportados luego de la administración prolongada o consumo prolongado de etanol en D1 MSN del estriado medio-dorsal (Wang, Cheng et al. 2015, Cheng, Huang et al. 2017), y en D1 MSN del nAc luego de la exposición crónica intermitente de vapor de etanol (Jeanes, Buske et al. 2011, Renteria, Maier et al. 2017). Es por esto que las neuronas D1 MSN del nAc son un blanco importante para el estudio del consumo de etanol.





**Figura 1. Esquema resumido del sistema de recompensa**

Las neuronas del núcleo Accumbens (nAc) reciben aferencias excitatorias desde la corteza, y con un estímulo recompensante natural o alguna droga de abuso, las neuronas del área tegmental ventral (VTA) liberan dopamina (DA) en el nAc. Cuando se activa la vía directa, DA se une al receptor de tipo D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>R) en las D1 MSNs y se activan estas neuronas GABAérgicas, por lo tanto, inhiben a las neuronas del VTA y de la sustancia nigra *pars reticulata* (SNr), la cual deja de liberar GABA y se desinhibe el tálamo que ahora puede activar la corteza cerebral liberando glutamato. Cuando se activa la vía indirecta, DA activa los receptores de tipo D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>R) los cuales están acoplados a una proteína G inhibitoria, y estas neuronas se inhiben, por lo tanto, se activan las neuronas del núcleo pálido ventral (VP), las que liberan GABA e inhiben al VTA y la SNr, desinhibiendo al tálamo y la corteza. Por ambas vías, cuando se libera DA por acción de un estímulo recompensante, se promueve la búsqueda de este. Generando el fenómeno de aprendizaje basado en la recompensa (esquema modificado de Nakanishi, Hikida et al. (2014)).

## Etanol en sistema nervioso central

Etanol es una droga depresora que afecta múltiples sistemas del organismo al ser consumida (Brunton, Chabner et al. 2011). Luego de la administración oral, etanol se reabsorbe rápidamente al torrente sanguíneo desde el estómago y el intestino delgado. Presenta un rápido metabolismo hepático mediado por las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) a acetaldehído y luego por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) a acetato. Una pequeña cantidad de etanol es excretada en la orina, sudor y respiración, pero el metabolismo a acetato es responsable de aproximadamente el 90 % del metabolismo del etanol ingerido (Brunton, Chabner et al. 2011).

Etanol posee efectos a nivel cardiovascular, en hígado, estómago, intestinos, aumenta la diuresis, entre otros (Brunton, Chabner et al. 2011). En el SNC, con dosis bajas hasta 12 mM, posee efectos ansiolíticos y eufóricos, y a medida que la dosis se incrementa, provoca enlentecimiento de reflejos, incoordinación motora y alteraciones en funciones cognitivas (Spanagel 2009, Abrahao, Salinas et al. 2017). Es por esto que los niveles sanguíneos de etanol que se asocian con intoxicación legal, tanto en Chile como en otros países corresponden a 80 mg/dl (17mM). Concentraciones hasta 50 mM de etanol aumentan las alteraciones locomotoras y cognitivas y provoca sedación. Sobre estos niveles, la sedación y la depresión respiratoria puede llevar a un estado de coma o a la muerte (Abrahao, Salinas et al. 2017).

Estudios han demostrado que etanol ejercería su acción en el SNC a través de canales iónicos activados por ligando. El receptor de GABA<sub>A</sub> fue uno de los principales canales iónicos activados por ligando que se atribuyeron los efectos de

etanol (Brunton, Chabner et al. 2011, Abrahao, Salinas et al. 2017, Söderpalm, Lidö et al. 2017). Estudios realizados en neuronas espinales y en motoneuronas del troco encefálico, mostraron la inhibición de receptores de tipo NMDA de glutamato y potenciación del receptor de GABA<sub>A</sub>, en ambos casos con altas concentraciones de etanol (Aguayo, Tapia et al. 1996, Sebe, Eggers et al. 2003). Sin embargo, etanol provocaría una potenciación considerablemente mayor del receptor de glicina, incluso a concentraciones bajas (Aguayo, Tapia et al. 1996). Esto sugiere que el receptor de glicina es más sensible a la modulación por etanol, por lo que es importante su estudio en el marco de los efectos de etanol.

### Receptor de Glicina (R-Gli)

El R-Gli pertenece a la familia de los canales iónicos activados por ligando junto con el receptor de GABA<sub>A</sub>, receptor nicotínico de acetilcolina y el receptor ionotrópico de serotonina (5-HT<sub>3</sub>). El R-Gli corresponde a un canal iónico pentamérico permeable al ion cloruro, al activarse por su ligando glicina promueve el influjo de cloruro a las células lo que causa una hiperpolarización de estas y reduciendo su excitabilidad (Lynch 2009, Burgos, Muñoz et al. 2015). El receptor está formado por subunidades  $\alpha$  (1-4) y  $\beta$ , y se pueden generar receptores funcionales homoméricos solo con subunidades  $\alpha$ , o heteroméricos con subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . No así la subunidad  $\beta$  la cual no forma un pentámero funcional por si sola (Burgos, Muñoz et al. 2015). Entre las subunidades  $\alpha$  existe una identidad de estas proteínas de alrededor de un 80%, sin embargo, difieren en propiedades fisiológicas como conductancia, afinidad aparente al ligando, desensibilización y cinética del canal (Betz and Laube 2006,

Lynch 2009). A partir de estudios de crio-microscopía electrónica y cristalografía de rayos X se determinó la estructura de las subunidades del R-Gli (Du, Lü et al. 2015, Huang, Chen et al. 2015), las cuales presentan un dominio N-terminal extracelular (ECD), 4 dominios transmembrana (TM1-4), un loop intracelular (IL) que conecta los TM3 y TM4 y finalmente un extremo C-terminal extracelular. Estos estudios reportaron que glicina interacciona con los aminoácidos R65, T204, Y202, S129, F159, y P207 en el sitio de unión al ligando, el que se ubica en la interface del ECD de 2 subunidades, confirmando la información que se había obtenido de estudios funcionales y de mutagénesis en el sitio de unión (Huang, Chen et al. 2015, Burgos, Yévenes et al. 2016). Adicionalmente, se obtuvieron datos importantes sobre los cambios conformacionales que se generan en el receptor para la apertura y cierre del canal de cloruro en presencia de su agonista glicina o estriquina (STN), el principal bloqueador del R-Gli. Por ejemplo, la activación con glicina, provoca una rotación de la sección superior del ECD alrededor del eje del poro, mientras que su sección inferior se inclina hacia el centro del poro. Estos cambios conformacionales se transfieren a los TM, donde el TM2 que forma el poro, rota para producir la apertura del canal (Burgos, Yévenes et al. 2016).

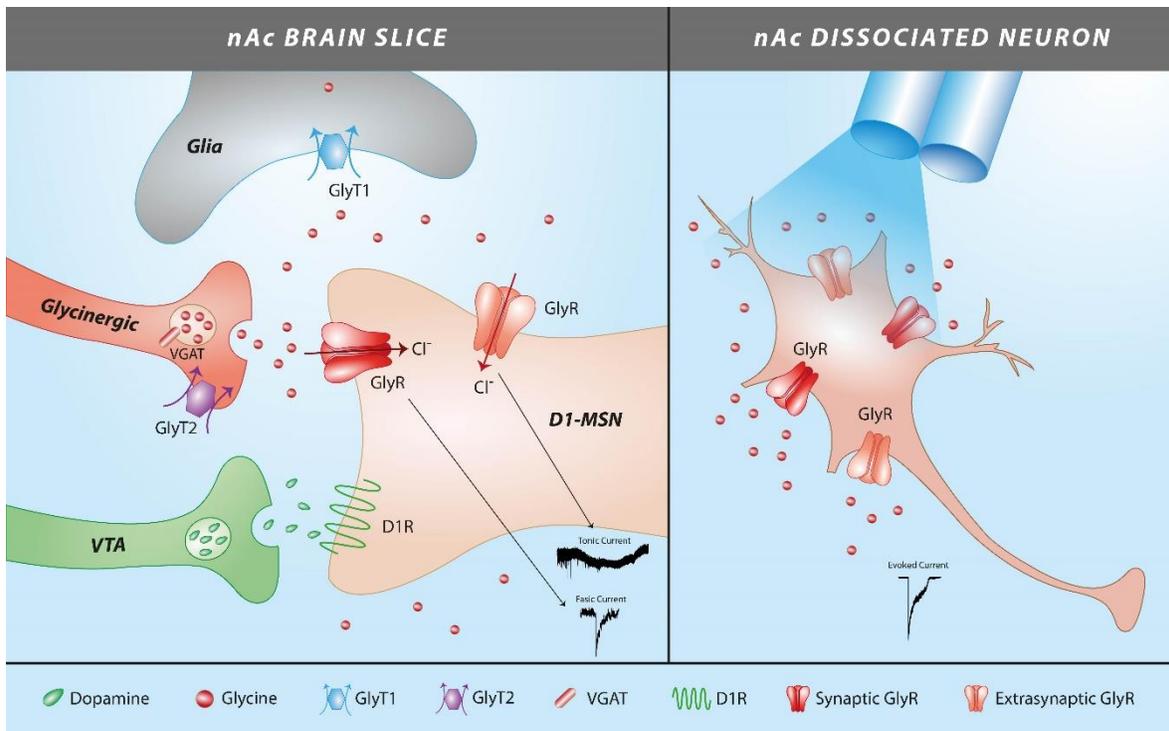
En una sinapsis glicinérgica, en el terminal presináptico se encuentran las vesículas con glicina, las cuales se cargan con glicina a través del transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios, VIAAT (transporta tanto glicina como GABA). Y la glicina proviene de la síntesis desde el aminoácido serina mediante la acción de la enzima serina-hidroximetiltransferasa, pero además por la recaptación de la glicina circundante (Legendre 2001). Se liberan las vesículas con glicina al espacio sináptico y en el terminal postsináptico se encuentran los R-Gli los cuales pueden

ser de tipo sináptico, los que median las corrientes de tipo fásicas, y los receptores extra-sinápticos (fuera de la zona de densidad postsináptica), los cuales median las corrientes de tipo tónicas (figura 2) y que se activan con la glicina que difundió de la sinapsis, lo que se denomina el *spillover* de la sinapsis (Legendre 2001, Dutertre, Becker et al. 2012, Maguire, Mitchell et al. 2014). Los niveles de glicina en el espacio sináptico (aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ ), se regulan por la acción de dos transportadores, los GlyT1 que se expresan en celular gliales y los GlyT2 que se expresan en las neuronas presinápticas que liberan glicina, por esto es que este transportador se utiliza como marcador de neurona glicinérgica (Legendre 2001, Eulenburg, Armsen et al. 2005, Harvey and Yee 2013). Los GlyT1 y GlyT2 pertenecen a la familia de los co-transportadores de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . GlyT1 transporta glicina con una estequiometría de  $2\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{glicina}$ , mientras que los GlyT2 lo hacen con  $3\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{glicina}$  (Legendre 2001, Eulenburg, Armsen et al. 2005).

El R-Gli se encuentra mayormente expresado en médula espinal y tronco encefálico, donde la subunidad  $\alpha 1$  es la más prevalente. Y sus principales funciones involucran la regulación de ritmos respiratorios, coordinación motora, procesamiento sensorial y transmisión del dolor (Burgos, Muñoz et al. 2015). Actualmente se reconoce la presencia del R-Gli en retina (Sanchez-Chavez, Velazquez-Flores et al. 2017), y en regiones cerebrales supraespinales (Jonsson, Morud et al. 2012), entre ellas, corteza prefrontal (Salling and Harrison 2014), núcleo dorsal del rafe (Maguire, Mitchell et al. 2014), amígdala (Delaney, Esmaeili et al. 2010), hipocampo, cuerpo estriado (McCracken, Lowes et al. 2017, Molchanova, Comhair et al. 2018) y núcleo Accumbens (Förstera, Muñoz et al. 2017, Muñoz, Yevenes et al. 2018). El hallazgo

que el R-Gli esté presente en el nAc sugiere alguna función en la regulación del circuito de recompensa, ya que este núcleo se activa con el consumo de etanol, y es importante que se mantenga un balance excitatorio/inhibitorio en el circuito. Concordantemente, varios estudios *in vivo* han relacionado la activación del R-Gli en el nAc con la regulación de los niveles de DA en el nAc (Molander and Söderpalm 2005, Lidö, Ericson et al. 2011) y con el consumo de etanol (Molander, Löf et al. 2005, Molander, Lidö et al. 2007). Por ejemplo, la administración por microdiálisis de STN en el nAc, provocó que ratas consumieran más etanol comparado con las que se le administró una solución salina (Molander, Löf et al. 2005). Es por esto que esta tesis se enfocó en el rol del R-Gli en el nAc y en el consumo de etanol.





**Figura 2. Transmisión glicinérgica en nAc y tipos de R-Gli**

Esquema muestra las sinapsis dopaminérgicas y glicinérgicas en el nAc. En la transmisión glicinérgica se observa el terminal presináptico con las vesículas con glicina, para el llenado de estas se requiere del transportador VGAT o VIAAT (el nombre VGAT, transportador vesicular de GABA, proviene porque este transportador es utilizado tanto por GABA y por glicina). Las vesículas liberan glicina en el espacio sináptico las que activarán los R-Gli en la postsinapsis. Dependiendo del tipo de R-Gli se pueden realizar distintos registros electrofisiológicos. En esta tesis, los registros en rebanadas de nAc permitieron registrar 2 tipos de corrientes glicinérgicas; las corrientes fásicas o sinápticas mediadas por R-Gli sinápticos; y corrientes tónicas mediadas por R-Gli extrasinápticos. Los experimentos en neuronas disociadas del nAc permitieron evocar respuestas que activan tanto receptores sinápticos como extrasinápticos. Estos registros proveen un mejor y más simple análisis cuando se perfunde alguna molécula moduladora como etanol.

### Potenciación del R-Gli por etanol.

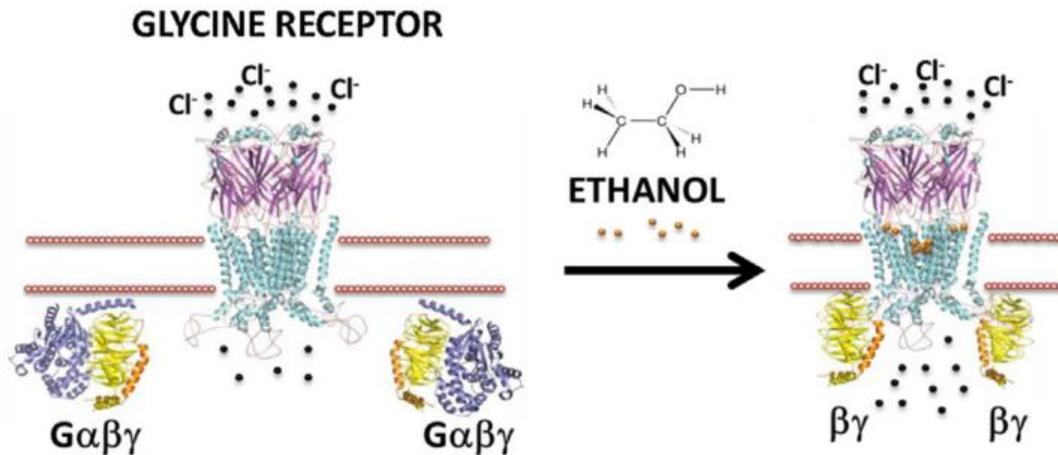
Etanol es un modulador alostérico positivo de los R-Gli, potencia la corriente de glicina, lo que desplaza la curva de concentración-respuesta hacia la izquierda provocando una disminución del  $EC_{50}$  de glicina, sin cambios en las corrientes máximas (Aguayo, Tapia et al. 1996, Yevenes and Zeilhofer 2011). Los mecanismos de acción que se han propuesto sobre etanol en los R-Gli, incluyen una acción directa por un bolsillo de unión en el TM2-3 (Mihic, Ye et al. 1997), y una acción indirecta mediante la modulación del dímero  $G\beta\gamma$  (proveniente de la disociación de la proteína G heterotrimérica) en el IL (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008). Esta última, ha sido la única capaz de explicar los efectos de bajas concentraciones de etanol y la especificidad de este en la potenciación de las corrientes del R-Gli (figura 3) (Burgos, Muñoz et al. 2015).



Se ha estudiado que la presencia de residuos básicos 316RFRRK320 y 385KK386 del loop intracelular de la subunidad  $\alpha 1$  del R-Gli son importantes para la modulación del receptor por  $G\beta\gamma$  (Yevenes, Peoples et al. 2003, Yevenes, Moraga-Cid et al. 2006, Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008). Mediante estudios de GST pull down, se evidenció que  $G\beta\gamma$  se une a la subunidad  $\alpha 1$ , y cuando se realizaron mutaciones en estos residuos del receptor, la unión a  $G\beta\gamma$  se disminuía significativamente (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2006) y con registros de electrofisiología se observaba una disminución en la potenciación por etanol (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008). Siendo importante destacar que las mutaciones en estos sitios del IL de  $\alpha 1$ , no causaban cambios en la función inhibitoria del canal. Adicionalmente, el efecto causado por anestésicos generales y otros n-alcoholes,

como butanol, no fue afectado. Lo que sugiere que este mecanismo es selectivo para etanol (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008). Interesantemente, estos estudios también fueron realizados en la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli. Los residuos básicos homólogos al de  $\alpha 1$ , 389KR390 también son capaces de unir  $G\gamma\beta$ , sin embargo, el receptor  $\alpha 2$  homomérico no es potenciado por etanol (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2010).

Estudios no publicados del laboratorio, utilizando células HEK-293, muestran que diferentes conformaciones del R-Gli presentan distinta sensibilidad a etanol. Con 100 mM de etanol, el receptor homomérico  $\alpha 1$  se potencia aproximadamente un 50%,  $\alpha 2$  homomérico prácticamente no se potencia por etanol, el receptor  $\alpha 1\beta$  se potencia un 20%, e interesantemente el receptor  $\alpha 2\beta$  se potencia un 100% (Muñoz et al. en preparación). Estos datos sugieren que la subunidad  $\beta$  convierte al receptor  $\alpha 2$  insensible a etanol, en un receptor altamente sensible. Si bien los mecanismos aún no se han dilucidado, los resultados proponen al receptor  $\alpha 2\beta$  como un importante blanco de estudio.



**Figura 3. Esquema de potenciación del R-Gli por etanol mediado por G $\beta\gamma$**

Cuando glicina se une al R-Gli provoca cambios conformacionales que llevan a la apertura del canal iónico lo que produce un aumento en la entrada de iones cloruro (círculos negros). Etanol (círculos naranjos) aumenta la corriente activada por glicina lo que provoca un mayor ingreso de iones cloruro a las células. Este efecto potenciador lo realiza etanol mediante la interacción directa en una región específica en el TM2-3, o por una modulación intracelular mediada por el dímero G $\beta\gamma$  que proviene de la disociación luego de la activación de una proteína G heterotrimérica. El dímero G $\beta\gamma$  se une al R-Gli en residuos básicos del loop intracelular entre el TM3-TM4. Trabajo de Yévenes et al. 2008 y esquema de Burgos et al. 2015. (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008, Burgos, Muñoz et al. 2015).

## Contexto de estudio.

En el contexto del estudio del rol del R-Gli en el nAc, trabajos realizados en nuestro laboratorio han permitido concluir que corrientes sinápticas activadas por glicina son insensibles a etanol en esta región del sistema de recompensa (Muñoz, Yevenes et al. 2018). Sin embargo, el análisis de las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli demostró que estas si eran potenciadas por concentraciones altas de etanol (100 mM) (Förstera, Muñoz et al. 2017). Si bien estos estudios reportaron la presencia de transmisión glicinérgica en el nAc, tanto sináptica como tónica, **aún se desconoce el origen de las fibras que liberan glicina en el nAc y que estarían activando los receptores.**

El estudio previo de un ratón modificado genéticamente que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor de GlyT2, el transportador neuronal de glicina, se inmunodetectó la presencia de neuronas glicinérgicas de manera extensa en medula espinal, tronco encefálico y cerebelo, como era de esperar (Zeilhofer, Studler et al. 2005). Sin embargo, también existían regiones cerebrales que recibían una densa inervación glicinérgica, como hipotálamo, núcleos intralaminares del tálamo y el prosencéfalo basal (cerebro anterior). Regiones como el bulbo olfatorio, estriado, neocorteza, hipocampo y amígdala presentaban considerablemente menos inervación glicinérgica (Zeilhofer, Studler et al. 2005). El nAc que se ubica en el prosencéfalo basal, presentaría inervación glicinérgica, sin embargo, se desconoce la región de donde provienen las neuronas glicinérgicas. Es por esto, que una de las actividades de esta tesis, fue la identificación del origen de las fibras

glicinérgicas que inervan al nAc mediante el uso de retromarcadores inyectados en el nAc.

Continuando con los R-Gli en el nAc, los datos anteriormente publicados con respecto a la sensibilidad de los R-Gli que median las corrientes tónicas de glicina (Förstera, Muñoz et al. 2017), dejan la interrogante sobre si estas **corrientes de glicina en el nAc son sensibles a concentraciones farmacológicas de etanol, como 10 o 50 mM**, tal como ocurre en medula espinal y tronco encefálico (Aguayo, Tapia et al. 1996, Aguayo, Castro et al. 2014). Por esta razón, en esta tesis nos enfocamos en el registro de corrientes tónicas mediadas por el R-Gli y los efectos de bajas concentraciones de etanol en el nAc.

Por otra parte, el estudio de los dos grandes grupos neuronales del nAc, las neuronas D1 y D2 MSN, mediante registros electrofisiológicos se encontraron diferencias entre ambas neuronas con respecto al R-Gli. Las D1 MSN (referidas en los experimentos como D1(+) MSN) presentan una mayor sensibilidad a glicina comparado con las D1(-) MSN, los valores de  $EC_{50}$  obtenidos de la curva concentración respuesta fueron de  $38 \pm 4 \mu\text{M}$  para D1(+) MSN y  $61 \pm 22 \mu\text{M}$  para D1(-). Esto además fue acompañado de corrientes de glicina de mayor amplitud y una mayor densidad de corriente,  $22 \pm 5 \text{ pA/pF}$  y  $7 \pm 1 \text{ pA/pF}$  en D1(+) y D1(-), respectivamente (Förstera, Muñoz et al. 2017). Con respecto a la sensibilidad a etanol, solo se analizaron los efectos de 100 mM, y se encontró que tanto las neuronas D1(+) y D1(-) potenciaron con esta alta concentración. Lo que

nuevamente deja la interrogante sobre los **efectos de bajas concentraciones de etanol en los R-Gli en las D1(+) y D1(-) MSNs**, y si esto también evidenciaría una diferencia entre ellas. Esto es relevante, que ya es probable que el inicio de las acciones adictivas de etanol en el sistema nervioso comience con concentraciones bajas, por ejemplo, las que se alcanzan con 2 a 3 bebidas alcohólicas (10-20 mM).

Un tercer ámbito que no ha sido estudiado con respecto al R-Gli en el nAc, es su composición de subunidades. Datos de RT-PCR han mostrado la presencia de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$  (Jonsson, Morud et al. 2012, Förstera, Muñoz et al. 2017). Para estudiar la función de la subunidad  $\alpha 1$ , se utilizó un modelo de ratón modificado genéticamente, denominado KI  $\alpha 1$ , el cual presenta una mutación en dos residuos básicos (lisinas) del loop intracelular de la subunidad  $\alpha 1$  a alaninas (KK385-386AA). Estos residuos son importantes para la potenciación por etanol del R-Gli que es mediada por el dímero  $G\beta\gamma$ , como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, esta mutación genera un R-Gli  $\alpha 1$  significativamente menos sensible a etanol (Aguayo, Castro et al. 2014). Además, registros electrofisiológicos en el nAc del ratón KI  $\alpha 1$ , mostraron que en esta región alrededor del 80% de las neuronas registradas no potenciaron con etanol, esto indica que un alto porcentaje de las neuronas del nAc expresan la subunidad  $\alpha 1$ . Sin embargo, deja abierta la posibilidad de que otra subunidad del R-Gli también esté ejerciendo una función en el nAc. Por esta razón, se cree que en el nAc existiría una población heterogénea de R-Gli que debería ser estudiada con más detalles. Es por esto que también enfocamos el estudio de esta

tesis a la **subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli por estar expresada en el nAc y porque la conformación  $\alpha 2\beta$  del receptor es altamente sensible a etanol.**

Por último, el estudio de comportamiento del ratón KI  $\alpha 1$  (KK385-386AA) mostró un mayor consumo y preferencia por etanol (Muñoz, Gallegos et al. 2019), nuevamente destacando el rol de la subunidad  $\alpha 1$  en el nAc, y como la inhibición de la potenciación de etanol en el R-Gli puede tener un impacto en el comportamiento del animal. Estudios de comportamiento sobre el posible rol de la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli son escasos. La subunidad  $\alpha 2$  ha sido generalmente descrita como una subunidad importante temprano en el desarrollo del SNC. Está altamente expresada en roedores en estadios embrionarios y neonatales, para luego ser reemplazada por  $\alpha 1$  en la medula espinal de roedores juveniles y adultos (Malosio, Marquèze-Pouey et al. 1991, Aguayo, van Zundert et al. 2004).

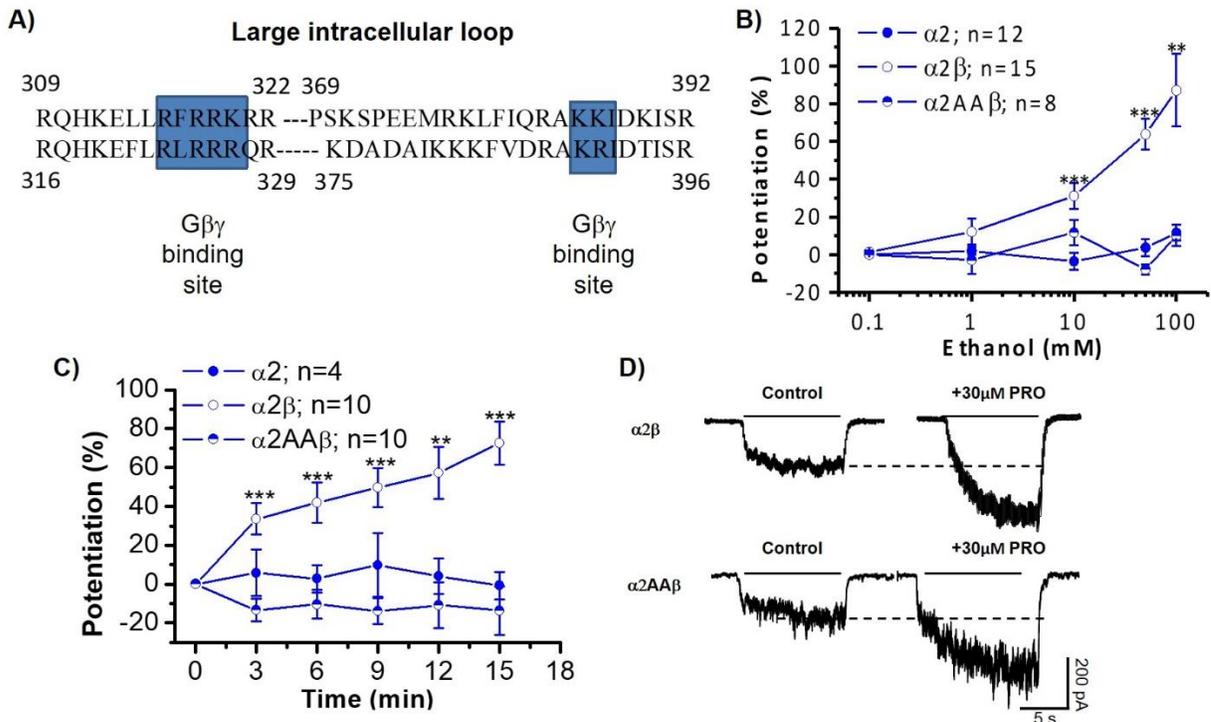
Se destaca un estudio de la subunidad  $\alpha 2$  que utilizó un modelo de animal knock-out (KO) para  $\alpha 2$ , y reportó que esta subunidad era importante para la migración neuronal cortical durante la embriogénesis (Avila, Vidal et al. 2013). Si bien los animales KO  $\alpha 2$  sobreviven, estos muestran déficits en memoria de reconocimiento a corto y largo plazo y presentan una alterada potenciación a largo plazo en PFC cuando son comparados con ratones silvestres (referidos como Wild-type, WT en la tesis) (Pilorge, Fassier et al. 2016). Otro estudio utilizando ratones KO  $\alpha 2$  reportó una reducción en el consumo de etanol y aumento de aversión a este (Blednov, Benavidez et al. 2015). Sin embargo, los estudios que utilizan animales KO presentan potenciales compensaciones, y en una mayor medida cuando se trata de

genes que son importantes en el desarrollo embrionario como es el del R-Gli  $\alpha 2$ . Teniendo esto en consideración, es que para el análisis de la posible función de la subunidad  $\alpha 2$  en el nAc de ratones adultos, además del comportamiento de estos animales frente a etanol, en esta tesis usamos un modelo de ratón modificado genéticamente, denominado KI  $\alpha 2$ , el cual presenta mutaciones en dos residuos básicos del loop intracelular KR389-390AA, homólogos a los encontrados en el R-Gli  $\alpha 1$  y mutados en el modelo del ratón KI  $\alpha 1$ .

Estudios previos a la generación del ratón KI  $\alpha 2$ , identificaron que la conformación  $\alpha 2\beta$  era altamente sensible a etanol como se mencionó anteriormente, y que la subunidad  $\beta$  sería importante en la modulación del receptor  $\alpha 2\beta$  por  $G\beta\gamma$ . Por lo tanto, cuando se mutaba la subunidad  $\alpha 2$  en los residuos que unen a  $G\beta\gamma$  (KR389-390), la conformación  $\alpha 2\beta$  dejaba de ser potenciada por etanol (Muñoz et al. en preparación). La figura 4 muestra los principales resultados realizados en células HEK-293 donde se analiza la mutación KR389-390AA en  $\alpha 2$ . Se muestra que la conformación  $\alpha 2\beta$  se potencia por etanol (figura 4B) y se potencia con el uso de un análogo no hidrolizable de GTP ( $GTP\gamma S$ ) lo que relaciona la potenciación con acción del dímero  $G\beta\gamma$  (figura 4C). Y cuando la subunidad  $\alpha 2$  mutada se co-expresaba con  $\beta$  ( $\alpha 2AA\beta$ ), el receptor no se potenciaba por etanol y tampoco por  $GTP\gamma S$ . Por último, es importante destacar que esta mutación no afectaba la potenciación del receptor por propofol, por lo tanto, estos residuos del loop intracelular eran específicos para la modulación de etanol (figura 4D).

Teniendo en consideración lo anteriormente mencionado, es que se generó el ratón KI  $\alpha 2$ , un modelo nuevo de estudio que no presenta las compensaciones de un modelo KO, y que presenta un R-Gli con mutaciones que no afectan el canal iónico y que son específicas para la modulación por etanol. De esta manera, el uso del animal KI  $\alpha 2$  permitió analizar el rol de la subunidad  $\alpha 2$  en el nAc y en el comportamiento frente a la administración y en el consumo de etanol.





**Figura 4. Antecedentes de la mutación KR389-390AA en el R-Gli  $\alpha 2\beta$**

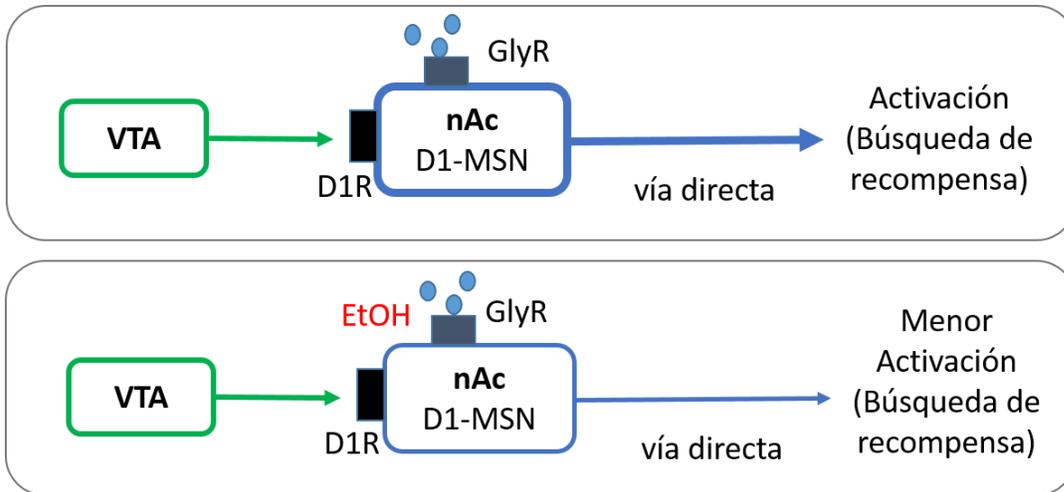
A) La secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en el loop intracelular. En azul se marcan los aminoácidos básicos que unen a  $G\beta\gamma$ , KR389-390 en  $\alpha 2$ . B) Gráfico muestra datos de registros electrofisiológicos realizados en células HEK-293 transfectadas con plásmidos para expresar la subunidad  $\alpha 2$  homomérica,  $\alpha 2\beta$ , y  $\alpha 2\beta$  con la mutación KR389-390AA ( $\alpha 2AA\beta$ ). Se muestran los efectos de etanol (0.1 a 100 mM), la conformación  $\alpha 2\beta$  comienza a potenciar con 10 mM, mientras que  $\alpha 2$  y  $\alpha 2AA\beta$  no potencian. C) Gráfico muestra que la potenciación por  $GTP\gamma S$  del R-Gli se pierde con la mutación en  $\alpha 2AA\beta$ . D) Trazos de corrientes de glicina muestran que los residuos KR389-390 en  $\alpha 2\beta$  y mutados en  $\alpha 2AA\beta$  no afectan la potenciación del R-Gli por propofol, ya que estos residuos son específicos para la modulación por etanol.

Datos de Muñoz et al. en preparación.

De acuerdo a lo expuesto en la introducción, esta tesis tuvo como finalidad responder a las interrogantes aun presentes en el contexto del estudio sobre el rol de las subunidades del R-Gli en el nAc, una región importante del sistema de recompensa. Y como la presencia y activación de este receptor puede afectar el comportamiento de animales, en este caso de ratones.

Como el R-Gli es un receptor inhibitorio y en presencia de etanol se potencia este efecto inhibitorio, es que planteamos que los R-Gli presentes en las neuronas D1 MSN del nAc, al ser activados por glicina y luego potenciados por etanol regulan la excitabilidad de estas neuronas, lo que modifica la actividad del nAc y por consiguiente el comportamiento de los animales en cuanto a la búsqueda de la recompensa que en este caso es etanol (figura 5).





**Figura 5. Modelo de trabajo**

En las D1 MSN del nAc está presente el R-Gli que cuando se activa con glicina por corrientes tónicas, no es suficiente para contrarrestar la activación de estas neuronas cuando el VTA libera dopamina luego del consumo de etanol. Lo que mantiene la vía directa activa y se promueve la búsqueda de la recompensa, es decir, consumir nuevamente etanol. Cuando el R-Gli se activa por glicina, pero además se potencia por etanol, provoca una inhibición mayor en las D1 MSN, por lo que regula la activación de la vía directa. Si no existe esta potenciación por etanol, la vía directa permanece activa y se favorece el consumo y preferencia por etanol.

## Hipótesis

Por lo indicado anteriormente, la presencia de distintas subunidades del R-Gli en las neuronas del nAc, su capacidad de ser potenciado por etanol, y como esto puede regular la actividad del nAc, lo que podría repercutir en el comportamiento adictivo de etanol, es que nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

**“La inhibición de la potenciación de etanol sobre el receptor de glicina en neuronas D1 MSN del núcleo Accumbens aumenta el consumo y preferencia por etanol”.**



## Objetivos

**Objetivo General:** Determinar si la alteración de la sensibilidad a etanol del receptor de glicina en las neuronas D1 MSN del núcleo Accumbens causa cambios en la excitabilidad neuronal, en el consumo y preferencia por etanol

### Objetivos Específicos:

**Objetivo Específico 1: Caracterizar los efectos de etanol sobre las corrientes mediadas por el receptor de glicina en neuronas D1 MSN del nAc, y analizar la excitabilidad de estas neuronas expresando un receptor sensible o menos sensible a etanol.**

**Actividad 1.1:** Determinar la presencia de corrientes mediadas por el R-Gli en el nAc e identificar el origen de las fibras glicinérgicas.

1.1.1 Registro de actividad sináptica glicinérgica en el nAc

1.1.2 Identificar el origen de las fibras glicinérgicas que inervan el nAc

**Actividad 1.2:** Analizar los efectos de concentraciones farmacológicas de etanol en corrientes tónicas en D1 MSN y como etanol puede afectar la excitabilidad de estas neuronas.

1.2.1 Estudiar los efectos de etanol en las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en D1 MSN

1.2.2 Análisis de la excitabilidad de las D1 MSN y los efectos de etanol

1.2.3 Análisis de la excitabilidad de las D2 MSN y los efectos de etanol

**Actividad 1.3:** Análisis de la sensibilidad a glicina y etanol en el nAc de un modelo de ratón que expresa R-Gli alfa 2 con reducida sensibilidad a etanol.

- 1.3.1 Evaluar la sensibilidad a glicina de los R-Gli en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$
- 1.3.2 Análisis de los efectos de etanol en corrientes evocadas de glicina en nAc de ratón KI  $\alpha 2$
- 1.3.3 Evaluar los efectos de etanol en las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$
- 1.3.4 Análisis de la excitabilidad del nAc del ratón KI  $\alpha 2$  y los efectos de etanol

**Objetivo Específico 2: Evaluar el consumo y preferencia de etanol en ratones expresando un R-Gli con menor sensibilidad a la potenciación por etanol.**

**Actividad 2.1:** Evaluación de la actividad motora del ratón KI  $\alpha 2$  en condiciones controles y en respuesta a etanol.

2.1.1 Estudios de comportamiento de la actividad motora basal de ratones KI  $\alpha 2$  y WT

2.1.2 Estudios de comportamiento del ratón KI  $\alpha 2$  y WT frente a la administración de etanol

**Actividad 2.2:** Evaluación del consumo de etanol en ratones KI  $\alpha 2$

2.2.1 Determinación del consumo de etanol con la prueba *Drinking in the dark* (DID) en ratones KI  $\alpha 2$  y WT

2.2.2 Determinación de la concentración de etanol en sangre (BEC) en ratones KI  $\alpha 2$  y WT luego de la prueba de consumo

**Actividad 2.3:** Análisis de la preferencia por etanol en ratones KI  $\alpha 2$

2.3.1 Determinación de la preferencia por etanol en ratones KI  $\alpha 2$  y WT con la prueba *Conditioned place preference* (CPP)

## Materiales y Métodos

### Ratones

Protocolos de experimentación y cuidado animal fueron aprobados por el comité asesor de bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Se siguieron las guías y protocolos éticos de cuidado de animales de experimentación establecidos por NIH (National Institutes of Health, Maryland, EEUU). Hembras y machos de 6-8 semanas de vida fueron usados para experimentos de electrofisiología, y machos y hembras de 10-12 semanas para estudios de comportamiento. Los ratones fueron mantenidos en cajas en grupos de 2 a 4 en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*.



**Ratón D1-GFP:** Cepa de ratón que muestra expresión sitio específica de EGFP (proteína fluorescente verde mejorada) de medusa en las neuronas D1 MSN. La cepa fue desarrollada con BAC (del inglés: Bacterial Artificial Chromosome) modificado que contiene insertado la EGFP cascada arriba del promotor para el receptor de dopamina D1a (Tg(Drd1a-EGFP)x60Gsat/Mmmh). Los ratones fueron genotificados mediante un kit de extracción de ADN genómico de la cola (Sigma Extract-N-Amp Tissue PCR Kit, Sigma #XNAT2). Y el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, utilizando los siguientes partidores: THGFP-F: 5' - AAGTTCATCTGCACCACCG -3' y THGFP-R: 5' - TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG - 3'. Finalmente, en un gel de agarosa 1.5% en los ratones GFP-positivos se observó una banda de 500 pb. El ratón D1-GFP fue facilitado por el Dr. David Lovinger del NIH/NIAAA, EEUU.

**Ratón KI  $\alpha 2$ :** Cepa de ratón KI global de segunda generación con background genético C57BL/6J. Los ratones presentan la mutación KR389-390AA en la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli, y fueron generados en el laboratorio del Dr. Gregg Homanics en la Universidad de Pittsburgh, EEUU, mediante la técnica de CRISPR/Cas9 para edición genérica (figura 6). Los ratones fueron genotipificados mediante un kit de extracción de ADN genómico de la cola (Sigma Extract-N-Amp Tissue PCR Kit) y el uso de PCR convencional con los siguientes partidores; F: 5'-GGGTCAGTGCCTCCAAATGA; R: 5'-GAAACCCCACCCTCGTGATT. Después de la PCR, todos los genotipos muestran una banda de 362 pb. Se realizó una digestión con una enzima de restricción Mfel, lo que permitió diferenciar los siguientes genotipos en un gel de electroforesis de agarosa de 1.5%: WT con una banda de 362 pb; Heterocigoto con una banda de 362, 242 y 120 pb; KI  $\alpha 2$  con bandas de 242 y 120 pb.



**Ratón GlyT2-Cre:** Cepa de ratón transgénico que expresa la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del gen de GlyT2 con un background de la línea de ratón C57BL/6. El ratón fue generado con BAC con un clon de ADN que contenía el locus de GlyT2 de ratón. El exón 2 (E2) fue modificado con la inserción del cassette de expresión de Cre (Tg(Slc6a5-Cre)1Uze) (Foster, Wildner et al. 2015). Estos ratones fueron utilizados en la Universidad de Zúrich, Suiza, en el Instituto de Farmacología y Toxicología, en el laboratorio del Dr. Hanns Ulrich Zeilhofer.

**Ratón silvestre:** En esta tesis se utilizaron ratones silvestres C57BL/6J de séptima generación, denominados wild type (WT) en el texto y en las figuras.

### **Preparación de las rebanadas de cerebro de ratón**

Ratones WT, D1GFP y KI  $\alpha 2$  (6-8 semanas postnatal) fueron decapitados siguiendo protocolo por Jun et al. (Jun, Carlson et al. 2011). El cerebro fue rápidamente disectado y puesto en solución de corte (en mM): 194 Sacarosa, 30 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucosa (pH 7.4) previamente saturado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. El cerebro se adhirió con cianoacrilato a la cámara de corte para obtener las rebanadas de 300  $\mu$ m en vibrátomo VT1200S (Leica, Alemania). Las rebanadas fueron transferidas a la solución de líquido céfalo raquídeo artificial (ACSF) (en mM): 124 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 Glucosa, 2 CaCl<sub>2</sub> (pH 7.4 y ajustado con sacarosa a 315-320 mOsm) saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> a 32°C por 1 hora. Luego de esto, las rebanadas están listas para ser usadas para electrofisiología o para ser disociadas.

### **Disociación enzimática de neuronas**

Rebanadas coronales de cerebro que contienen el núcleo Accumbens (nAc) fueron incubadas por 30 minutos en ACSF (saturado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) en presencia de 0.45 mg de pronasa (Calbiochem/EMD Bioscience, Darmstadt, Alemania) a 37°C. El nAc fue disectado y transferido a pocillos de 35 mm con buffer de trituración (en mM): 20 NaCl, 130 N-metil-D-glucamina, 2.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.4 y ajustado con sacarosa a 340 mOsm) y se procedió a la disociación mecánica, usando una serie de puntas de pipetas de orden decreciente de tamaño.

Las neuronas aisladas se adhieren al fondo del pocillo de 35 mm (Nunc, ThermoFisher Scientific) durante 20 minutos, para luego realizar los experimentos electrofisiológicos.

### **Electrofisiología**

Los registros de electrofisiología, en rebanadas y en neuronas disociadas del nAc fueron realizados en ratones machos y hembras. Estos estudios electrofisiológicos se realizaron con la técnica de patch clamp. Los registros de fijación de voltaje (Voltage clamp) o de corriente (Current clamp), en la configuración célula completa (whole cell), fueron adquiridos con el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Union City, CA), filtrados a 5 kHz con el filtro low pass Bessel y usando una ganancia de 2. Las pipetas de patch fueron preparadas desde capilares de borosilicato (World Precision Instruments) utilizando un puller horizontal P-1000 (Sutter Instruments), con una resistencia de 3-6 M $\Omega$ .

*Corrientes sinápticas inhibitorias en miniaturas de glicina (mIPSCs):* Registros se realizaron en rebanadas coronales de cerebro (300  $\mu$ m) conteniendo el núcleo Accumbens. Las rebanadas fueron transferidas a la cámara de registro calefaccionada a 30-32 °C (Warner Instruments, Camden, CT) en el microscopio Nikon Eclipse FN1 (Nikon, Japón) equipado con óptica DIC-IR. Las rebanadas fueron perfundidas constantemente con ACSF (1.5-2 ml/min) oxigenado (95% O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Los registros de las corrientes de glicina fásicas (mIPSC) fueron realizados con voltaje fijado a -60 mV en presencia de ACSF con TTX (500 nM, Tocris), D-APV (40  $\mu$ M, Tocris), CNQX (10  $\mu$ M, HelloBio), mecamilamina (10  $\mu$ M,

Sigma Aldrich) y bicuculina (10  $\mu$ M, HelloBio) para aislar las corrientes glicinérgicas, sin la aplicación de glicina exógena. Se usó una solución interna que contiene (en mM): 120 CsCl, 4.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP and 2.0 Na<sub>2</sub>-ATP (pH 7.4, 290-310 mOsmol). Las corrientes fueron registradas y almacenadas en un computador personal usando un adquisidor 1322A Digidata (Axon Instruments, Union City, CA) y analizadas con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA). Parámetros de Frecuencia (Hz), constante de decaimiento (ms) y amplitud (pA) de las corrientes sinápticas en miniatura fueron medidas usando el programa MiniAnalysis (Synaptosoft Inc. NJ, USA).

*Corrientes tónicas mediadas por el R-Gli.* Para evaluar la presencia de corrientes tónicas de glicina, la sensibilidad a etanol (10-100 mM, Merck) y a estricnina (STN 4  $\mu$ M, Sigma) se realizaron registros en rebanadas de nAc a voltaje fijo de -60 mV en presencia de ACSF con TTX (500 nM, Tocris), D-APV (40  $\mu$ M, Tocris), CNQX (10  $\mu$ M, HelloBio), mecamilamina (10  $\mu$ M, Sigma Aldrich) y bicuculina (10  $\mu$ M, HelloBio) para aislar las corrientes glicinérgicas, sin aplicación de glicina exógena. La máxima amplitud de la corriente tónica fue estimada después de 5 minutos de perfusión de STN, y de 3 minutos de exposición a etanol. El cambio de corriente fue calculado como el promedio de la corriente durante una sección del registro de mIPSC libre de eventos sinápticos por 30 segundos. Se construyeron histogramas con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA). Todos los puntos de esos histogramas fueron ajustados con una curva Gaussian. La diferencia entre los peaks de estas curvas Gaussianas en presencia y ausencia de las drogas, fueron calculadas para determinar el cambio en la corriente basal.

*Registros de potenciales de acción:* Se realizaron registros de corriente fija para determinar los efectos de etanol (10-100 mM) y STN (4  $\mu$ M) en la generación de espigas de potenciales de acción (PA). Se usó una solución interna de potasio gluconato (en mM): 126 KGluc, 4 KCl, 10 HEPES, 10 BAPTA, 4 NaATP, 0.3 NaGTP, ajustado to 290 mOsm y pH = 7.2. Mediante inyecciones de corrientes de -200 a 400 pA con una duración de 200 ms, se evocó el disparo de potenciales de acción en neuronas de nAc. Así, la excitabilidad neuronal fue evaluada antes y después de la perfusión de etanol y STN en la solución ACSF (saturado con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). Los registros fueron analizados con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA) y se obtuvieron valores del potencial de reposo de membrana (mV), el umbral de generación de potencial de acción (mV) y la frecuencia (número de PA).

*Corrientes evocadas de glicina:* Registros realizados en neuronas disociadas de nAc a temperatura ambiente. Las corrientes activadas por glicina fueron estudiadas usando la configuración de célula completa y voltaje fijado a -60 mV. Se utilizó una solución interna que contiene (en mM): 120 KCl, 4.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 BAPTA, 0.5 Na<sub>2</sub>-GTP y 2.0 Na<sub>2</sub>-ATP (pH 7.4, 290-310 mOsmol). La solución externa usada contiene (en mM) 150 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7.4, 315-320 mOsm). Las neuronas fueron perfundidas con concentraciones crecientes de glicina (1-1000  $\mu$ M), para determinar parámetros farmacológicos como EC<sub>50</sub> y EC<sub>10</sub>, este último parámetro fue usado para determinar los efectos de etanol (10-100 mM). Las corrientes fueron mostradas y almacenadas en un computador personal usando el adquisidor 1322A Digidata (Axon Instruments, Union City, CA) y analizados con el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments, Union City, CA).

### **Inyección estereotáxica.**

Ratones GlyT2-Cre fueron anestesiados en una cámara con 5% isofluorano (VIP 3000 Veterinary Vaporizer, Midmark). El pelaje de la cabeza fue removido y se realizó una incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo. Se ubicó el animal en el armazón de estereotaxia que presenta una manta calefactora y se mantuvo la anestesia a 1-2.5% de isofluorano (flujo de aire de 900 mL/min). Se perforó el cráneo y se inyectó en el nAc con una jeringa Hamilton 701 RN de 10  $\mu$ l mediante estereotaxia (David Kopf Instruments y Neurostar StereoDrive, Alemania), utilizando las coordenadas, antero-posterior 1.8 mm, medial-lateral 1 mm y dorso-ventral 4.5 mm con respecto al bregma (Franklin and Paxinos 2008). Se inyectó un volumen de 300 nl en el nAc del hemisferio derecho con un microinyector automático (Neurostar, Alemania) con el siguiente adenovirus retrógrado: AAV2-retro.flexGFP (3251 nucleótidos;  $9.4 \times 10^{12}$  vg/ml). Luego de la cirugía los ratones se devolvieron a sus jaulas y se les administró un tratamiento analgésico (0.1-0.2 mg/kg buprenorfina, subcutáneo) y posterior a 3 semanas se procedió con la extracción y análisis del tejido cerebral.

### **Inmunohistoquímica (IHC).**

Los ratones GlyT2-Cre inyectados con el virus retrógrado se anestesiaron con pentobarbital (160 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) fueron fijados con PFA al 4% por perfusión vascular. Se extrajo el cerebro y se post fijó con PFA por inmersión por 2 horas. Se obtuvieron rebanadas sagitales de cerebro de 50  $\mu$ m con vibrátomo (DSK

microslicer DTK-200), las que se posicionaron en un portaobjeto (Thermo Fisher Scientific). Se marcó la zona donde estaban las rebanadas con un lápiz hidrofóbico (Abcam) para realizar la IHC en el portaobjeto. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS 1X en agitación y en cámara húmeda, para luego bloquear y permeabilizar las rebanadas con suero de caballo (10%) y 0.3% Triton X-100 en PBS durante una hora a temperatura ambiente (RT) y en agitación. Las rebanadas fueron incubadas toda la noche en agitación a 4 °C en cámara húmeda, con los anticuerpos primarios anti-GFP (1:500, chicken, LifeTech), anti-NeuN (1:500, ginea pig, Synaptic System) o anti-TH (tirosina hidroxilasa) (1:500, sheep, Millipore) en PBS con 10% de suero de caballo y 0.3% Triton a un volumen de 250 µl por portaobjeto. Al día siguiente, las rebanadas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS 1X en agitación. Luego se incubaron por 2 horas en agitación a RT en cámara húmeda con la solución con los anticuerpos secundarios anti-chicken/Alexa488, anti-ginea pig/Cy3 o anti-sheep/Cy3 1:500 (Jackson Laboratories) en PBS con 10% de suero de caballo y 0.3% Triton a un volumen de 250 µl por portaobjeto. Después de 3 lavados por 10 minutos en agitación con PBS 1X, se marcaron los núcleos con DAPI (1:10000) por 10 minutos en agitación. Se realizaron 3 lavados más, se secaron los vidrios y las preparaciones fueron montadas con la solución de montaje Dako (DakoCytomation, EEUU). Las rebanadas fueron observadas y se obtuvieron imágenes con los microscopios Apotome Imager.Z1 (Zeiss, Alemania) y microscopio confocal LSM710 (Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron procesadas con el software ZEN black edition (Zeiss, Alemania). Las secciones de las imágenes obtenidas con el microscopio

Apotome (10x) fueron mejoradas con el sistema Stitching, y las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con objetivo 20x y Z-stack, se muestran las imágenes de un solo plano confocal.

### **Estudios de comportamiento**

Ratones machos WT y KI  $\alpha 2$  de 8 a 12 semanas de edad fueron usados para todos los estudios de comportamiento. Datos obtenidos en hembras WT y KI  $\alpha 2$  fueron presentados solo en las figuras 22, 25 y 27.

**Prueba de campo abierto control (Open field assay):** Prueba modificada para evaluar la actividad locomotora exploratoria de ratones. Los ratones se ubican en el centro de cajas equipadas con cámara de video para que los ratones exploren de manera libre durante 20 minutos. Luego se analiza la distancia total recorrida de cada ratón, cada 5 minutos, utilizando el software de seguimiento ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL). Se analizó 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.

**Rotarod Acelerado:** Prueba para evaluar la coordinación motora basal de ratones. En este ensayo los ratones fueron ubicados en un rodillo (rotarod) (IITC Life Science Inc, CA) que comienza a acelerar desde 4 hasta 40 rpm en un tiempo de 120 segundos. Se registra el tiempo en que el ratón se mantiene sobre el rotarod

(latencia a caer). Cada ratón fue evaluado 5 veces en el primer día de prueba y 10 veces el segundo.

**Rotarod fijo:** Prueba para analizar los efectos de etanol en la actividad motora y coordinación de los ratones. La prueba dura 3 días, los 2 primeros días, los ratones son entrenados en el rotarod (IITC Life Science Inc, CA) a velocidad constante de 8 rpm hasta un máximo de 120 segundos. El tercer día los ratones reciben una inyección intraperitoneal de 2 gramos de etanol por kilogramo de peso del animal (2 g/kg) y se registra la latencia a caer de los ratones en triplicado, cada 15 minutos post inyección hasta los 90 minutos.

**Pérdida del reflejo de enderezamiento** (del inglés: Loss of Righting Reflex, LORR): Para evaluar los efectos sedativos de etanol, los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con 3.5 g/kg de etanol. Luego de la sedación, los ratones fueron puestos en posición supina en camas con forma de V y monitoreados hasta que fueron capaces de retomar su posición prona normal por sí mismos, 3 veces en un periodo de 30 segundos. El tiempo de aparición de LORR (onset of LORR) corresponde al tiempo desde la inyección hasta el posicionamiento en posición supina cuando el ratón está sedado. La duración del LORR (duration of LORR) corresponde al tiempo desde que el ratón es puesto en posición supina hasta que es capaz de recuperarse de los efectos de etanol y retomar su posición prona normal. Durante toda la prueba se mantuvo normotermia de los ratones.

**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, proveyendo un límite de 2-4 horas de acceso a etanol en oscuridad. El protocolo fue tomado de Thiele et al (Thiele, Crabbe et al. 2014), los animales se seleccionaron y se dejaron en cajas individuales con disponibilidad *ad libitum* de agua y comida. Luego se cambió su ciclo de oscuridad de 7:00pm-7:00am a 1:00pm-1:00am. 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 100 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 que es el último día se dejó la botella de 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).

**Concentración de etanol en sangre** (del inglés: Blood Ethanol Concentration, BEC): Los ratones WT y KI  $\alpha 2$  utilizados en la prueba DID, al día 1 o 4 se extrajo sangre desde la vena facial (20-50  $\mu$ l) 10 minutos después de terminar la sesión de consumo. Las muestras de sangre fueron centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm, y la BEC fue determinada en 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).

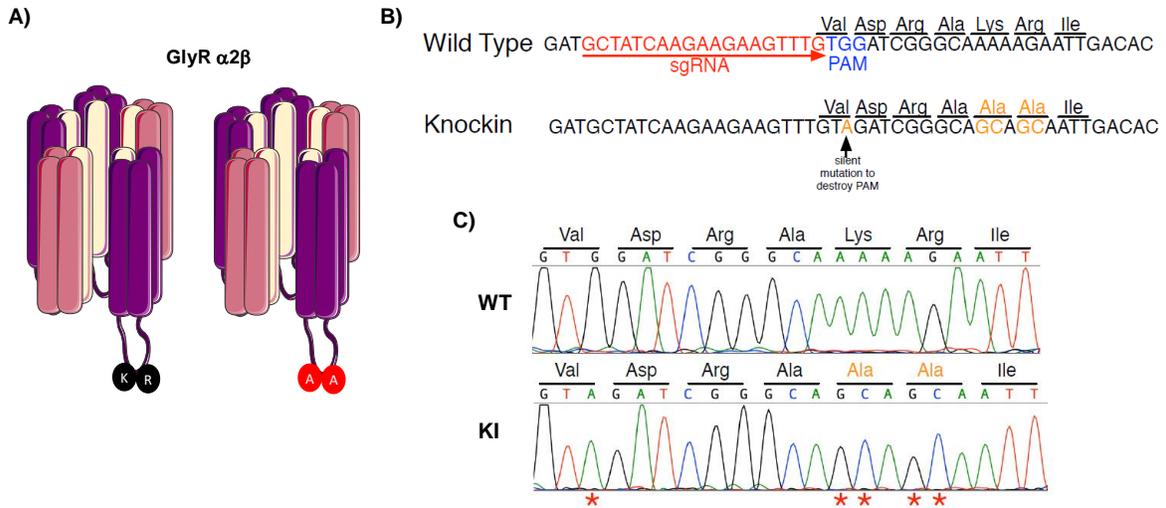
Para descartar cambios en la farmacocinética de etanol en los ratones WT y KI  $\alpha 2$ , se extrajeron muestras de sangre una hora después de la inyección intraperitoneal de 2 o 3.5 g/kg etanol y la BEC fue determinada, no obteniendo diferencias significativas entre ellas.

**Prueba de preferencia asociada a un lugar** (del inglés: Conditioned Place Preference, CPP): Esta prueba corresponde a un condicionamiento Pavloviano para determinar los efectos recompensantes o aversivos de algún estímulo. El protocolo fue obtenido de Cunningham et al. (Cunningham, Gremel et al. 2006). La prueba consiste en una cámara de condicionamiento de lugar (33x27x20 cm) que está ubicada en un compartimento cerrado, separado, ventilado y que atenúa la luz y sonido ambiente, esta cámara además posee una separación por una pared transparente que divide dos tipos de pisos de acero inoxidable de diferente textura. El piso para el estímulo positivo, se denomina Cs+, y consiste en una grilla de 0.6 cm. Mientras, que el piso para el estímulo negativo (Cs-) es una grilla de 0.1 cm. El primer día de prueba, los ratones fueron habituados a una inyección de prueba (500  $\mu$ l solución salina 0.9%); la pared fue retirada para que el ratón tuviera acceso a explorar libremente la cámara por 15 minutos. Al día siguiente se inició la primera sesión de condicionamiento. Cada ratón fue inyectado i.p. con 2 g/kg etanol (días 2, 4, 8 y 10), o con solución salina 0.9% (días 3, 5, 9 y 11). Una vez inyectado los animales fueron puestos por 10 minutos en la cámara de condicionamiento. Los días de inyección de etanol los ratones fueron puestos en el lado de la cámara Cs+. Mientras, que los días de inyección de vehículo fueron puestos en el lado Cs-. Cada

día se registró en video a través de cámaras infrarrojas ubicadas en el aparato. Finalmente, el día 12 los ratones se inyectaron con solución salina 0.9% y se posicionaron en el centro de la cámara sin separador. Se registró la actividad del ratón por 30 minutos de exploración libre. Los videos del test de preferencia fueron almacenados y analizados usando un software de seguimiento ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL), en donde se obtuvo el tiempo que pasó el ratón en cada tipo de suelo, graficado como segundos por minuto (mean time on Grid).

### **Análisis de datos**

Los resultados fueron presentados como el promedio  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando t de Student (pareado o no pareado, dependiendo del experimento) y para condiciones con más de 2 factores se utilizó ANOVA (One-way o Two-way) seguido por Bonferroni post hoc test. Un nivel de probabilidad ( $p$ ) menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Se utilizaron los programas Origin 6 (Microcal, Inc., Massachusetts, USA) o GraphPad Prism 6 Software para el análisis de los datos. n.s. no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 6. Estrategia de la generación del ratón KI  $\alpha 2$  mediante edición genética con CRISPR Cas9**

A) Esquema de un R-Gli heteromérico  $\alpha 2\beta$ , subunidades  $\alpha 2$  en morado y subunidades  $\beta$  en rosado. Se muestra en el loop intracelular de  $\alpha 2$  los residuos KR389-390 del ratón WT a la izquierda y a la derecha los residuos AA389-390 del ratón KI  $\alpha 2$ . B) Secuencia de ADN de WT y KI, donde se observa el lugar de unión de ARN guía (sgRNA: single guide RNA), el motivo adyacente al protoespaciador (PAM: protospacer adjacent motif) y los aminoácidos relevantes del loop intracelular. C) Cromatograma de la secuencia de ADN de un ratón WT y un KI  $\alpha 2$  donde se confirma la presencia de las 5 mutaciones para convertir la lisina y la arginina en alaninas y una mutación silente para destruir el PAM.

## Resultados

**Objetivo Específico 1: Caracterizar los efectos de etanol sobre las corrientes mediadas por el receptor de glicina en neuronas D1 MSN del nAc, y analizar la excitabilidad de estas neuronas expresando un receptor es sensible o menos sensible a etanol.**

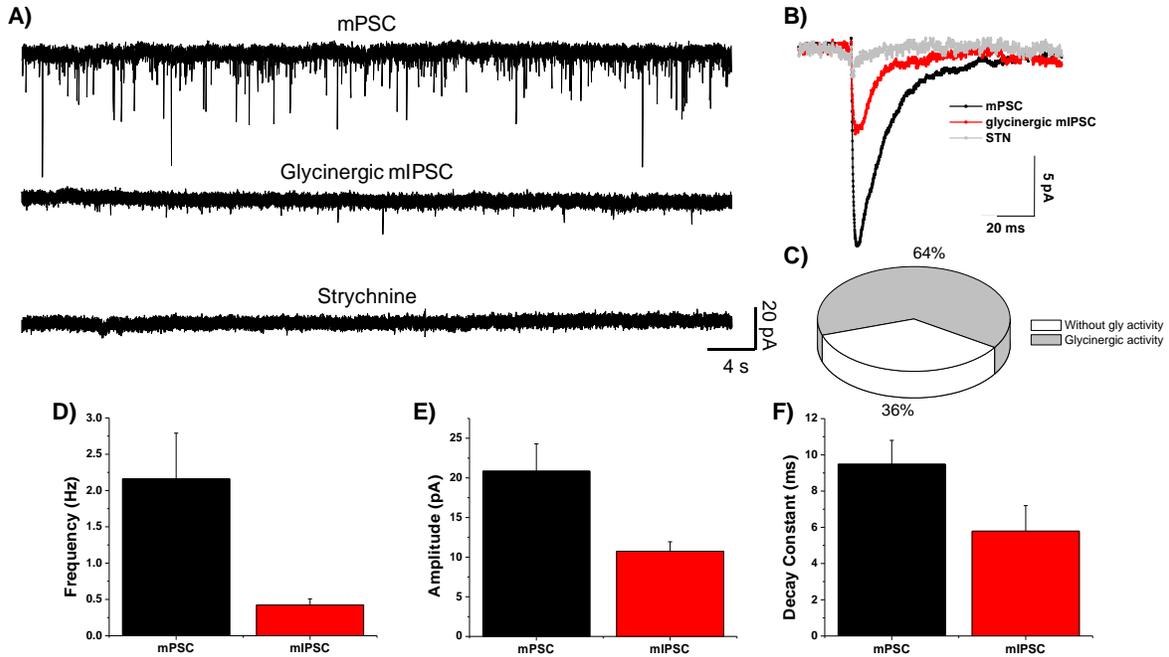
Los experimentos del objetivo 1 apuntaron al estudio de las corrientes mediadas por el R-Gli en el nAc, analizando el origen de las fibras glicinérgicas que inervan el nAc, los efectos de concentraciones farmacológicas de etanol en las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en las D1 MSN del nAc, su impacto en la excitabilidad de las neuronas, y el rol que podría tener la subunidad  $\alpha 2$  en producir estos efectos.

Actividad 1.1 Determinar la presencia de corrientes mediadas por el R-Gli en el nAc e identificación del origen de las fibras glicinérgicas.

**1.1.1** En rebanadas de cerebro de ratones WT (C57BL/6) se registraron las corrientes sinápticas en miniatura mediadas por el R-Gli en el nAc utilizando inhibidores farmacológicos para aislar las corrientes de glicina. Se utilizaron inhibidores para las corrientes de tipo AMPA (CNQX), NMDA (D-AP5), GABA (bicuculina) y de receptores nicotínicos de acetilcolina (mecamilamina), además de TTX para bloquear los canales de sodio voltaje-dependientes. La presencia de mecamilamina es necesaria para descartar posible participación de la actividad mediada por nAChRs, presentes en el nAc, lo que no se había estudiado en

publicaciones anteriores. De las corrientes postsinápticas en miniatura (mPSC) y corrientes postsinápticas inhibitorias de glicina (mIPSC), las cuales eran completamente bloqueadas por estriquina (STN 4  $\mu$ M), se analizó la amplitud, la frecuencia y la constante de decaimiento de las corrientes promedio. No se realizaron experimentos con etanol en las corrientes sinápticas debido a que trabajos anteriores mostraron que este tipo de actividad no era potenciada por etanol en el nAc (Muñoz, Yevenes et al. 2018). Por esta razón es que, en las actividades siguientes, las corrientes mediadas por R-Gli de tipo tónicas son las que se estudian en presencia de etanol.

La figura 7 muestra que las corrientes sinápticas de glicina presentaban valores de  $10 \pm 2$  pA de amplitud, una constante de decaimiento de  $6 \pm 2$  ms y una frecuencia de  $0.4 \pm 0.1$  Hz, y que aproximadamente el 64% de las células registradas presentaban eventos glicinérgicos, estos datos coinciden con los anteriormente publicados en nuestro laboratorio (Muñoz, Yevenes et al. 2018). Confirmando la presencia de corrientes sinápticas/fásicas glicinérgicas en el nAc.



**Figura 7. Corrientes sinápticas de glicina en el nAc**

A) Trazos representativos de 1 minuto de registro a voltaje fijo a -60 mV en modalidad célula-completa de corrientes sinápticas en miniatura en condiciones controles (mPSC), corrientes en miniatura inhibitorias de glicina (mIPSC) y el bloqueo de estas en presencia de STN. B) Gráfico muestra el trazo promedio de las corrientes controles y de las corrientes glicinérgicas. C) Porcentaje de células registradas del nAc que presentaron eventos glicinérgicos. D) Gráfico muestra la frecuencia promedio de los eventos controles y glicinérgicos. E) Gráfico muestra la amplitud promedio de los eventos controles y glicinérgicos. F) Gráfico muestra la constante de decaimiento promedio de los eventos controles y glicinérgicos. n= 14 neuronas.

**1.1.2** Para obtener información anatómica que apoyara estructuralmente la presencia de corrientes glicinérgicas en el nAc, se realizaron estudios para determinar el origen de las fibras glicinérgicas que inervan el nAc.

Se utilizó un modelo de ratón transgénico que expresa la recombinasa Cre en neuronas glicinérgicas GlyT2-positivas (GlyT2 es un transportador de glicina neuronal, utilizado como marcador de neuronas glicinérgicas). Se realizaron inyecciones estereotáxicas en el nAc del hemisferio derecho, de ratones GlyT2-Cre con un retromarcador adenoviral asociado (AAV2retro.flexGFP) que presenta la secuencia de la proteína fluorescente verde (GFP) contraria al marco de lectura y entre dos sitios loxP, por lo tanto, solo en neuronas que expresen la recombinasa Cre se observa la fluorescencia verde. Cuando este virus es inyectado en los terminales presinápticos del nAc, mediante el transporte retrogrado de las neuronas, se puede observar la marca de GFP en el soma neuronal. Los ratones GlyT2-cre inyectados, luego de 3 semanas fueron fijados mediante perfusión vascular con PFA al 4% más fijación del cerebro por inmersión en PFA por 2 horas. Se obtuvieron cortes sagitales de cerebro realizados en vibrátomo. Posteriormente se realizaron ensayos de IHC en las rebanadas de cerebro para identificar el marcaje de GFP en las neuronas GlyT2 positivas.

Las figuras 8, 9 y 10 muestran el análisis de las IHC de rebanadas de cerebro utilizando un anticuerpo anti-GFP y marcadores celulares (NeuN, DAPI o tirosina hidroxilasa). Se lograron identificar cuerpos neuronales GlyT2-GFP-positivos de manera aislada en distintas regiones del cerebro y de forma ipsi y contra lateral al sitio de inyección. Encontramos fibras que proyectaban al nAc, las cuales no seguían un mismo plano sagital (figura 8) y solo en algunas ocasiones se

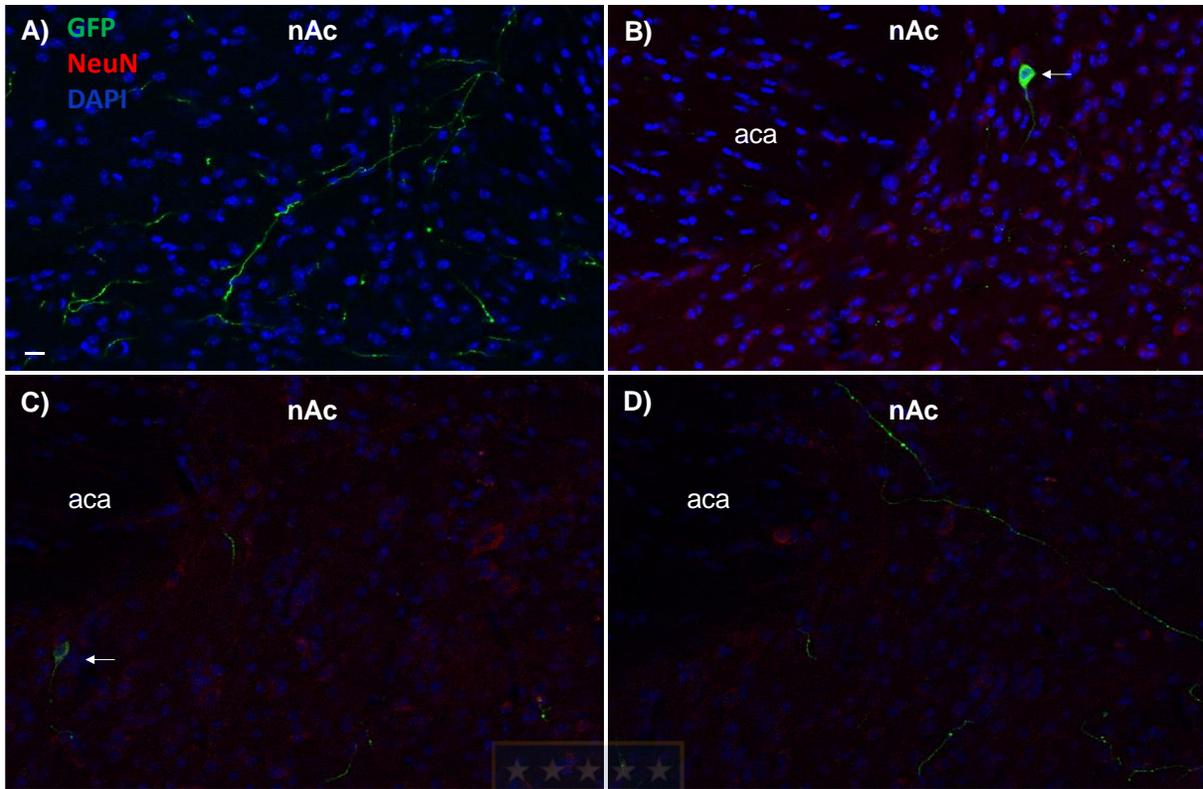
observaron cuerpos neuronales GFP-positivos cercanos a la comisura anterior, fibras de conexión entre los hemisferios que ayuda a delimitar la longitud del nAc (Franklin and Paxinos 2008). Sin embargo, las regiones donde mayormente identificamos grupos de neuronas GFP-positivas y fibras de proyección fueron los núcleos olfatorios anteriores, tubérculos olfatorios y núcleos reticulares del mesencéfalo (Allen Institute for Brain Science 2010). Sugiriendo que son estas regiones las que proveen la mayor innervación glicinérgica que proyecta al nAc.

En la figura 9 se observa una rebanada sagital que muestra grupos de neuronas glicinérgicas, se destacan en cuadrados blancos las neuronas que podrían corresponder a los núcleos olfatorios anteriores y los núcleos reticulares del mesencéfalo. En estos últimos, fue donde se encontró la mayor cantidad de neuronas GFP-positivas. Para identificar que esta región caudal ubicada anterior al cerebelo correspondía a los núcleos reticulares del mesencéfalo, utilizamos la marca de tirosina hidroxilasa (TH), una enzima importante para la síntesis de DA que se utiliza como marcador de neuronas dopaminérgicas. Esta marca ayudó a delimitar zonas anatómicas del cerebro ya que la síntesis de DA es específica para ciertas áreas del cerebro, como el VTA, la sustancia nigra *pars compacta* y la zona retrorubral de los núcleos reticulares del mesencéfalo (Fu, Yuan et al. 2012). En la figura 10 se muestra con detalles las neuronas GFP-positivas que estaban remarcadas en el cuadro blanco de la derecha de la figura 9 con A y B. Estas neuronas que liberarían glicina en el nAc estaban en los núcleos reticulares del mesencéfalo (Figura 10A) y algunas de ellas estaban en la misma región que las neuronas dopaminérgicas de estos núcleos (figura 10B), posiblemente en el área retrorubral (Allen Institute for Brain Franklin and Paxinos 2008, Science 2010). Sin

embargo, las neuronas glicinérgicas y dopaminérgicas no coincidían entre ellas, ya que no hubo doble marca para GFP y TH. Existe la opción que algunas de las neuronas GFP-positivas también puedan estar cerca de las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo, las que también son positivas para la marca de TH, al ser una enzima precursora de la síntesis de noradrenalina. Pero se necesitaría mayor información para confirmar esto.

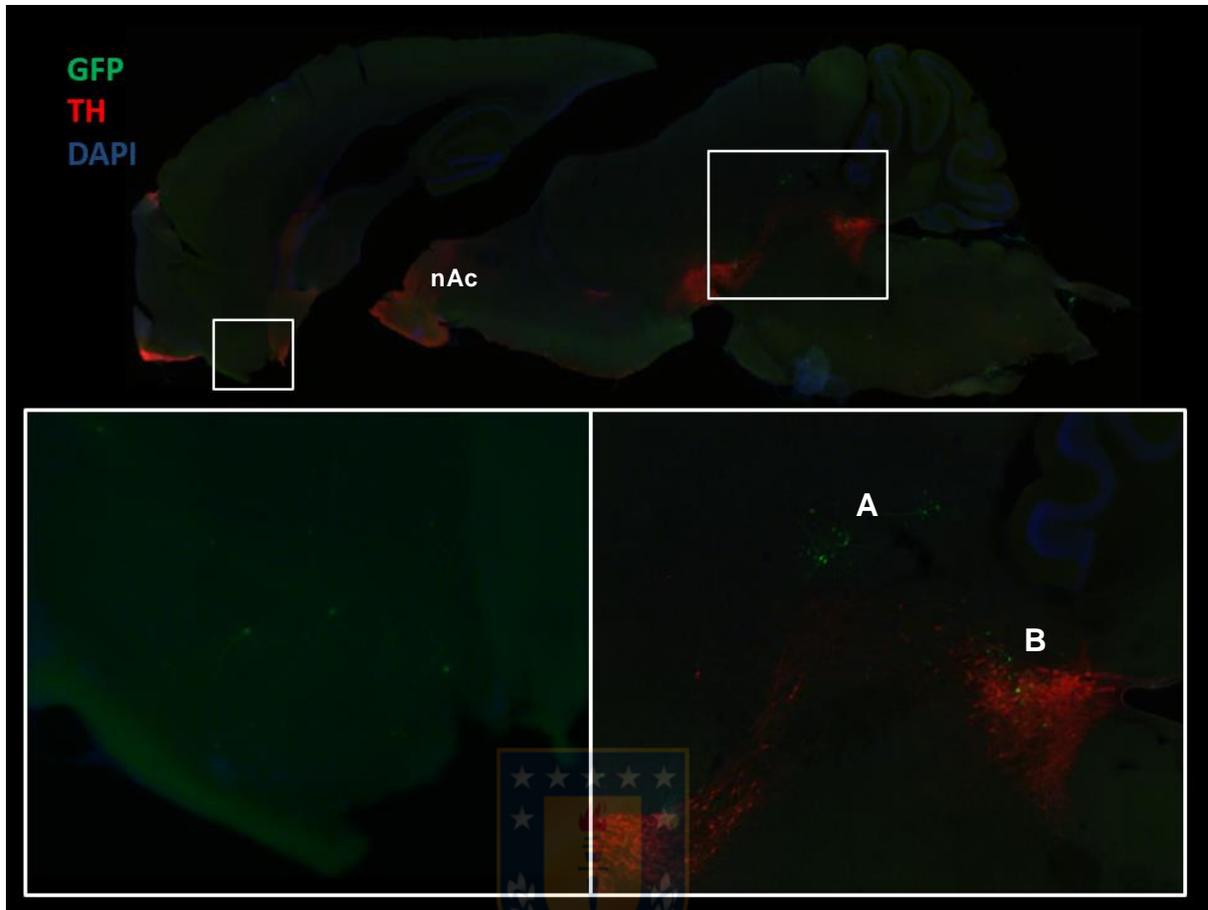
Creemos que estos resultados proporcionan un buen respaldo a los datos electrofisiológicos sobre la presencia de R-Gli sinápticos funcionales en el nAc. Y además abren más posibilidades de estudio sobre la ubicación más definida de estas neuronas GlyT2-GFP-positivas y sobre el rol de estas mismas en la regulación de la activación del nAc y consecuentemente del sistema de recompensa.





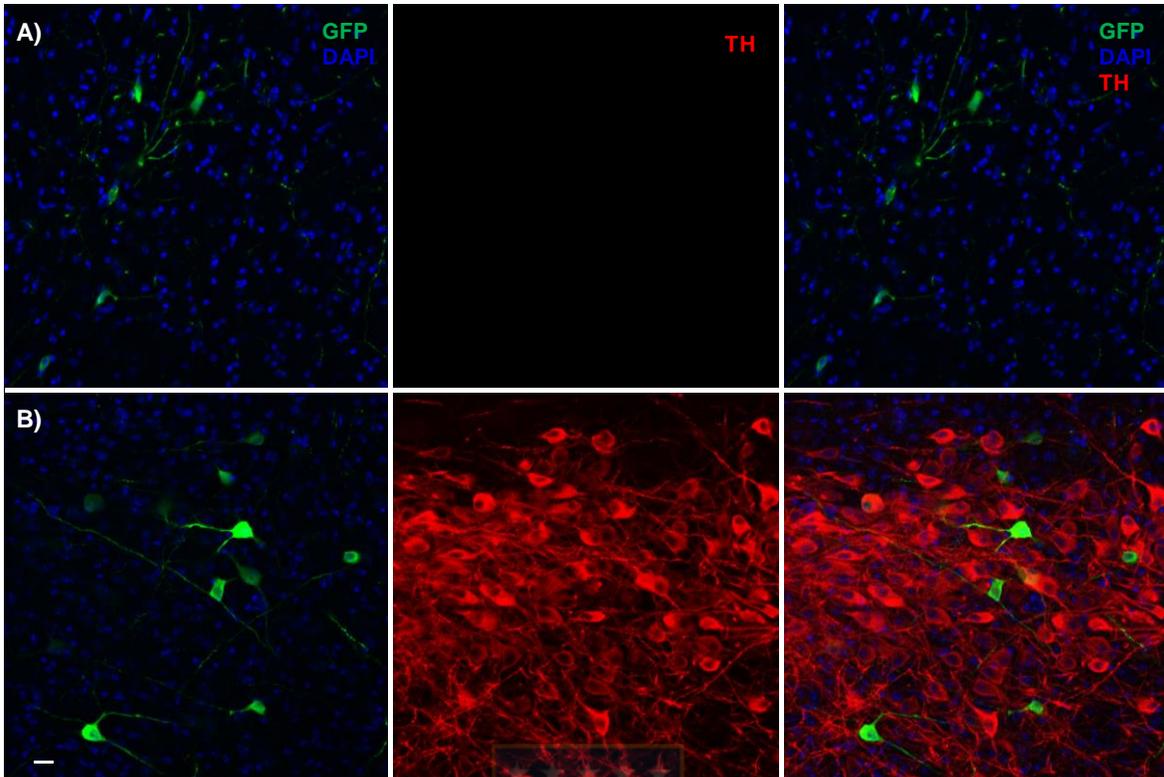
**Figura 8. Fibras y neuronas glicinérgicas en el nAc**

Imunohistoquímica en rebanada sagital de cerebro de 50  $\mu\text{m}$  del ratón GlyT2-Cre inyectado con AAVretroflexGFP en el nAc. Imágenes de microscopía confocal de un plano Z del nAc con objetivo 20x. En verde se marca GFP, en rojo NeuN y en azul DAPI. A) Se observa la presencia de múltiples fibras glicinérgicas GFP-positivas en el nAc. B) Se observa una neurona glicinérgica en el nAc marcada con una flecha blanca. C) Se observa la presencia de fibras y de una neurona glicinérgica marcada con una flecha blanca. D) Se observan solo fibras glicinérgicas. Imágenes obtenidas con microscopio Confocal LS710 (Zeiss). Anticuerpos: GFP 1:500 (LifeTech) y Alexa 488 1:500 (Jackson), NeuN 1:500 (SynapticSystem) y Cy3 1:500 (Jackson). n= 6 ratones. La barra de calibración es de 10  $\mu\text{m}$ . aca: comisura anterior.



**Figura 9. Neuronas glicinérgicas que inervan el nAc**

Imunohistoquímica en rebanada sagital de cerebro de 50  $\mu\text{m}$  del ratón GlyT2-Cre inyectado con AAVretroflexGFP en el nAc. Se muestran imágenes con zoom en los recuadros blancos. A la izquierda se observan los núcleos olfatorios anteriores y a derecha los núcleos reticulares del mesencéfalo. En verde se marcan las neuronas GFP-GlyT2-positivas, en rojo se marca tirosina hidroxilasa (TH) y en azul DAPI. Imagen obtenida en microscopio ApoTome (Zeiss) con objetivo 10x. Anticuerpos: GFP 1:500 (LifeTech) y Alexa 488 1:500 (Jackson), TH 1:500 (Millipore) y Cy3 1:500 (Jackson). n= 6 ratones.



**Figura 10. Neuronas glicinérgicas en los núcleos reticulares del mesencéfalo que inervan el nAc**

Imunohistoquímica en rebanada sagital de cerebro de 50  $\mu\text{m}$  del ratón GlyT2-Cre inyectado con AAVretroflexGFP en el nAc. En verde se marcan las neuronas GFP-GlyT2-positivas, en rojo se marca tirosina hidroxilasa (TH) y en azul DAPI. A) Imagen confocal de un plano Z obtenida en microscopio confocal LSM 710 (Zeiss) con objetivo de 20x de las neuronas de los núcleos reticulares del mesencéfalo que no presentaban marca de TH. B) Imagen confocal de un plano Z obtenida en microscopio confocal LSM 710 (Zeiss) con objetivo de 20x de las neuronas de los núcleos reticulares del mesencéfalo, en la región retrorubral. Anticuerpos: GFP 1:500 (LifeTech) y Alexa 488 1:500 (Jackson), TH 1:500 (Millipore) y Cy3 1:500 (Jackson). n= 6 ratones. Barra de calibración es de 10  $\mu\text{m}$ .

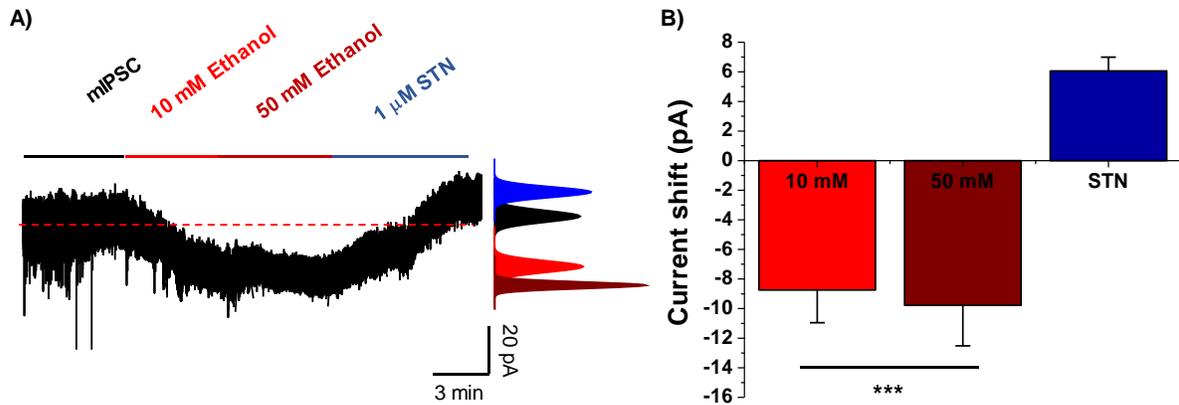
Actividad 1.2 Analizar los efectos de concentraciones farmacológicas de etanol en las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en las D1 MSN y como etanol puede afectar la excitabilidad de estas neuronas.

Para continuar el estudio de las corrientes glicinérgicas en el nAc, específicamente en las neuronas D1 MSN, se utilizó el ratón transgénico D1-GFP para identificar las neuronas D1 MSN (denominadas D1(+)) en la tesis) y estudiar el efecto de concentraciones farmacológicas de etanol (10-50 mM) en las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli ya que recientemente se reportó que este tipo de corriente se potenciaba con 100 mM de etanol (Förstera, Muñoz et al. 2017) y es importante destacar que corrientes sinápticas de glicina, activadas por estimulación eléctrica o por optogenética, no fueron afectadas por concentraciones bajas o altas de etanol (Muñoz, Yevenes et al. 2018). Por esto, en esta actividad se analizaron las corrientes tónicas en las D1(+) y los efectos de concentraciones bajas de etanol, y luego si es que esto generaba un impacto en la excitabilidad de estas neuronas.

**1.2.1** Registros electrofisiológicos con la técnica de patch clamp en rebanadas de cerebro de nAc del ratón D1-GFP. Se analizaron las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en las D1(+). Este tipo de corriente se analiza en presencia de inhibidores farmacológicos para aislar las corrientes mediadas por el R-Gli y se registran los cambios de esta corriente en ausencia de glicina externa y en presencia de 10 y 50 mM etanol. En la figura 11 se muestra un trazo de corriente tónica y como su amplitud aumenta en presencia de etanol, la corriente tónica se detecta como un cambio en la línea de base indicada con la línea roja punteada.

Encontramos que las corrientes tónicas mediadas por activación del R-Gli fueron potenciadas por ambas concentraciones de etanol. Observamos un cambio en la corriente de  $-9 \pm 2$  pA con 10 mM de etanol, y un cambio de  $-10 \pm 3$  pA con 50 mM. Demostrando su naturaleza asociada al R-Gli, las corrientes fueron inhibidas con la aplicación de 1  $\mu$ M de STN ( $F_{(2,35)} = 14.92$ ;  $p = 0.0001$  One-way ANOVA,  $n = 14$  con 10 mM y  $n = 13$  con 50 mM de etanol). Estos resultados confirman que las D1 MSN son neuronas que expresan R-Gli sensibles a bajas concentraciones de etanol, lo que podría ser relevante para mantener el control inhibitorio del nAc, y específicamente de la vía directa.





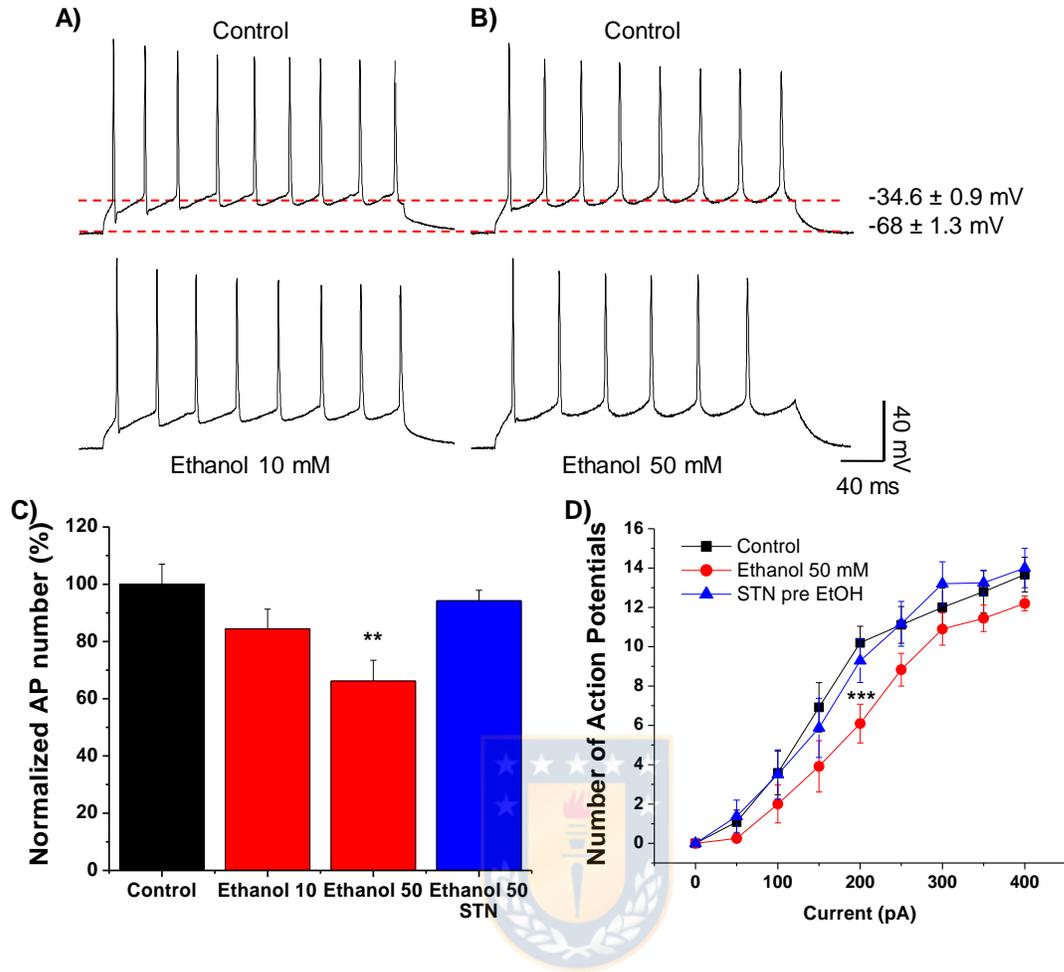
**Figura 11. Corrientes tónicas de glicina sensibles a bajas concentraciones de etanol**

A) Trazo representativo de una corriente tónica registrada a -60 mV en rebanada de cerebro de ratón D1-GFP en D1(+) del nAc. Se muestran cambios en la amplitud de la corriente tónica mediada por el R-Gli en presencia de etanol (10 y 50 mM) y con estriquina (1  $\mu$ M STN). La línea roja punteada indica la línea de base. B) Gráfico muestra el cambio de la corriente tónica mediada por el R-Gli en neuronas D1 MSN del nAc en presencia de etanol y de STN. Datos representan el promedio  $\pm$  SEM. One-way ANOVA \*\*\* $p < 0.001$   $n = 14$  con 10 mM y  $n = 13$  con 50 mM de etanol.

**1.2.2** Para evaluar si este cambio en la corriente tónica activada por R-Gli y potenciada por concentraciones bajas de etanol era suficiente para modificar la excitabilidad de las D1 MSN. Para esto, registramos el número de potenciales de acción (PA) evocados con un pulso de corriente de 200 pA y con una duración de 200 ms en condiciones controles y en presencia de concentraciones farmacológicas de etanol (10 y 50 mM) en rebanadas de nAc del ratón D1-GFP, utilizando la técnica de patch clamp en modalidad corriente-fija. Los datos muestran que el número de PA disminuyó significativamente de manera concentración dependiente en presencia de etanol (figura 12). De esta manera, con la perfusión de 10 mM etanol se produjo una pequeña reducción del número de PA ( $16 \pm 7\%$ ). La mayor inhibición fue de  $34 \pm 6\%$  con 50 mM de etanol ( $F_{(3,34)} = 4.392$ ;  $p = 0.0102$  One-way ANOVA y Bonferroni post hoc test control versus etanol 50 mM  $**p < 0.01$ ,  $n = 12$ ). Para confirmar que este fenómeno estaba mediado por el R-Gli, se realizó el mismo experimento, pero pre-tratando la rebanada con STN y bloquear los R-Gli. En esta condición no se observó una disminución del número de PA. De manera similar, en la curva de PA evocados con corrientes depolarizantes (0-400 pA), se observó un desplazamiento hacia la derecha de la curva de PA en presencia de 50 mM etanol, y no hubo cambios en la curva cuando la rebanada fue pre-tratada con STN ( $F_{(1,161)} = 14.64$ ;  $p = 0.0002$  Two-Way ANOVA para control versus etanol 50 mM,  $n = 12$ ). El valor de la reobase también se vio afectado en presencia de etanol, este aumentó a 75 pA, mientras que en condiciones controles era de 50 pA, evidenciando que, en presencia de etanol, se necesitan pulsos de corrientes mayores para evocar el mismo número de PA. Estos resultados sugieren que en las neuronas D1 MSN existe un control inhibitorio mediado por el R-Gli, el cual, al ser potenciado por etanol

disminuye la excitabilidad de este grupo de neuronas. Los trazos de voltaje de la figura 12A y B también muestran los valores de potencial de reposo ( $-68 \pm 1.3$  mV) y de umbral de disparo ( $-34 \pm 0.9$  mV). Estos valores no cambiaron significativamente en presencia de etanol.

Es importante hacer notar que el registro de las neuronas D1(+) en presencia de STN ( $4 \mu\text{M}$ ) sin etanol, no mostró diferencias significativas con los controles. No existió desplazamiento de la curva de PA (no se muestra en figura) y se mantuvieron los valores de reobase ( $F_{(1,140)} = 1.545$ ;  $p = 0.2159$  Two-Way ANOVA control versus STN,  $n = 11$ ). A pesar de que el valor del potencial de reposo subió a  $-66 \pm 5$  mV y el de umbral de disparo fue de  $-34 \pm 4$  mV esto no fue suficiente para causar un mayor número de PA. Una respuesta similar se había reportado en neuronas de la corteza orbito frontal lateral, donde etanol disminuyó el número de PA lo que fue bloqueado por STN, pero la aplicación de STN por sí sola no tuvo efecto en la excitabilidad de esas neuronas (Badanich, Mulholland et al. 2013).



**Figura 12. Etanol disminuye la excitabilidad de las D1 MSN de manera dependiente del R-Gli**

A) Trazos representativos de registros de potenciales de acción en neuronas D1(+) del nAc. Se muestra el número de potenciales de acción en condiciones controles y en presencia de 10 mM etanol. B) Trazos representativos de registros de potenciales de acción en neuronas D1(+) del nAc. Se muestra el número de potenciales de acción en condiciones controles y en presencia de 50 mM etanol. La línea roja punteada indica valores promedio de potencial de reposo ( $-68$  mV) y valor del umbral de disparo ( $-34.6$  mV). C) Gráfico muestra el porcentaje de cambio del número de potenciales de acción registrado en las D1(+) con un pulso de corriente de 200 pA. Una disminución del  $16 \pm 7$  % con 10 mM y  $34 \pm 6$  % con 50 mM de

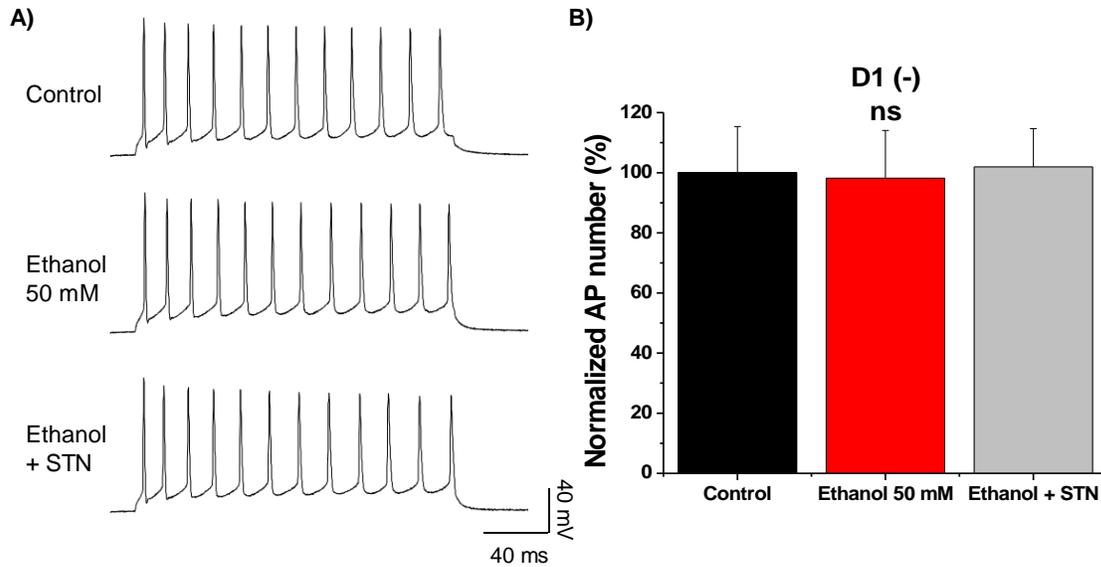
etanol. D) Curva del número de PA evocados con pulsos de corriente de 0 a 400 pA. La curva de etanol 50 mM se encuentra desplazada a la derecha (círculos rojos). Datos representan el promedio  $\pm$  SEM. One-Way ANOVA  $**p < 0.01$  para C; Two-Way ANOVA  $***p < 0.001$  para D.  $n = 6$  para 10 mM,  $n = 12$  para 50 mM y  $n = 9$  para 50 mM etanol pre tratado con STN.



**1.2.3** Etanol no afectó la excitabilidad en neuronas D2 MSN (indicadas en esta tesis como D1(-)). Experimentos previos del laboratorio habían encontrado que etanol potenciaba mayormente a los R-Gli de las neuronas D1(+). En acuerdo con esos datos, como se observa en la figura 13, al analizar el número de PA en las D1(-) evocados con un pulso de 200 pA y 200 ms de duración, no se observaron diferencias en el número de PA cuando se registraron en presencia de 50 mM etanol o etanol más 4  $\mu$ M de STN, a diferencia de lo encontrado en las D1(+) ( $F_{(2,15)}=0.0164$ ;  $p=0.9837$  One-way ANOVA,  $n=6$ ). Por lo que adicionalmente a lo que estaba publicado, las D1 MSN no solo presentan R-Gli que son más sensibles a glicina que en las D1(-), sino que también son más sensibles a etanol. Y se confirma que son las D1 MSN las principales neuronas en el nAc las que están bajo una regulación inhibitoria mediada por el R-Gli.

Propiedades adicionales de los PA registrados en las MSN del nAc, están resumidas en la tabla 1.

Estos primeros datos apoyan la noción de la importancia del R-Gli en relación a su potenciación por etanol, ya que, al ser potenciado por concentraciones farmacológicas de etanol, puede afectar la excitabilidad de las D1 MSN, y en consecuencia la activación del sistema de recompensa.



**Figura 13. Etanol no altera la excitabilidad de las D1(-) del nAc**

A) Trazos representativos de registros de potenciales de acción en neuronas D1(-) evocados con un pulso de corriente de 200 pA, en condiciones controles, en presencia de 50 mM de etanol y en presencia de etanol más 4  $\mu$ M de STN. B) Gráfico muestra el porcentaje de cambio del número de potenciales de acción registrados en las D1(-). No se observó cambio en presencia de etanol o de etanol más STN. Datos representan el promedio  $\pm$  SEM. One-Way ANOVA, ns. no significativo, n= 6.

	Resting Potential (mV)	Threshold (mV)	Amplitude (mV)	Input Resistance (M $\Omega$ )	Half Width (ms)	n
D1(+) Control	- 68.03 $\pm$ 1.3	- 34.6 $\pm$ 0.9	89.53 $\pm$ 3.1	103.4 $\pm$ 11.3	1.37 $\pm$ 0.14	12
D1(+) Ethanol 50 mM	- 69.28 $\pm$ 1.5	- 36.2 $\pm$ 1.3	90.86 $\pm$ 2.7	96.1 $\pm$ 10.9	1.51 $\pm$ 0.18	12
D1(-) Control	- 68.68 $\pm$ 1.7	- 35.8 $\pm$ 0.7	93.7 $\pm$ 1.2	99.7 $\pm$ 8.7	1.23 $\pm$ 0.07	6
D1(-) Ethanol 50 mM	- 69.25 $\pm$ 1.7	- 36.3 $\pm$ 0.4	90.9 $\pm$ 1.6	95.9 $\pm$ 10.1	1.18 $\pm$ 0.07	6

**Tabla 1. Características de los potenciales de acción registrados en las MSN del nAc en condiciones controles y en presencia de 50 mM etanol**

Los valores están dados en promedio  $\pm$  SEM. La información de cada neurona fue obtenida por el análisis de los potenciales de acción usando el programa Clampfit 10.1 (Axon Instruments) la que luego fue analizada como grupo con el software Origin 6 (Microcal, Inc., Massachusetts, USA).

(n)= número de células.

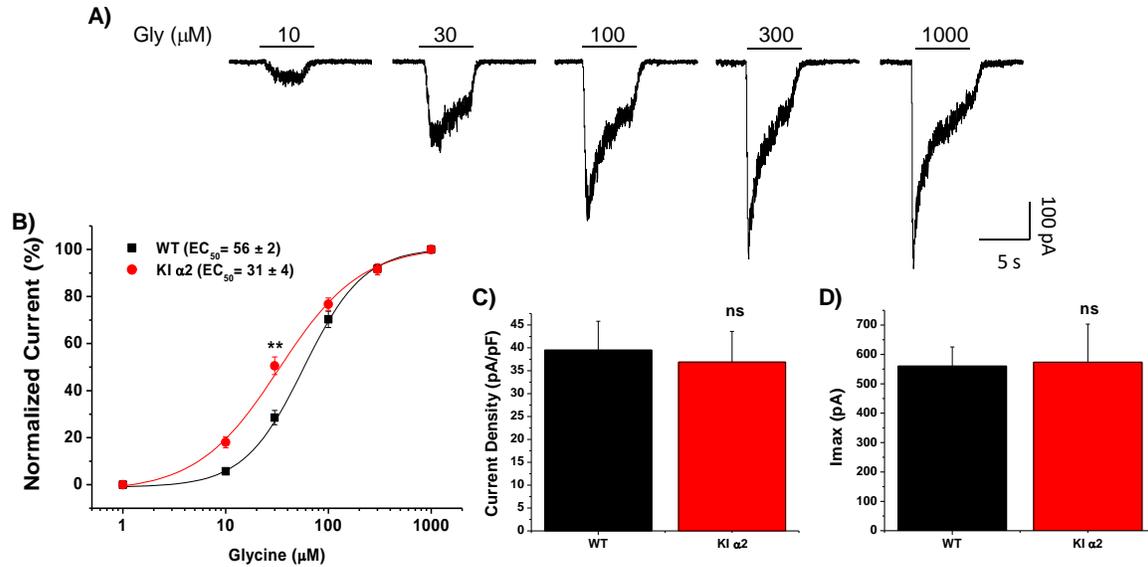
Actividad 1.3 Análisis de la sensibilidad a glicina y etanol del R-Gli en el nAc de un modelo de ratón con R-Gli alfa 2 menos sensible a etanol.

El primer objetivo contemplaba también el análisis del rol de subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli y los efectos de etanol en el nAc. Recientemente se había estudiado el rol de la subunidad  $\alpha 1$  del R-Gli, por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos en la subunidad  $\alpha 2$ . Para esto se utilizó un modelo de ratón modificado genéticamente, el cual presenta mutaciones en dos aminoácidos en el loop intracelular entre el TM3-TM4 de la subunidad  $\alpha 2$ . La lisina 389 y la arginina 390 fueron mutadas a dos alaninas (KR389-390AA), estos residuos son importantes para la modulación de etanol sobre el R-Gli mediante el dímero  $G\beta\gamma$  (Muñoz et al, en preparación). Por lo tanto, esta mutación inhibe la potenciación por etanol de la subunidad  $\alpha 2$  cuando esta se co-expresa con la subunidad  $\beta$  (conformación heteromérica  $\alpha 2\beta$ ). Este animal se denominó KI  $\alpha 2$ .

**1.3.1** La mutación KR389-390AA en la subunidad  $\alpha 2$  no afecta la activación del R-Gli por glicina. Para evaluar que la mutación KR389-390AA no afectara la activación del R-Gli con su principal ligando, se realizaron registros electrofisiológicos en neuronas disociadas del nAc del ratón KI  $\alpha 2$ . La figura 14 muestra corrientes activadas con concentraciones crecientes de glicina (1-1000  $\mu M$ ) las que permitieron generar curvas de concentración-respuesta en el nAc tanto del ratón KI  $\alpha 2$  como del WT. El valor de  $EC_{50}$  de la curva fue de  $31 \pm 4 \mu M$  de glicina en el KI  $\alpha 2$ , un valor más bajo del encontrado en el nAc del ratón WT el cual fue de  $54 \pm 3$

$\mu\text{M}$  de glicina ( $t_{(28)}= 3.021$ ;  $p= 0.0053$  t de Student no pareada,  $n= 15$  KI  $\alpha 2$  y  $n= 15$  WT). Si bien la curva está desplazada a la izquierda, el análisis de las corrientes máximas y la densidad de corriente de glicina encontrada en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  fueron similares a las encontradas en el ratón WT ( $t_{(39)}= 0.279$ ;  $p= 0.7817$  t de Student no pareada para densidad de corriente;  $t_{(40)}= 0.09553$ ;  $p= 0.9244$  t de Student no pareada para corriente máxima,  $n= 19$  KI  $\alpha 2$  y  $n= 23$  WT). Lo que sugiere, que la mutación en  $\alpha 2$  KR389-390AA no altera la expresión o la activación del receptor por su principal ligando.





**Figura 14. Activación de los R-Gli en el nAc del ratón KI α2**

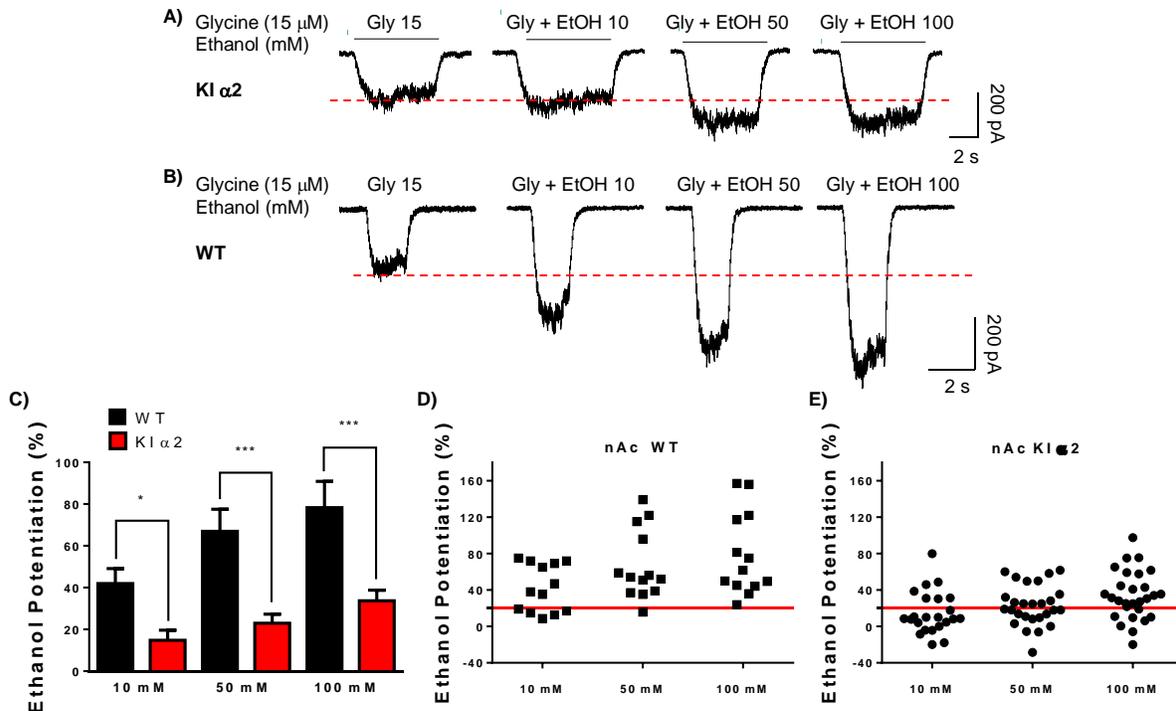
A) Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina en neuronas disociadas del nAc del ratón KI α2. Los trazos muestran corrientes evocadas con concentraciones crecientes de glicina (10-1000 μM). B) Curva concentración-respuesta a glicina en neuronas disociadas de nAc del ratón KI α2 (círculos rojos) y de ratón WT (cuadrados negros). Datos representan el promedio ± SEM, t de Student no pareada, \*\*p < 0.01; n = 15 KI α2 y n = 12 WT. C) Gráfico muestra que la densidad de corriente de glicina encontrada en el nAc del ratón KI α2 no varía de la encontrada en el ratón WT. D) Gráfico muestra el promedio de las corrientes máximas obtenidas con 1000 μM de glicina en el nAc del KI α2 y del WT. No existe diferencia entre los genotipos. Datos representan promedio ± SEM, prueba de t de Student no pareada, ns. no significativo. n = 19 para KI α2 y n = 23 para WT.

**1.3.2** Se realizaron registros electrofisiológicos en neuronas dissociadas del nAc del ratón KI  $\alpha 2$  para evaluar la sensibilidad a etanol en esta región (figura 15). Los R-Gli son activados con el EC<sub>10</sub> de glicina que corresponde a 15  $\mu$ M y luego con glicina más distintas concentraciones de etanol. Estas corrientes de cloruro mostraron una potenciación con 50 y 100 mM de etanol, la cual era considerablemente más baja a la potenciación encontrada en el nAc del ratón WT. En el ratón WT, etanol potenció la corriente de glicina un 42  $\pm$  7% con 10 mM etanol, 67  $\pm$  11% con 50 mM y 78  $\pm$  12% con 100 mM; mientras que, en el nAc del KI  $\alpha 2$ , la potenciación fue de 15  $\pm$  5% (10 mM), 23  $\pm$  4% (50 mM) and 34  $\pm$  5% (100 mM) ( $F_{(1,111)} = 45.40$ ;  $p = 0.0001$  Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n = 28$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 13$  WT). Adicionalmente, el análisis de la dispersión de los datos mostró que todas las células registradas en el ratón WT potenciaron con 50 y 100 mM etanol, sin embargo, los R-Gli en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , el 48% de las neuronas registradas potenció con 50 mM y un 71% con 100 mM (figura 15D y E). Lo que sugiere la presencia de la subunidad  $\alpha 2\beta$  en el nAc, ya que la mutación solo afecta a las neuronas que expresan el R-Gli  $\alpha 2$ . Estos resultados también sugieren que en el nAc se expresa otra subunidad del R-Gli, la  $\alpha 1$ . Lo cual concuerda con los resultados obtenidos con el ratón KI  $\alpha 1$  (Muñoz, Gallegos et al. 2019).

Luego de los datos obtenidos de la curva concentración-respuesta a glicina, en la figura 14B, el valor del EC<sub>10</sub> en el nAc del KI  $\alpha 2$  varió, y correspondía alrededor de 10  $\mu$ M de glicina. Los datos de la figura 15 fueron realizados con 15  $\mu$ M tanto para WT como KI  $\alpha 2$ . Para descartar que la potenciación atenuada en el KI  $\alpha 2$  no fue por

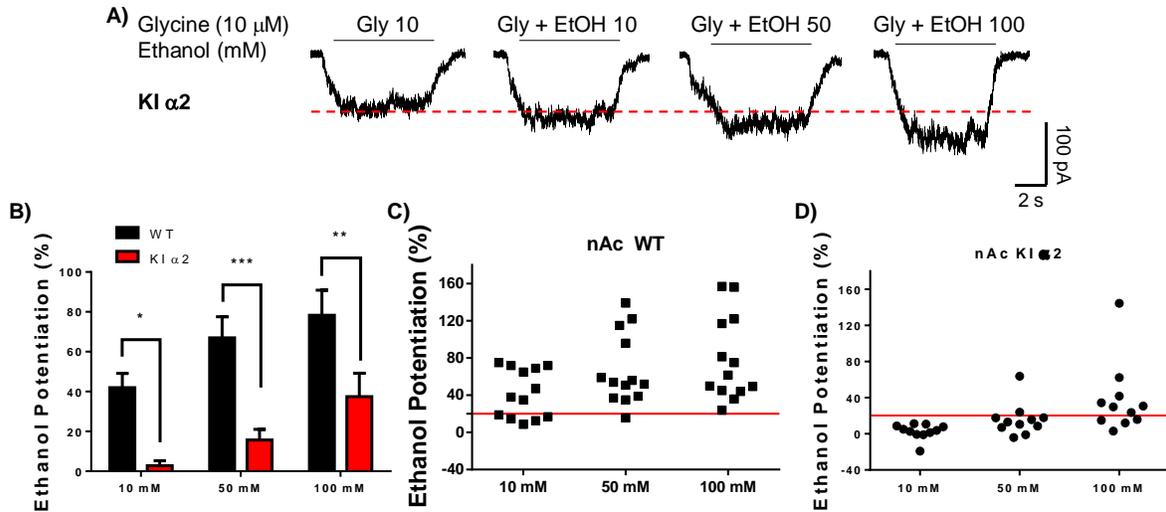
la activación con una concentración mayor de glicina, sino que por la presencia del receptor  $\alpha 2\beta$ , es que se realizaron registros de potenciación por etanol utilizando 10  $\mu\text{M}$  de glicina para activar la corriente de cloruro en el nAc del KI  $\alpha 2$ . Los resultados se muestran en la figura 16, y similar a lo que se había encontrado con 15  $\mu\text{M}$  de glicina, al activar con 10  $\mu\text{M}$  y luego potenciar con 10, 50 o 100 mM de etanol, la potenciación estuvo significativamente disminuida en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  versus el WT. Así, los R-Gli en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  potenciaron un  $3 \pm 2\%$  con 10 mM de etanol,  $16 \pm 5\%$  con 50 mM y  $37 \pm 12\%$  con 100 mM ( $F_{(1,66)} = 32.59$ ;  $p = 0.0001$ ; Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ;  $n = 11$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 13$  WT). En la figura 16C se muestra además que, solo el 18% de las células registradas en el nAc del KI  $\alpha 2$  potenció con 50 mM de etanol y que 64% de las neuronas potenció con 100 mM.

Los resultados concuerdan con los reportados en la figura 15, por lo tanto, se sugiere que la atenuación en la potenciación por etanol registrada en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , se debe a la presencia del receptor  $\alpha 2\beta$  y no por la diferencia en la sensibilidad a glicina.



**Figura 15. La potenciación por etanol se encuentra disminuida en el nAc del ratón KI  $\alpha$ 2**

A) Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina en neuronas dissociadas del nAc del ratón KI  $\alpha$ 2. Se muestra la corriente de glicina activada con el EC<sub>10</sub> (15  $\mu$ M) y el efecto de 10, 50 y 100 mM de etanol. B) Trazo representativo de corriente evocada de glicina y el efecto de 10, 50 y 100 mM etanol en el nAc del ratón WT. C) Gráfico de barras comparativo entre KI  $\alpha$ 2 y WT muestra el porcentaje de potenciación de la corriente activada por glicina con 10, 50 y 100 mM de etanol. D) Gráfico de dispersión de los datos de potenciación por etanol en el nAc del ratón WT. E) Gráfico de dispersión de los datos de potenciación por etanol en el nAc del ratón KI  $\alpha$ 2. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001; n = 28 KI  $\alpha$ 2 y n = 13 WT.

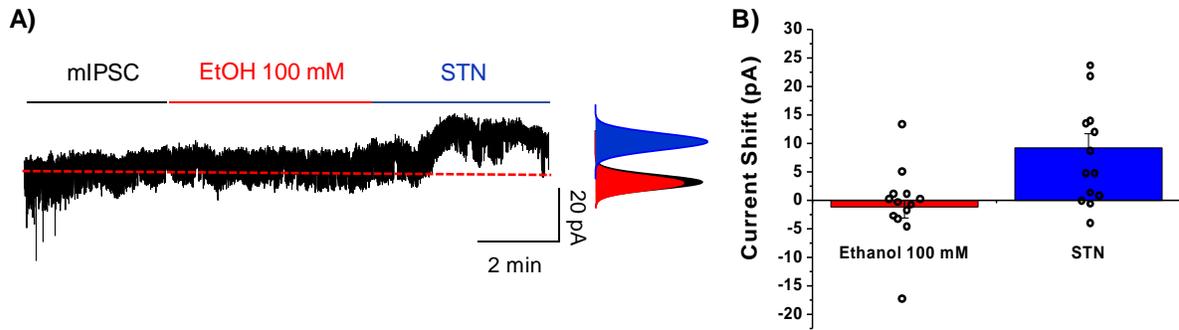


**Figura 16. La potenciación por etanol en nAc del KI  $\alpha$ 2 está disminuida (activación con glicina 10  $\mu$ M)**

A) Trazos representativos de corrientes evocadas de glicina en neuronas dissociadas del nAc del ratón KI  $\alpha$ 2. Se muestra la corriente activada con 10  $\mu$ M de glicina y el efecto de 10, 50 y 100 mM de etanol. B) Gráfico del porcentaje de potenciación por etanol de la corriente de cloruro activada con 10  $\mu$ M de glicina en el nAc del KI  $\alpha$ 2 y con 15  $\mu$ M de glicina en WT. Se muestran los efectos de 10, 50 y 100 mM de etanol. C) Gráfico de dispersión de los datos de potenciación por etanol en el nAc del ratón WT. D) Gráfico de dispersión de los datos de potenciación por etanol en el nAc del ratón KI  $\alpha$ 2. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001;  $n$ = 11 KI  $\alpha$ 2 y  $n$ = 13 WT.

**1.3.3** A continuación, se analizaron las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en rebanadas de nAc del ratón KI  $\alpha 2$ . Estos registros electrofisiológicos fueron realizados en rebanadas de nAc del ratón KI  $\alpha 2$  en presencia de 100 mM de etanol, ya que este es un modelo nuevo de ratón, y no existen registros anteriores con esta concentración en este animal.

La figura 17 muestra que en promedio las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli registradas en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  no existe potenciación con 100 mM de etanol. Solo un 23% de las neuronas mostró una leve potenciación de la corriente tónica, pero la mayoría no presentó cambios, y en algunos casos, la corriente tónica se inhibió con etanol. El análisis estadístico mostró la presencia de corriente tónica, evidenciada por la disminución de la amplitud de esta en presencia de STN (observada como un cambio positivo desde la línea de base en la figura 17A), solo que esta corriente tónica no se potencia por etanol ( $t_{(12)} = 0.5327$ ,  $p = 0.6039$  prueba de t de Student pareada para control versus etanol 100 mM;  $t_{(12)} = 3.489$ ,  $p = 0.0045$  prueba de t de Student pareada para control versus STN,  $n = 13$  neuronas). Estos resultados resaltan nuevamente la presencia de la subunidad  $\alpha 2$  en el nAc.



**Figura 17. Análisis de las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en el ratón KI  $\alpha 2$**

A) Trazo representativo de una corriente tónica mediada por el R-Gli registrada en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , y el efecto de 100 mM de etanol y 4  $\mu$ M de STN. Se observa la presencia de una corriente tónica, la cual fue insensible a etanol y que se inhibió en presencia de STN. La línea de base se marca con una línea roja punteada. B) Gráfico muestra el cambio de la corriente tónica en presencia de 100 mM de etanol y de STN. Los círculos blancos indican la dispersión de los datos en el nAc del KI  $\alpha 2$ . n= 13 neuronas del nAc del KI  $\alpha 2$ .

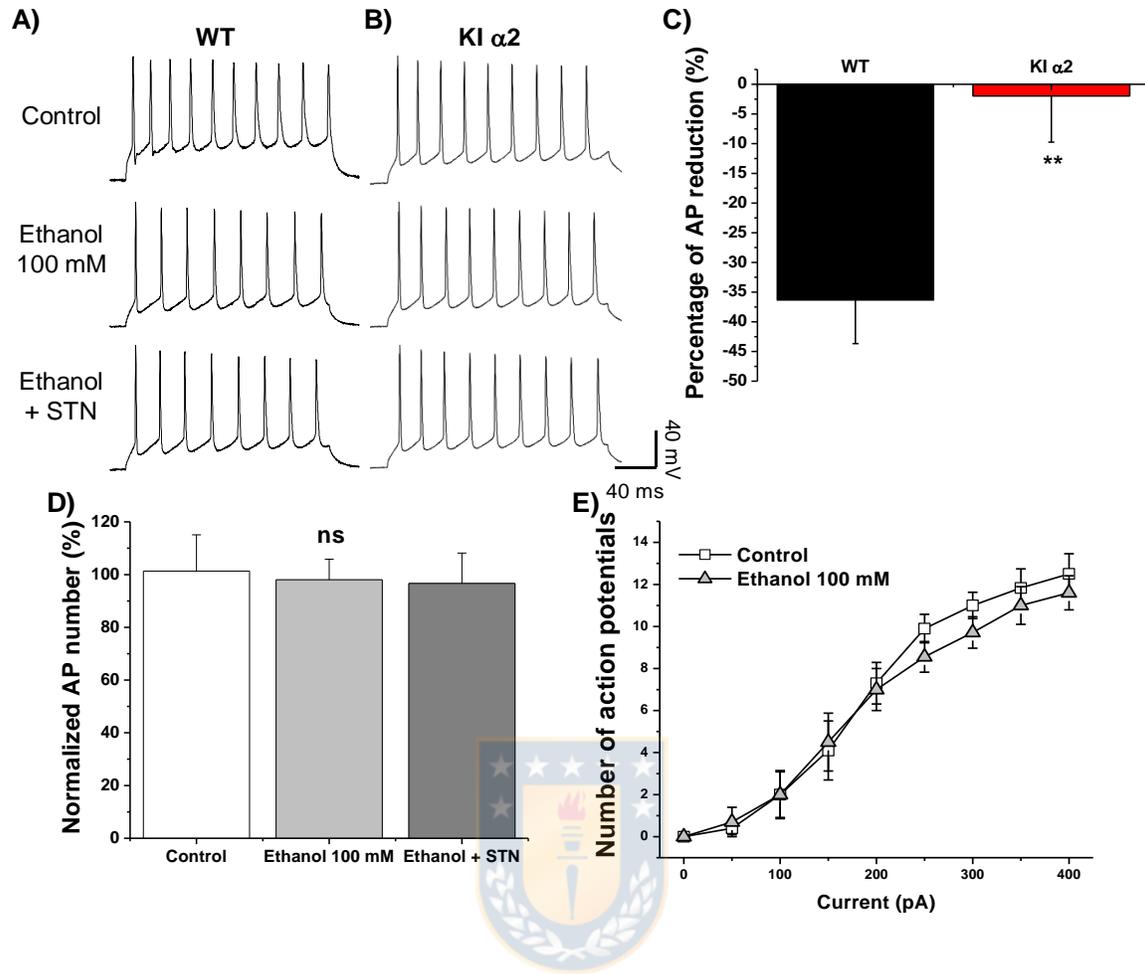
**1.3.4** El último experimento del primer objetivo contempló el análisis de la excitabilidad de las neuronas del nAc en presencia de etanol. Tanto en literatura (Muñoz, Gallegos et al. 2019) como en los resultados mencionados en la figura 12, la excitabilidad del nAc se ve disminuida en presencia de etanol. Los R-Gli al ser receptores inhibitorios, cuando son potenciados por etanol, aumentan la inhibición de las neuronas que los expresan, lo que se observa como una disminución en el número de potenciales de acción (PA).

Para evaluar si la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli ejerce un rol en la mantención del balance inhibitorio del nAc, se realizaron registros electrofisiológicos de corriente fija en rebanadas de nAc del ratón WT y del KI  $\alpha 2$  y se analizó el número de PA evocados con un pulso de corriente de 200 pA por 200 ms de duración, en condiciones controles y en presencia de 100 mM de etanol.

A diferencia de lo encontrado en el ratón WT, no se observaron diferencias en el número de PA en presencia de una concentración alta de etanol en el KI  $\alpha 2$ . La figura 18 muestra que los PA evocados con 200 pA de corriente en el nAc del ratón WT se redujeron un  $36 \pm 7\%$  y en el KI  $\alpha 2$  solo un  $2 \pm 8\%$  ( $t_{(16)} = 3.153$ ,  $p = 0.0062$ ; prueba de t de Student no pareada,  $n = 10$  para KI  $\alpha 2$  y  $n = 8$  para WT). Cuando se analizaron solo los PA del nAc del KI  $\alpha 2$ , se observó que el número de PA son similares en condiciones controles, en presencia de etanol y con la co-aplicación de etanol más STN ( $F_{(2,24)} = 0.044$ ;  $p = 0.9569$  One-Way ANOVA,  $n = 10$ ). En la curva de PA evocados con pulsos de corrientes depolarizantes de 0-400 pA, se observa el mismo fenómeno, no existe desplazamiento de la curva y los valores de reobase también coinciden en ambas condiciones (50 pA).

Estos datos apoyan la presencia de la subunidad  $\alpha 2$  en el nAc, y como esta subunidad es relevante en la regulación de esta región cuando el R-Gli presenta la configuración  $\alpha 2\beta$ . En concordancia con los resultados anteriormente mostrados en esta tesis, tanto en neuronas disociadas como en rebanadas del nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , el estudio de los PA sugiere que la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli es importante para mantener el balance inhibitorio del nAc. Cuando el R-Gli está mutado, etanol no puede potenciar la corriente inhibitoria, y por esto, no se observó la disminución de la excitabilidad de estas neuronas, como ocurre en el ratón WT.





**Figura 18. La excitabilidad neuronal del nAc del KI  $\alpha 2$  no se afecta por etanol**

A) Trazos representativos de potenciales de acción (PA) evocados con pulsos de corrientes de 200 pA por 200 ms en condiciones controles, en presencia de 100 mM etanol y con etanol más la co-aplicación de 4  $\mu$ M de STN en neuronas del nAc del ratón WT. B) Trazos representativos de potenciales de acción (PA) evocados con pulsos de corrientes de 200 pA por 200 ms en condiciones controles, en presencia de 100 mM etanol y con etanol más la co-aplicación de 4  $\mu$ M de STN en neuronas del nAc del ratón KI  $\alpha 2$ . C) Gráfico muestra el porcentaje de reducción del número de PA en el nAc de ratones WT y KI  $\alpha 2$  en presencia de 100 mM de etanol. D) Gráfico muestra el porcentaje del número de PA registrados en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  en condiciones controles, en presencia de etanol 100 mM y en presencia de

etanol más STN. E) Curva de PA evocados con corrientes depolarizantes (0-400 pA) en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  en condiciones controles (cuadrados blancos) y luego de la perfusión de 100 mM de etanol (triángulos grises). Datos representan el promedio  $\pm$  SEM, prueba de t de Student no pareada en C,  $**p < 0.01$ ; n= 10 para KI  $\alpha 2$  y n= 8 para WT. One-way ANOVA en D, ns. no significativo; n= 10 neuronas del nAc del KI  $\alpha 2$ .



## **Objetivo Específico 2: Evaluar el consumo y preferencia de etanol en ratones con R-Gli insensibles a la potenciación por etanol.**

El segundo objetivo específico apuntó a realizar estudios de comportamiento del ratón KI  $\alpha 2$ , con el fin de evaluar el rol de la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli en comportamientos frente a la administración de etanol, y finalmente sobre el consumo y preferencia de este. Al ser esta tesis el primer acercamiento al estudio del ratón KI  $\alpha 2$ , antes de analizar la respuesta a etanol de este ratón, evaluamos el comportamiento motor basal del ratón KI  $\alpha 2$ , para asegurarnos que este no presentara alguna deficiencia motora y que esto modificara su comportamiento frente a etanol. Posteriormente se evaluaron los efectos intoxicantes y sedativos de etanol, y finalmente el consumo y preferencia.

Actividad 2.1. Evaluación de la actividad motora del ratón KI  $\alpha 2$  en condiciones controles y en respuesta a etanol.

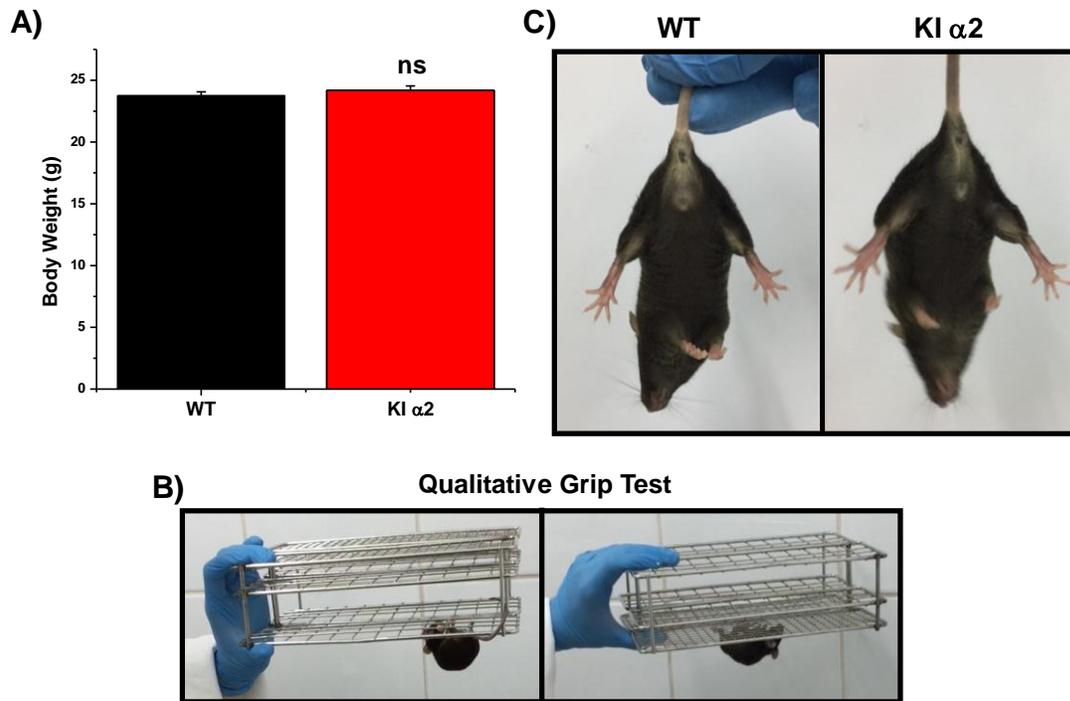
**2.1.1** Los ratones KI  $\alpha 2$  son ratones viables que no presentan diferencias morfológicas a nivel corporal o cerebral con respecto a ratones WT de su misma edad. El peso promedio de estos animales machos es de  $24.2 \pm 0.3$  gramos, similar al encontrado en ratones WT ( $23.8 \pm 0.3$  gramos) ( $t_{(99)} = 0.944$ ;  $p = 0.3472$  t de Student no pareada  $n = 48$  KI  $\alpha 2$  and  $n = 53$  WT).

Para evaluar el comportamiento motor global de los ratones KI  $\alpha 2$ , primero realizamos pruebas cualitativas (Figura 19) como la prueba de agarre en la cual los

ratones se ubican en rejillas de distinto tamaño y luego estas se giran y los ratones deben sujetarse durante 10 segundos para no caerse (figura 19B). El signo de contracción de las extremidades traseras (foot clenching) es una prueba en la cual los ratones son tomados de la cola y se observa si existe contracción muscular o espasticidad en las patas traseras. Este signo es positivo en modelos de ratones modificados genéticamente los cuales presentan R-Gli con función alterada (Findlay, Phelan et al. 2003, Borghese, Blednov et al. 2012). Los animales KI  $\alpha 2$  no presentan este signo.

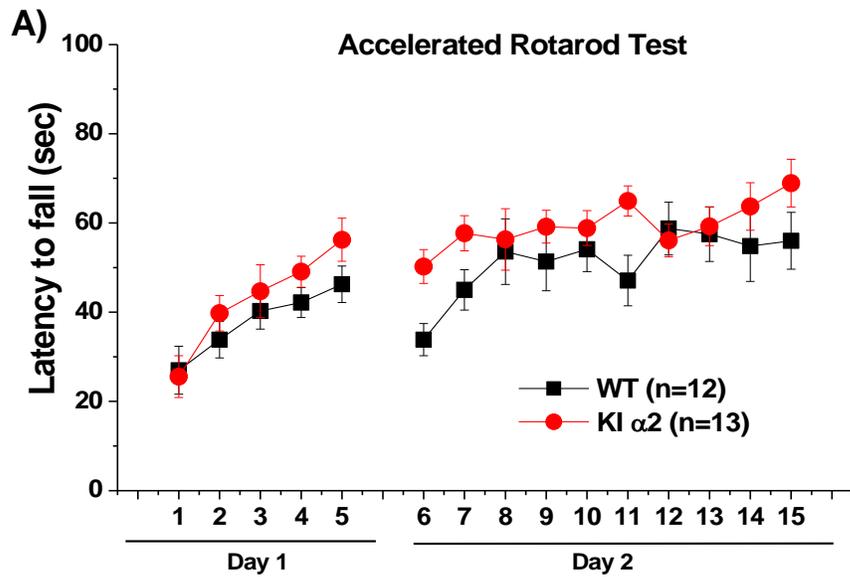
Las figuras 20 y 21 muestran pruebas donde analizamos la actividad locomotora de los ratones machos KI  $\alpha 2$ . Para evaluar la coordinación motora de los ratones utilizamos la prueba de rotarod acelerado. En los 2 días de prueba, los ratones son posicionados en un rodillo que comienza a acelerar desde las 4 rpm hasta 40, y se grafica el tiempo en que el ratón se cae. Los ratones KI  $\alpha 2$  realizan la prueba de manera similar a los WT (figura 20), si bien los KI  $\alpha 2$  se desempeñan de mejor forma, no existe diferencia significativa entre ambos genotipos ( $F_{(1,23)} = 3.072$ ;  $p = 0.0930$  Two-way ANOVA de medidas repetidas y Bonferroni post hoc test,  $n = 13$  KI  $\alpha 2$  and  $n = 12$  WT). Importante destacar que ambos grupos de animales mejoran su rendimiento desde la prueba 1 a la 15, lo que sugiere indemnidad en la habilidad del aprendizaje motor ( $F_{(14,322)} = 10.95$ ;  $p = 0.0001$  Two-way ANOVA de mediciones repetidas,  $n = 13$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 12$  WT). Para evaluar el comportamiento motor basal y exploratorio del ratón KI  $\alpha 2$ , realizamos la prueba de campo abierto (open field). En esta prueba, los ratones exploran el aparato de prueba durante 20 minutos, la distancia recorrida cada 5 minutos es graficada. La figura 21A muestra que los

ratones KI  $\alpha 2$  realizan la prueba de manera similar a los ratones WT, los ratones KI  $\alpha 2$  recorren  $2113 \pm 161$  cm en los primeros 5 minutos y  $1394 \pm 165$  cm los últimos 5 minutos de la prueba, los ratones WT recorrieron  $2393 \pm 220$  cm los primeros 5 minutos y  $1595 \pm 148$  cm los últimos 5 minutos de prueba ( $F_{(1,80)} = 1.865$ ;  $p = 0.1759$  Two-way ANOVA;  $n = 10$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 12$  WT). El mismo comportamiento se observa en el análisis de la trayectoria (figura 21B) donde se ve que tantos los ratones KI  $\alpha 2$  como los WT pasan por las esquinas y por el centro de la caja. Si los ratones pasaran más tiempo en las esquinas versus el centro, esto podría sugerir la presencia de un comportamiento de tipo ansioso. Sin embargo, el ratón KI  $\alpha 2$  pasa la misma cantidad de tiempo en el centro de la caja que el ratón WT. Los registros fueron de  $31.6 \pm 5$  segundos en los primeros 5 minutos de prueba para el ratón KI  $\alpha 2$  y  $34.9 \pm 5$  segundos en los primeros 5 minutos de prueba para el ratón WT ( $F_{(1,80)} = 0.01183$ ;  $p = 0.9137$  Two-way ANOVA,  $n = 10$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 12$  WT). Por lo que se puede afirmar que los ratones KI  $\alpha 2$  no presentan comportamientos de tipo ansiosos y exploran un ambiente nuevo al igual de cómo lo realizan los ratones WT de su misma edad.



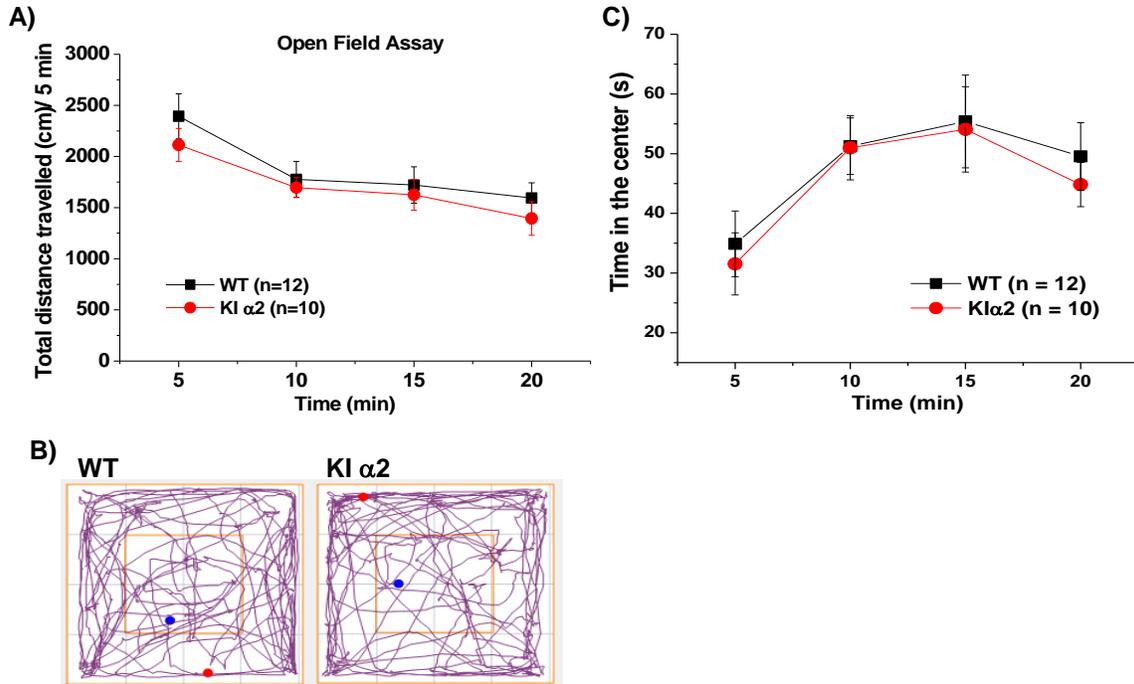
**Figura 19. Características generales de los ratones KI  $\alpha 2$**

A) El gráfico muestra el peso corporal de ratones machos KI  $\alpha 2$  y WT de entre 10 a 12 semanas de edad. Datos representan el promedio  $\pm$  SEM, prueba de t de Student no pareada, ns. no significativo.  $n = 48$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 53$  WT. B) Prueba cualitativa de agarre de los ratones KI  $\alpha 2$  en rejillas de diferente tamaño. C) Prueba de contracción de las extremidades traseras (foot clenching) al levantar por la cola en el ratón KI  $\alpha 2$  y WT.



**Figura 20. Los ratones KI  $\alpha$ 2 no presentan alteración locomotora**

A) Ensayo de rotarod acelerado. Se grafica el tiempo en que los ratones se demoran en caer del rotarod a medida que acelera la velocidad. Los ratones KI  $\alpha$ 2 realizan la prueba de manera similar a los WT. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA de mediciones repetidas, ns. no significativo; n= 13 KI  $\alpha$ 2 y n= 12 ratones WT.

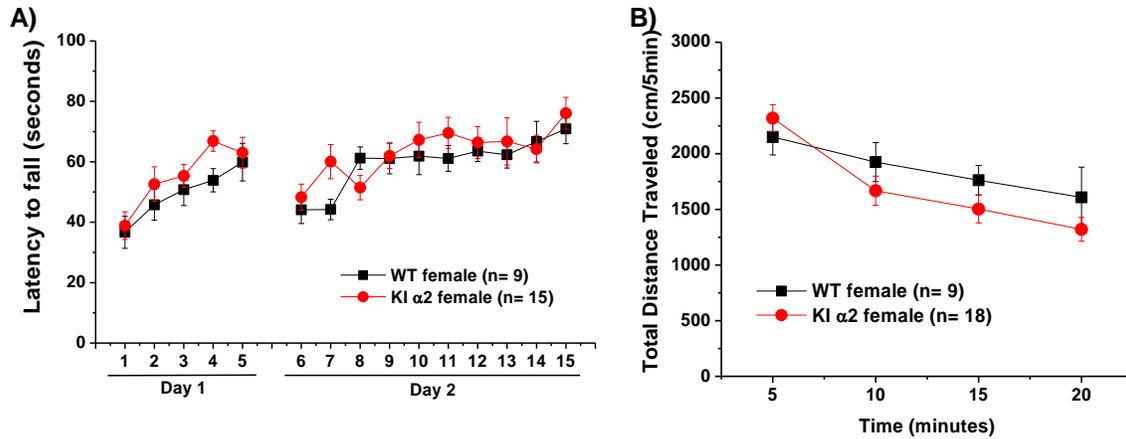


**Figura 21. Los ratones KI  $\alpha$ 2 no presentan alteraciones en el comportamiento exploratorio ni comportamiento de tipo ansioso**

A) Ensayo de open field en condiciones basales. Ratones pueden explorar un ambiente abierto nuevo durante 20 minutos. Se registra la distancia recorrida cada 5 minutos de prueba. La distancia recorrida no varía significativamente entre los ratones WT y KI  $\alpha$ 2. B) La trayectoria recorrida mostró exploración tanto en los bordes y en el centro de la caja en los ratones KI  $\alpha$ 2 y WT. C) Gráfico muestra el tiempo en que los ratones recorren el centro de la caja cada 5 minutos de un total de 20 minutos. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA. n= 10 KI  $\alpha$ 2 y n= 12 WT.

El análisis del comportamiento motor basal en hembras KI  $\alpha 2$  se muestra en la figura 22. En el ensayo de rotarod acelerado (figura 22A) se observa que las hembras KI  $\alpha 2$  no presentan deficiencias motoras y realizan la prueba de manera similar a las hembras WT ( $F_{(1,22)}= 1.458$ ,  $p= 0.2401$ , Two-way ANOVA de mediciones repetidas y Bonferroni post hoc test,  $n= 15$  hembras KI  $\alpha 2$  y  $n= 9$  hembras WT ). Los datos también muestran que las hembras de ambos genotipos mejoraron su desempeño desde la prueba 1 a la 15, al igual que sus similares machos ( $F_{(14,308)}= 7.050$ ,  $p= 0.0001$ , Two-way ANOVA de mediciones repetidas y Bonferroni post hoc test,  $n= 15$  KI  $\alpha 2$  y  $n= 9$  WT). En el ensayo de open field (figura 22B), las hembras KI  $\alpha 2$  recorrieron una distancia de  $2318 \pm 120$  cm los primeros 5 minutos de prueba, similar a lo recorrido por hembras WT lo cual fue de  $2150 \pm 161$  cm ( $F_{(1,100)}= 2.115$ ,  $p= 0.1490$ , Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test,  $n= 18$  hembras KI  $\alpha 2$  y  $n= 9$  hembras WT).

Estas pruebas demostraron que los ratones KI  $\alpha 2$  (machos y hembras) presentaron un comportamiento global normal con respecto a los ratones WT, sin deficiencias motoras, por lo tanto, se podía continuar con el análisis de la respuesta a etanol en estos ratones.



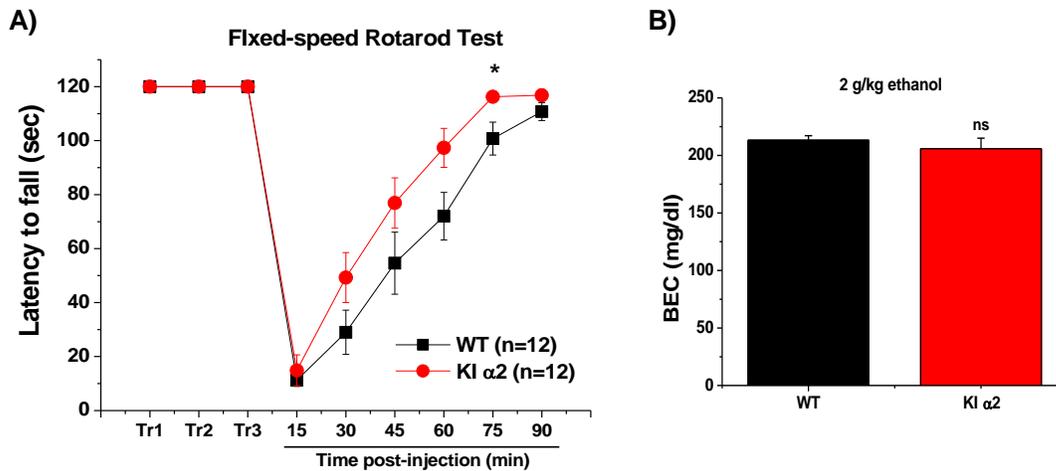
**Figura 22. Las hembras KI  $\alpha$ 2 no presentan alteraciones locomotoras o en el comportamiento exploratorio**

A) Ensayo de rotarod acelerado. Se grafica el tiempo en que los ratones se demoran en caer del rotarod a medida que acelera la velocidad. Las hembras KI  $\alpha$ 2 realizan la prueba de manera similar a las WT. B) Ensayo de open field en condiciones basales. Ratones pueden explorar un ambiente abierto nuevo durante 20 minutos. Se registra la distancia recorrida cada 5 minutos de prueba. La distancia recorrida no varía significativamente entre las hembras WT y KI  $\alpha$ 2. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA, ns. no significativo; n= 15 hembras KI  $\alpha$ 2 y n= 9 hembras WT para rotarod acelerado; n= 18 hembras KI  $\alpha$ 2 y n= 9 hembras WT para open field.

**2.1.2** El siguiente análisis fue evaluar la respuesta de los ratones KI  $\alpha 2$  frente a la administración de dosis intoxicantes de etanol. Luego de determinar que los ratones KI  $\alpha 2$  no presentaban deficiencias motoras, se determinó la sensibilidad a etanol. Con la prueba de rotarod fijo se estudiaron los efectos intoxicantes de etanol en la coordinación motora (figura 23). Los ratones machos WT y KI  $\alpha 2$  fueron inyectados de manera intraperitoneal (i.p.) con 2 g/kg de etanol y se colocaron en un rodillo que gira a una velocidad constante de 8 rpm hasta un máximo de 120 segundos. Se analizó el tiempo que permanecieron los ratones en el rotarod cada 15 minutos post inyección hasta los 90 minutos. La figura 23A muestra que los ratones machos KI  $\alpha 2$  realizaron la prueba de mejor forma y se recuperaron antes de los efectos de etanol. Los ratones KI  $\alpha 2$  llegaron a los 120 segundos sobre el rotarod a los 75 minutos post inyección, mientras que los ratones WT requirieron más de 90 minutos ( $F_{(1,22)}= 4.950$ ;  $p= 0.0367$ ; Two-way ANOVA de mediciones repetidas y Bonferroni post hoc test,  $n= 12$  KI  $\alpha 2$  y  $n= 12$  WT).

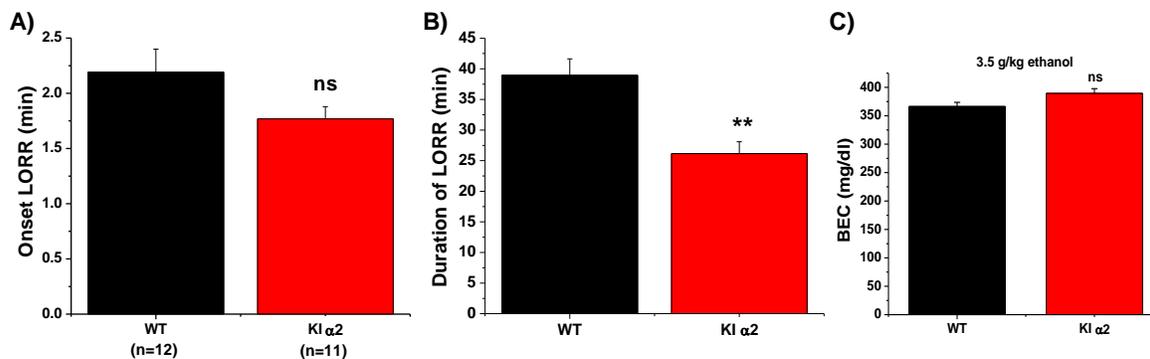
Un resultado similar fue encontrado en la prueba de la pérdida del reflejo de enderezamiento (LORR, del inglés loss of righting reflex). Los ratones KI  $\alpha 2$  son inyectados con una dosis sedativa de etanol (3.5 g/kg) y se registra el tiempo en que pierden el reflejo de enderezamiento (onset of LORR) y el tiempo en que recuperan el reflejo de enderezamiento (duration of LORR). La figura 24 muestra que los ratones machos KI  $\alpha 2$  se recuperan antes que los ratones WT y retoman la posición prona normal de los roedores aproximadamente a los 25 minutos, y los ratones WT lo hacen en más de 35 minutos. ( $t_{(21)}= 1.754$ ;  $p= 0.0941$ ; prueba de t de

Student no pareada para onset of LORR, ns. no significativo;  $t_{(21)} = 3.799$ ;  $p = 0.0010$ ; prueba de t de Student no pareada para duration of LORR;  $n = 11$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 12$  WT). Adicionalmente, para descartar cambios en farmacocinética entre los ratones machos KI  $\alpha 2$  y WT, analizamos la concentración en sangre de etanol (BEC) de los ratones, una hora después de la inyección de 2 o 3.5 g/kg de etanol. Obtuvimos valores de  $206 \pm 9$  mg/dl para el KI  $\alpha 2$  y  $213 \pm 4$  mg/dl para WT luego de la inyección i.p. de 2 g/kg ( $t_{(16)} = 0.7849$ ,  $p = 0.4440$ ; prueba de t de Student no pareada, ns no significativo;  $n = 8$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 10$  WT. Fig. 23B). Y valores de  $389 \pm 8$  mg/dl para KI  $\alpha 2$  y  $366 \pm 7$  mg/dl para ratones WT luego de la inyección de 3.5 g/kg ( $t_{(10)} = 1.932$ ,  $p = 0.0822$ ; prueba de t de Student no pareada, ns. no significativo;  $n = 4$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 8$  WT. Fig. 24C). Destacando que estos valores son similares a los encontrados en otros modelos de ratones (Stevenson, Besheer et al. 2008, Aguayo, Castro et al. 2014), por lo tanto, se sugiere que las diferencias encontradas en la recuperación más rápida de ratones KI  $\alpha 2$  frente a la administración de etanol no son debidas a un mayor o más rápido metabolismo de etanol.



**Figura 23. Los ratones KI  $\alpha$ 2 se recuperan más rápido de los efectos atáxicos de etanol**

A) Prueba de rotarod fijo. Luego de 3 días de entrenamiento, los ratones son inyectados i.p. con 2 g/kg de etanol y se realiza la prueba cada 15 minutos post-inyección hasta los 90 minutos. Los ratones KI  $\alpha$ 2 se recuperan más rápido de la inyección de etanol y logran el máximo de 120 segundos en el rotarod antes que los ratones WT. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA de mediciones repetidas, \* $p < 0.05$ ;  $n = 12$  KI  $\alpha$ 2 y  $n = 14$  WT. B) Gráfico muestra la concentración de etanol en sangre (BEC) luego de la inyección i.p. de 2 g/kg de etanol, en ratones WT y KI  $\alpha$ 2. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Prueba de t de Student no pareada, ns. no significativo.  $n = 8$  KI  $\alpha$ 2 y  $n = 10$  WT.

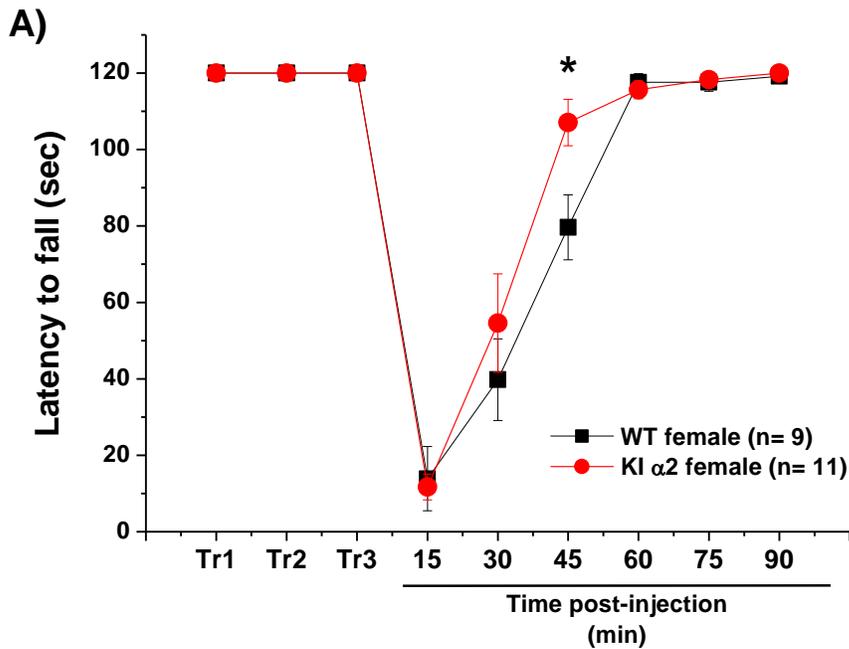


**Figura 24. Los ratones KI  $\alpha 2$  se recuperan más rápido de los efectos sedativos de etanol**

A) Prueba de LORR, ratones son inyectados con 3.5 g/kg de etanol y se registra el tiempo en que pierden el reflejo de enderezamiento (Onset LORR). B) Gráfico muestra el tiempo en que los ratones recuperan el reflejo de enderezamiento (Duration LORR). Los ratones KI  $\alpha 2$  recuperan el reflejo de enderezamiento de manera más rápida que los ratones WT. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Prueba de t de Student no pareada, \*\* $p < 0.01$ ;  $n = 11$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 14$  WT. C) Concentración de etanol en sangre (BEC) luego de una hora después de la inyección i.p. de 3.5 g/kg de etanol. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Prueba de t de Student no pareada, ns. no significativo.  $n = 4$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 8$  WT.

Para evaluar si las hembras KI  $\alpha 2$  presentaban el mismo comportamiento frente a la administración de etanol, realizamos la prueba de rotarod fijo. En la figura 25 se muestra que las hembras KI  $\alpha 2$  se recuperaron más rápido luego de la inyección intraperitoneal de 2 g/kg de etanol y lograron mantenerse en el rotarod fijo por 110 segundos a aproximadamente 45 minutos post inyección, mientras que las hembras WT requirieron alrededor de una hora para lograr mantenerse ese mismo tiempo en el rotarod ( $F_{(1,18)} = 1.656$ ,  $p = 0.2145$ , Two-way ANOVA de mediciones repetidas y Bonferroni post hoc test,  $*p < 0.05$ ,  $n = 11$  hembras KI  $\alpha 2$  y  $n = 9$  hembras WT). Es relevante mencionar que las hembras, tanto las KI  $\alpha 2$  como WT, se recuperaban más rápido que los machos. Las hembras WT y KI  $\alpha 2$  fueron capaces de mantenerse los 120 segundos máximos en el rotarod fijo ya a los 60 minutos post inyección. En comparación, los machos KI  $\alpha 2$  y WT les tomó considerablemente más tiempo para tener el control sobre el rotarod luego de la inyección de 2 g/kg de etanol.

Estos resultados muestran que la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli es importante para la regulación del comportamiento en respuesta a los efectos de etanol en ratones adultos.



**Figura 25. Recuperación más rápida de las hembras KI  $\alpha$ 2 frente a los efectos atáxicos de etanol.**

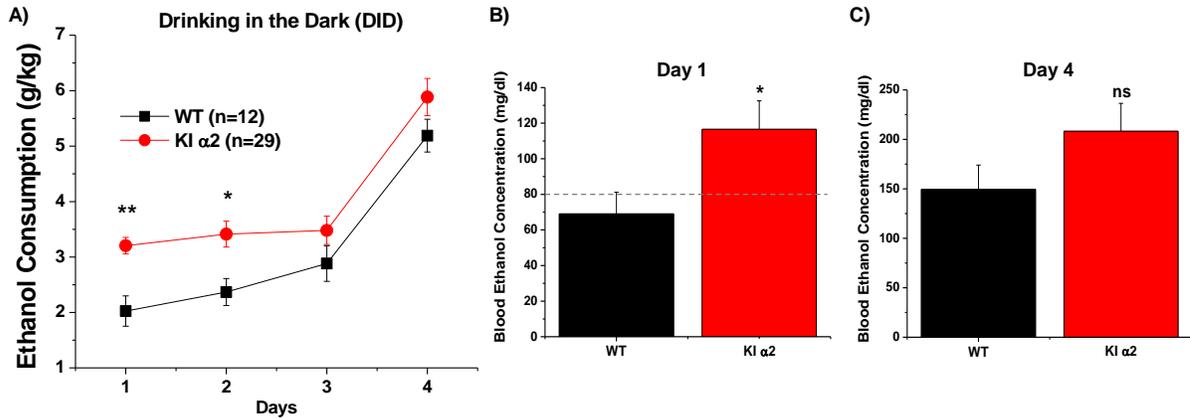
A) Prueba de rotarod fijo. Luego de 3 días de entrenamiento, los ratones son inyectados i.p. con 2 g/kg de etanol y se realiza la prueba cada 15 minutos post-inyección hasta los 90 minutos. Las hembras KI  $\alpha$ 2 se recuperan más rápido de la inyección de etanol que las hembras WT. Ambos genotipos logran el máximo de 120 segundos en el rotarod a aproximadamente 60 minutos post inyección. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA de mediciones repetidas, \* $p < 0.05$ ; n= 11 hembras KI  $\alpha$ 2 y n= 9 hembras WT.

## Actividad 2.2 Evaluación del consumo de etanol en ratones KI $\alpha 2$ .

**2.2.1** El experimento que se realizó para medir el consumo de etanol fue la prueba de consumo en la oscuridad (DID, del inglés: drinking in the dark). Esta prueba se realiza en la fase oscura del ciclo diurno, etapa en que los ratones son más activos. Durante los 3 primeros días de prueba los ratones pueden beber de una solución 15% v/v de etanol durante 2 horas, y el cuarto día pueden beber por 4 horas. Las botellas con la solución de etanol son pesadas antes y después de la prueba y se cuantifican los gramos de etanol consumidos por kilogramos de peso de cada ratón (g/kg). En la figura 26A se observa que los ratones machos KI  $\alpha 2$  comienzan a consumir grandes cantidades de etanol, las que se mantienen altas durante los 3 primeros días de prueba, para luego finalizar con un consumo mayor el último de día de prueba luego de 4 horas de consumo. Situación contraria a la encontrada en ratones machos WT, estos ratones consumen bajas dosis de etanol el primer día y luego consumen de manera escalada, hasta casi equipararse con los KI  $\alpha 2$  el último día de DID ( $F_{(1,93)} = 19.86$ ;  $p = 0.0001$ , Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test \*\* $p < 0.01$  al día 1, \* $p < 0.05$  al día 2.  $n = 29$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 12$  WT). Como control de esta prueba, a los ratones KI  $\alpha 2$  y WT se les midió el consumo de agua durante 2 horas también en la fase oscura del día, y se observó que no existen diferencias significativas entre ambos genotipos (no se muestra figura). Ratones WT consumen en promedio  $30.9 \pm 2.5$  gramos de agua por kilogramo de peso y los KI  $\alpha 2$  consumen  $30.6 \pm 3.4$  g/kg ( $t_{(30)} = 0.05305$ ,  $p = 0.9580$ ; prueba de t de Student no pareada,  $n = 15$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 17$  WT).

Estos resultados sugieren que al igual de lo reportado con el ratón KI  $\alpha 1$  (Muñoz, Gallegos et al. 2019), la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli también tiene un rol en regular el consumo de etanol.

**2.2.2** Análisis de etanol en sangre posterior a la prueba de consumo. Para confirmar los datos encontrados en la prueba de DID, a un grupo de ratones se le extrajo una muestra sanguínea luego del primer día de consumo o del cuarto. La figura 26B y C muestra la concentración de etanol en sangre (BEC) la que entregó valores que concuerdan con lo encontrado en la prueba DID. Los ratones KI  $\alpha 2$  obtuvieron valores mayores a 110 miligramos de etanol por decilitro de sangre (mg/dl), mientras que los de ratones WT no superaron los 80 mg/dl en el primer día de consumo ( $t_{(18)}= 2.433$ ;  $p= 0.0256$ ; prueba de t de Student no pareada,  $n= 10$  KI  $\alpha 2$  y  $n= 10$  WT). Posterior al cuarto día de consumo, los valores de BEC se equipararon entre ambos genotipos, siendo los del KI  $\alpha 2$  mayores, pero no significativamente distintos. ( $t_{(18)}= 1.436$ ;  $p= 0.1607$ ; prueba de t de Student no pareada, ns. no significativa.  $n= 12$  KI  $\alpha 2$  y  $n= 8$  WT).



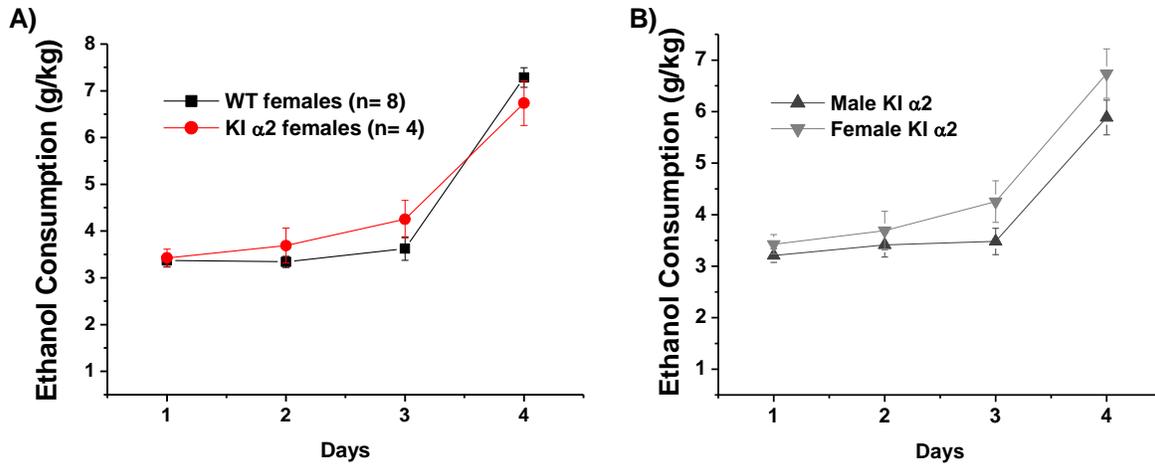
**Figura 26. Ratones KI  $\alpha$ 2 consumen más etanol que ratones WT**

A) Prueba de consumo de etanol DID (del inglés, drinking in the dark). A) Gráfico muestra el consumo de etanol en los 4 días de prueba. Los ratones KI  $\alpha$ 2 consumen más etanol que los ratones WT en los primeros días de prueba. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ;  $n = 29$  KI  $\alpha$ 2 y  $n = 12$  WT. B) BEC luego del primer día de consumo. Se encontraron mayores niveles de etanol en sangre en los ratones KI  $\alpha$ 2 que los WT. C) BEC luego del cuarto día de consumo. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Prueba de t de Student no pareada, \* $p < 0.05$ , ns. no significativo;  $n = 10$  KI  $\alpha$ 2 y  $n = 10$  WT para el primer día y  $n = 12$  KI  $\alpha$ 2 y  $n = 8$  WT para el día 4.

Se ha reportado que ratones hembras C57BL/6J beben mayores cantidades de etanol que los machos (Middaugh, Kelley et al. 1999, Satta, Hilderbrand et al. 2018), por esta razón decidimos separar los datos obtenidos con machos y hembras en la prueba DID. De acuerdo con lo reportado en literatura, las hembras KI  $\alpha 2$  y WT, las que poseen un background genético de C57BL/6J, comienzan bebiendo grandes cantidades de etanol ( $3.42 \pm 0.2$  en KI  $\alpha 2$  versus  $3.49 \pm 0.2$  g/kg en WT); no encontrando diferencias significativas entre ambos genotipos ( $F_{(1,40)} = 0.4190$ ,  $p = 0.5211$ , Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test.  $n = 4$  hembras KI  $\alpha 2$  y  $n = 8$  hembras WT; Fig. 27).

Interesantemente, cuando se compara el consumo de etanol de ratones machos y hembras KI  $\alpha 2$  (figura 27B), se observan valores similares con un leve aumento en las hembras, las cuales alcanzan valores de  $6.7 \pm 0.5$  g/kg de etanol y los machos alcanzan  $5.8 \pm 0.3$  g/kg al cuarto día de prueba DID ( $F_{(1,73)} = 4.908$ ,  $p = 0.0298$ , Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test.  $n = 29$  machos KI  $\alpha 2$  y  $n = 4$  hembras KI  $\alpha 2$ ).

Con estos datos podemos concluir que la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli es importante para la regulación del consumo de etanol, sin embargo, este fenómeno estaría más marcado en los ratones machos.



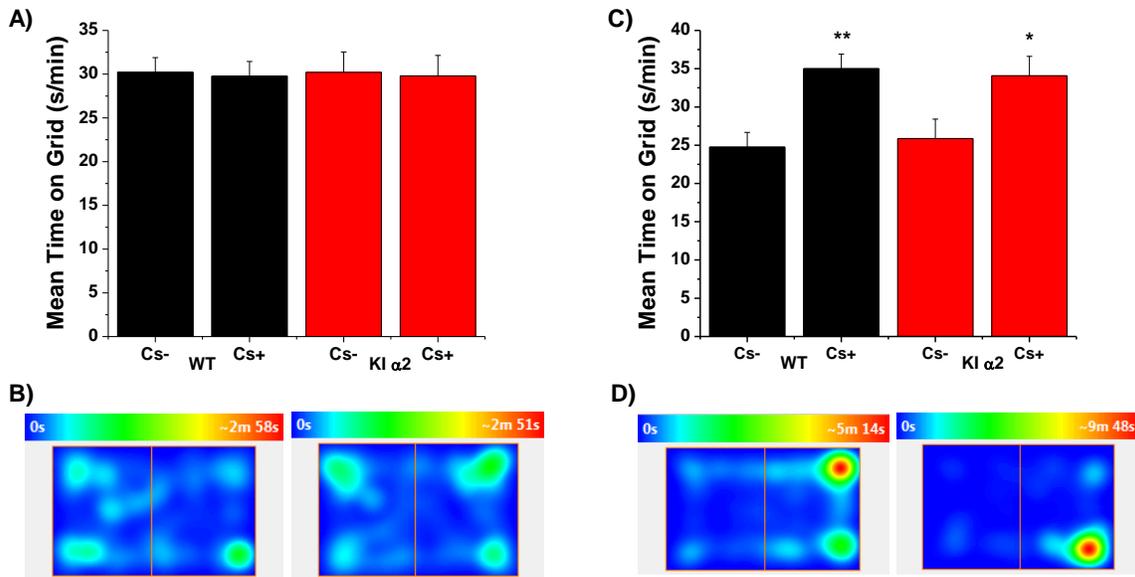
**Figura 27. Alto consumo de etanol en ratones hembras**

Prueba de consumo de etanol DID. A) Gráfico muestra el consumo de etanol en los 4 días de prueba. Las hembras KI  $\alpha$ 2 y WT consumen grandes cantidades de etanol ya desde el primer día de prueba. B) Gráfico de prueba DID entre machos y hembras KI  $\alpha$ 2. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test; n= 4 hembras KI  $\alpha$ 2, n= 8 hembras WT y n= 29 machos KI  $\alpha$ 2.

## Actividad 2.3 Análisis de la preferencia por etanol.

**2.3.1** Se utilizó el experimento de preferencia condicionada a un lugar (CPP, del inglés conditioned place preference). Esta prueba se basa en el condicionamiento Pavloviano asociado a una droga, en este caso etanol, pareado con un tipo de suelo. El suelo con rejilla pequeña asociado a etanol se denomina Cs+ y el suelo de rejilla grande asociado a solución salina se denomina Cs-. En la figura 28 se observa el gráfico que muestra que previo a las sesiones de condicionamiento, los ratones machos KI  $\alpha 2$  y WT no tienen preferencia por un lugar y pasan la misma cantidad de tiempo en ambas cámaras de condicionamiento. Luego de las 8 sesiones de condicionamiento, la prueba final de 30 minutos determinó que tanto los ratones KI  $\alpha 2$  y los WT prefieren el lugar asociado a etanol ( $F_{(1,44)} = 0.002585$ ;  $p = 0.9597$ ; Two-way ANOVA y Bonferroni post hoc test,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ ,  $n = 11$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 13$  WT). Estos resultados también se pueden observar en el mapa de calor en la figura 28B y D, donde ambos genotipos prefieren la cámara Cs+ asociada con etanol. Lo que significa que ambos obtienen efectos recompensantes de etanol.

Los datos obtenidos con el ratón KI  $\alpha 2$ , sugieren un rol de la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli en el nAc. Las corrientes de glicina que se potencian por etanol regularían la activación del nAc. Con la mutación del ratón KI  $\alpha 2$  estos animales perderían regulación inhibitoria en las neuronas del nAc, por lo que estos ratones consumen más etanol que sus símiles WT.



**Figura 28. Los ratones KI  $\alpha 2$  y WT se condicionan a preferir el lugar asociado a etanol**

A) Gráfico muestra el tiempo de preferencia a cada cámara de CPP, previo a las 8 sesiones de condicionamiento. Se grafican los segundos en un minuto de prueba.

B) Mapa de calor de los ratones WT y KI  $\alpha 2$  previo al condicionamiento. C) Gráfico muestra el tiempo de preferencia luego de las 8 sesiones de condicionamiento. Tanto ratones WT como KI  $\alpha 2$  se condicionan a preferir el lado asociado a etanol.

D) Mapa de calor de los ratones WT y KI  $\alpha 2$  luego de las sesiones de condicionamiento. Datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA; \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ;  $n = 11$  KI  $\alpha 2$  y  $n = 13$  WT.

## Discusión

Esta tesis se realizó en el contexto del estudio del alto consumo de etanol a nivel mundial, lo que ha traído consigo un alto costo social y biomédico. Desafortunadamente este trastorno no presenta un tratamiento adecuado, y para poder generar una nueva estrategia terapéutica es importante primero entender cómo se regula a nivel cerebral los procesos que llevan al consumo de esta droga. Las regiones cerebrales que regulan la búsqueda de estímulos recompensantes naturales y además las drogas de abuso, forman un circuito neuronal que se denomina Sistema de recompensa. Este sistema lo componen el área tegmental ventral, la corteza prefrontal y el núcleo Accumbens (nAc), principalmente. El nAc es una región reguladora importante la cual mediante 2 vías promueve la búsqueda y el consumo de alguna droga. La vía directa la componen las neuronas D1 MSN y tiene una función en recompensa; la vía indirecta la componen las neuronas D2 MSN y esta vía está relacionada con eversión (Nakanishi, Hikida et al. 2014).

La regulación adecuada de la excitabilidad en el sistema de recompensa es importante para evitar la sobre-activación, específicamente de las D1 MSN, y no comenzar un proceso de potenciación a largo plazo en estas neuronas lo que podría iniciar el desarrollo de una adicción (Nestler 2001). Como el nAc recibe estímulos excitatorios de distintas regiones cerebrales, la presencia del receptor de glicina (R-Gli) es importante para mantener el balance excitatorio/inhibitorio de esta región. El R-Gli es un receptor inhibitorio que al ser activado provoca la entrada de cloruro a las neuronas generando la hiperpolarización de estas (Burgos, Muñoz et al. 2015).

Cuando el receptor es además potenciado por etanol, se aumenta su efecto inhibitorio.

La presencia del R-Gli en el nAc sugiere un rol en la regulación inhibitoria de esta región, y esto fue analizado previamente en nuestro laboratorio. Se identificó la presencia de corrientes tónicas mediadas por el R-Gli la cuales se potenciaban con concentraciones altas de etanol (Förstera, Muñoz et al. 2017). Con respecto a las MSN del nAc se reportó que las D1 MSN eran más sensibles a glicina y presentaban mayor densidad de corriente de glicina que las D2 MSN, y ambas potenciaban con una concentración alta de etanol. Luego, cuando se quiso identificar la composición del R-Gli en el nAc, se demostró la presencia de ARNm de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$  (Förstera, Muñoz et al. 2017), y que la subunidad  $\alpha 1$  era importante para la regulación de la excitabilidad del nAc y en el consumo de etanol (Muñoz, Gallegos et al. 2019).

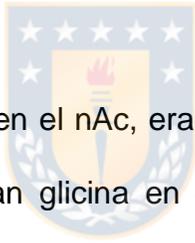
De estos antecedentes mencionados aparecieron interrogantes sobre la función del R-Gli en el nAc y en el comportamiento de los ratones frente a etanol. Tales como:

- ¿De qué región del cerebro proviene la glicina que activa a los R-Gli del nAc?
- ¿Son los R-Gli presentes en las neuronas del nAc sensibles a bajas concentraciones de etanol, y si existen diferencias entre las MSN?
- Si existe potenciación de la corriente del R-Gli por bajas concentraciones de etanol en el nAc, ¿es suficiente para generar cambios en la excitabilidad de estas neuronas?
- ¿Cuál es la composición del R-Gli en el nAc?, ¿tiene algún rol la subunidad  $\alpha 2$  en la regulación del nAc?

- Y finalmente, ¿es importante la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli para mediar el comportamiento de ratones frente a etanol?

Para poder dar respuesta a estas preguntas, es que en esta tesis evaluamos mediante electrofisiología y estudios de comportamiento, el rol del R-Gli en el nAc con respecto a la regulación inhibitoria que este receptor estaría ejerciendo en esta región, y como esto afecta no solo la activación del nAc, sino que también la activación del sistema de recompensa, lo que finalmente se observa en cambios en el comportamiento de los ratones.

#### Inervación glicinérgica en el nAc.

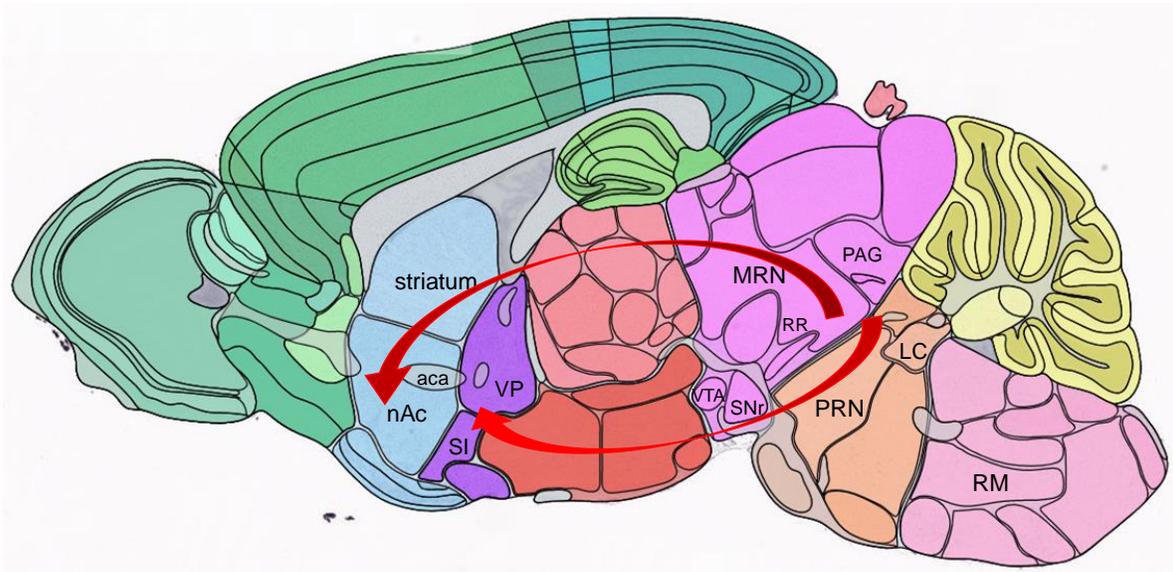


Antes de analizar el rol del R-Gli en el nAc, era importante identificar la presencia de neuronas que pudiesen liberar glicina en el nAc para confirmar que existe activación de R-Gli tanto sinápticos como extra-sinápticos los que median las corrientes de tipo fásicas y tónicas, respectivamente, que han sido estudiadas previamente en nuestro laboratorio. Con el uso del ratón GlyT2-GFP se reportó en el año 2005 que las fibras GlyT2-positivas que llegaban al hipotálamo y al prosencéfalo basal se originarían de regiones posteriores a nivel del tronco encefálico, ya que no observaron neuronas GlyT2-positivas en el prosencéfalo (Zeilhofer, Studler et al. 2005). Si bien, existe la presencia de inervación glicinérgica en regiones del prosencéfalo, se desconoce cuál es el área que estaría liberando glicina en esta región y específicamente en el nAc. Por esta razón, en esta tesis quisimos estudiar este tema y utilizamos un marcador viral retrogrado inyectado en

el nAc, de esta forma pudimos encontrar neuronas GlyT2-GFP positivas cercanas al nAc, posiblemente interneuronas, pero de manera aislada y no en todos los cortes y principalmente se observaban fibras de proyección (figura 8), similar a lo que se había reportado con el uso del ratón GlyT2-GFP. En la figura 9 se mostró que los principales grupos neuronales GFP-positivos encontrados en esta tesis se ubicaban en el mesencéfalo. Estos datos tienen relación y están en acuerdo con que parte de la innervación del nAc proviene de regiones distantes y más caudales del mesencéfalo como el VTA y en este caso, como podrían ser los núcleos reticulares del mesencéfalo.

Un estudio reciente exploró sobre la innervación glicinérgica en regiones del prosencéfalo basal (cerebro anterior) como el septum medial, núcleo pálido ventral y la sustancia innominada que presentan neuronas colinérgicas que promueven vigilia, y neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que están más activas durante vigilia y sueño de tipo REM (Bardóczi, Pál et al. 2017). Estas regiones están en cercana proximidad con el nAc (Franklin and Paxinos 2008). Similar a lo que reportamos en esta tesis, la mayor cantidad de neuronas GlyT2-positivas que innervaban estas regiones se encontraban en el núcleo magno del Rafe, y algunas neuronas también provenían de los núcleos reticulares de la protuberancia, del núcleo reticular gigante-celular y algunas neuronas se detectaron en la sustancia gris periaqueductal, nuevamente, áreas caudales del mesencéfalo y protuberancia (Bardóczi, Pál et al. 2017). Por lo tanto, no resulta sorprendente haber encontrado en esta tesis que grupos neuronales de regiones del mesencéfalo estarían enviando señales inhibitorias al prosencéfalo. Y así como reportan en el trabajo de Bardóczi et al. el 2017, el núcleo reticular gigantocelular y el núcleo magno del Rafe generan

una vía descendiente que controla la hipotonía muscular durante el sueño REM, sin embargo, se desconoce el rol de la liberación de glicina en las regiones del prosencéfalo o si se relaciona con algún tipo específico de comportamiento. Una posibilidad podría ser la regulación del sistema de recompensa ya que las neuronas del nAc se conectan con las neuronas del núcleo pálido ventral. Lo que hace aún más interesante, como proyecciones de esta tesis, el poder continuar el análisis de estas áreas con estudios posteriores. Esta es primera vez que se reporta sobre la innervación glicinérgica del nAc, por lo tanto, aún queda definir de manera más precisa la región que está liberando glicina en el nAc, el tipo de neuronas, como se mostró en la figura 10B estas neuronas GlyT2-GFP-positivas no presentaban la marca de tirosina hidroxilasa, por lo tanto no serían neuronas dopaminérgicas que co-liberarían glicina y finalmente sería importante realizar estudios funcionales en estas neuronas y evaluar que ocurre en el nAc si estas neuronas son activadas o inhibidas. La figura 29 muestra un esquema de las principales áreas que liberan glicina en núcleos del prosencéfalo.



**Figura 29. Regiones del mesencéfalo y protuberancia que liberan glicina en áreas del prosencéfalo basal**

\*Esquema muestra las principales regiones que liberan glicina en áreas del prosencéfalo basal. En el caso del nAc, en esta tesis se identificó que la principal innervación glicinérgica provenía de núcleos reticulares del mesencéfalo (MRN), cercano a la zona retrorubral (RR) o del locus cerúleo (LC), flecha roja oscura. Otras regiones del prosencéfalo como la sustancia innominada (SI) y el núcleo pálido ventral (VP) reciben innervación glicinérgica desde el núcleo magno del Rafe (RM), núcleos reticulares de la protuberancia (PRN) y la sustancia gris periacueductal (PAG), publicado por Bardóczi et al 2017, flecha roja clara.

aca: comisura anterior; VTA: área tegmental ventral; SNr: sustancia nigra *pars reticulata*. Imagen modificada del mapa cerebral de ratón del Instituto Allen (Allen Institute for Brain Science 2010).

\*representación esquemática de áreas que no necesariamente se encuentran en el mismo plano sagital, pero que se muestran de esta forma para un mejor entendimiento de las vías.

## Potenciación por etanol del R-Gli en el nAc y el impacto en la excitabilidad.

Se había reportado anteriormente que los R-Gli en neuronas de la medula espinal eran potenciadas por concentraciones desde los 10 mM de etanol (Aguayo, Tapia et al. 1996). De manera similar, en motoneuronas del hipogloso, el R-Gli se potenciaba con concentraciones desde 30 mM (Eggers and Berger 2004, Aguayo, Castro et al. 2014). En regiones cerebrales supra espinales, estudios también han observado la potenciación del R-Gli con concentraciones bajas de etanol (Ye, Tao et al. 2001, Maguire, Mitchell et al. 2014). Y en nAc, recientemente fueron evaluados los efectos de 100 mM (Förstera, Muñoz et al. 2017). Con esta alta concentración no fue posible encontrar una diferencia entre las MSN de este núcleo. Por esta razón, en esta tesis, evaluamos los efectos de bajas concentraciones de etanol (10-50 mM), concentraciones que pueden ser encontradas en clínica al analizar muestras sanguíneas de pacientes (Pizon, Becker et al. 2007).

Adicionalmente, se ha reportado la presencia de corrientes tónicas por activación de receptores GABA<sub>A</sub> con la conformación  $\alpha 4\beta\delta$  en el nAc, y estas corrientes eran capaces de afectar el disparo de potenciales de acción en estas neuronas (Maguire, Macpherson et al. 2014). De manera similar, también fue reportado la presencia de una corriente tónica mediada por el R-Gli en las D1 MSN del nAc, esta corriente era de aproximadamente  $11 \pm 5$  pA, la que se potenciaba por el uso de un inhibidor del transportador glial de glicina GlyT1 (Org24598) o por la aplicación de etanol 100 mM (Förstera, Muñoz et al. 2017). En esta tesis, encontramos que las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli también eran sensibles a bajas concentraciones de etanol, y observamos una potenciación de esta corriente con 10 y 50 mM (figura 11).

Interesantemente, esta potenciación de la corriente tónica con concentraciones farmacológicas de etanol era suficiente para disminuir la excitabilidad de las D1(+), 10 mM de etanol redujo el número de potenciales de acción aproximadamente un 16% y 50 mM lo redujo un 34%. Fenómeno que no se observó en las D1(-) (figura 12 y 13). Esto es relevante porque el nAc está recibiendo constantemente inputs excitatorios glutamatérgicos desde la PFC, amígdala e hipocampo. Para luego sobre-activarse, específicamente la vía directa de las D1 MSN, cuando desde el VTA se liberan grandes cantidades de DA en el nAc luego del consumo de etanol. Por lo tanto, una regulación inhibitoria selectiva en esta vía se hace imprescindible, y es ahí donde participa el R-Gli.

Un dato importante a mencionar es que no se evidenciaron cambios en el número de PA en presencia de STN. Si bien existía un pequeño cambio en el potencial de reposo esto no era suficiente para aumentar la frecuencia de disparo de los PA en las D1(+). Situación que se repitió cuando las rebanadas eran perfundidas con bicuculina. Es probable que la metodología y el uso de rebanadas coronales de cerebro haga perder inputs inhibitorios/excitatorios en las regiones de estudio y por esto no se observen cambios en los PA. Aunque este fenómeno también fue reportado en el estudio de la corteza orbitofrontal lateral, donde STN evitaba que etanol disminuyera el número de PA, pero STN por sí sola no tenía efectos en los PA (Badanich, Mulholland et al. 2013).

### La potenciación por etanol del R-Gli depende de las subunidades que lo componen.

Estudios previos han mostrado que la subunidad  $\alpha 1$  del R-Gli se potencia con etanol, pero no la  $\alpha 2$  homomérica (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2010). Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio, realizados en células HEK-293 transfectadas con receptores homoméricos y heteroméricos, evidenciaron que la conformación  $\alpha 2\beta$  es altamente sensible a etanol y con 100 mM se potencia un 100% (Muñoz et al. en preparación). La subunidad  $\beta$  estaría proporcionando los cambios conformacionales necesarios para que la unión de  $G\beta\gamma$  en el loop intracelular de  $\alpha 2$  ahora sea una unión funcional y el receptor puede potenciarse. En este mismo trabajo, se hicieron las pruebas con el receptor  $\alpha 2$  KI (KR389-390AA) los cuales fueron previos a la generación del ratón KI  $\alpha 2$ . Los registros electrofisiológicos mostraron que con esta mutación el receptor  $\alpha 2\beta$  se volvía insensible a etanol. Y similar a lo que fue el estudio realizado en  $\alpha 1$  KI (KK385-386AA), esta mutación era específica para la modulación de etanol mediada por  $G\beta\gamma$ , y no se observaba alteración en la modulación por otros moduladores alostéricos. Por esta razón, es que se llevó a cabo la generación del animal KI  $\alpha 2$ , para poder analizar el rol de  $\alpha 2$  en el nAc y en el comportamiento del ratón.

### Presencia de R-Gli heteroméricos en el nAc.

Recientemente fue publicada la presencia de ARNm de distintas subunidades del R-Gli en el nAc ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$ ) (Jonsson, Morud et al. 2012), y específicamente en los dos tipos de MSN (Förstera, Muñoz et al. 2017). En ese trabajo también se

mostraron ensayos de IHC donde se observó la presencia de las subunidades  $\alpha$  del R-Gli, utilizando un anticuerpo pan  $\alpha$  que reconoce todas las subunidades  $\alpha$ , porque no existen anticuerpos específicos para cada subunidad (Jonsson, Morud et al. 2012, Förstera, Muñoz et al. 2017). Por lo tanto, una forma de evaluar las distintas subunidades del R-Gli es mediante electrofisiología y para primero evaluar que en el nAc existen receptores heteroméricos ( $\alpha1\beta$  y/o  $\alpha2\beta$ ), se realizaron registros electrofisiológicos con picrotoxina, un inhibidor no-competitivo de canales iónicos activados por ligando (Burgos, Muñoz et al. 2015), en neuronas disociadas de nAc de ratones WT (tesis doctoral en preparación de Aníbal Araya), donde se muestra que esta molécula inhibe la corriente de glicina un 40%. Sugiriendo que los receptores presentes en nAc son de tipo heteroméricos, ya que picrotoxina inhibe principalmente a los receptores de tipo homoméricos (Lynch 2009, Maleeva, Peiretti et al. 2017). Además, datos de canal único en las D1 MSN mostraron que los R-Gli presentaban conductancias de alrededor de 40 pS (tesis doctoral Braulio Muñoz), un valor que se asocia a R-Gli heteroméricos (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008, Lynch 2009, Yevenes, Moraga-Cid et al. 2010). Basándonos en esto, podemos inferir que en el nAc está expresado el R-Gli con una conformación  $\alpha1\beta$  y  $\alpha2\beta$ , por lo tanto, al registrar neuronas del ratón KI  $\alpha2$ , si los R-Gli no se potencian con etanol, podríamos sugerir que el receptor  $\alpha2\beta$  está presente en esta región.

#### Presencia de la subunidad $\alpha2$ del R-Gli en el nAc.

La subunidad  $\alpha2$  del R-Gli ha sido generalmente descrita como una subunidad que está altamente expresada en estadios tempranos del desarrollo del SNC (Malosio,

Marquèze-Pouey et al. 1991). En medula espinal y tronco encefálico, esta subunidad es luego reemplazada por  $\alpha 1$  en roedores juveniles y adultos (Watanabe and Akagi 1995, Singer, Talley et al. 1998). Interesantemente, aunque se ha reportado la presencia de  $\alpha 2$  en regiones cerebrales supra-espinales, aún se desconoce su función fisiológica (Burgos, Muñoz et al. 2015). Utilizando un modelo de ratón KO para el R-Gli  $\alpha 2$  se reportó que en ausencia de esta subunidad las neuronas del estriado dorsal se encuentran más hiperpolarizadas y disparan menos PA (Molchanova, Comhair et al. 2018). Otro estudio también sugirió la importancia de la subunidad  $\alpha 2$  en el consumo y preferencia de etanol usando otro modelo de ratón KO para  $\alpha 2$ , el cual mostró que esos ratones tenían una ingesta y preferencia reducida de etanol (Blednov, Benavidez et al. 2015). Sin embargo, esos resultados pueden ser confusos por las posibles compensaciones que ocurren durante el desarrollo de estos animales KO. Considerando que el R-Gli  $\alpha 2$  es importante para el desarrollo de conexiones sinápticas y la migración de interneuronas corticales (Avila, Vidal et al. 2013, Morelli, Avila et al. 2017), es probable la aparición de cambios o alteraciones en el SNC. Por esto, es que el uso de un ratón KI con R-Gli funcional, pero con menor sensibilidad a etanol, es un mejor acercamiento al estudio del rol de la subunidad  $\alpha 2$ .

En esta tesis, se evaluó el rol de la subunidad  $\alpha 2$  en el nAc mediante registros de patch clamp en neuronas disociadas y en rebanadas de nAc. Cuando se registraron neuronas disociadas del nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , encontramos que los R-Gli se activaban con la aplicación de glicina y se bloqueaban con STN. Al evocar corrientes con concentraciones crecientes de glicina, pudimos obtener una curva

concentración-respuesta, la cual entregó un valor distinto de  $EC_{50}$  al encontrado en el nAc de ratones WT. Si bien el  $EC_{50}$  del ratón KI  $\alpha 2$  fue de 31  $\mu M$  de glicina, y el del WT fue de 54  $\mu M$ , el promedio de las corrientes máximas evocadas con 1000  $\mu M$  de glicina y la densidad de corriente de glicina encontrada en el nAc, no varió con respecto a la encontrada en el nAc del ratón WT (Figura 14). Puede que la mutación haga que el receptor  $\alpha 2$  se convierta en un fenotipo más como  $\alpha 1$ , pero si este fuera el caso, los registros con etanol no hubiesen mostrado diferencias significativas entre el WT y el KI  $\alpha 2$ , porque el R-Gli  $\alpha 1$  si se potencia con etanol. Sin embargo, si se obtuvieron diferencias entre los 2 genotipos. El análisis de los efectos de distintas concentraciones de etanol (10, 50 y 100 mM) mostró que los R-Gli en el nAc del animal KI  $\alpha 2$  se potenciaban considerablemente menos con etanol que en las neuronas del ratón WT y además el porcentaje de neuronas que potenciaba con etanol también era menor (figura 15). Estos resultados fueron obtenidos utilizando el  $EC_{10}$  de glicina utilizado en literatura, el cual es 15  $\mu M$  de glicina. Para este tipo de estudio se utilizan concentraciones bajas de glicina para activar la respuesta del receptor antes de analizar los efectos de etanol, y esto es porque etanol como modulador alostérico provoca un desplazamiento de la curva de glicina a la izquierda (Aguayo, Tapia et al. 1996), y un aumento de la probabilidad de apertura (nPo) del canal (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008). Con concentraciones de glicina sobre el  $EC_{50}$  del receptor la nPo es cercana a 1 y la probabilidad de apertura es máxima, por lo tanto, a esas concentraciones no se puede evaluar los efectos de etanol.

Considerando que la curva concentración-respuesta a glicina del KI  $\alpha 2$  estaba desplazada a la izquierda (figura 14), el valor del  $EC_{10}$  para ese caso correspondería a 10  $\mu M$  aproximadamente, por lo tanto, al usar una concentración más alta de glicina se podrían haber perdido los efectos de etanol y haber mostrado una potenciación menor de la corriente de glicina. No obstante, cuando realizamos registros de potenciación por etanol activando primero con 10  $\mu M$  de glicina observamos el mismo fenómeno, la potenciación por etanol en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  estaba significativamente más reducida comparada al ratón WT (figura 16). De esta forma, podríamos sugerir que en el nAc existe la presencia del receptor  $\alpha 2\beta$ . Afirmación que se apoya con los siguientes estudios realizados en el nAc. Cuando se registraron las corrientes tónicas mediadas por el R-Gli en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$ , se observó que la mayoría de las neuronas presentaban corrientes tónicas que no se potenciaban con una concentración alta de etanol (figura 17). En estos experimentos se utilizó una concentración alta de etanol para evitar confusiones sobre si no se observaba potenciación era por la presencia de R-Gli mutados KI  $\alpha 2$  o porque la concentración no era capaz de generar un cambio, considerando que los cambios de corriente tónica no sobrepasan los 10 pA. Por lo tanto, como ya se había publicado, para asegurar la potenciación utilizamos 100 mM (Förstera, Muñoz et al. 2017, Muñoz, Gallegos et al. 2019), y además porque el KI  $\alpha 2$  era un modelo de estudio nuevo, y no existen datos con concentraciones altas de etanol. Por último, en acuerdo con lo observado en las corrientes evocadas y la corriente tónica mediada por el R-Gli, etanol 100 mM no provocó cambios en el número de

potenciales de acción, situación distinta a lo encontrado en el nAc del ratón WT donde el número de PA se reduce de manera significativa (figura 18).

Finalmente, si bien sugerir que la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli está presente en el nAc aún puede generar dudas por el hecho de que existen diferencias entre las MSN del nAc con respecto a la expresión del R-Gli. Y como el ratón KI  $\alpha 2$  es un ratón global, la mutación KR389-390AA puede estar en ambas MSN, y existe la posibilidad de haber registrado solo neuronas de tipo D2 MSN, ya que morfológicamente las D1 como D2 MSN son indistinguibles. El análisis de las D1(-) realizado previamente en el laboratorio, más lo realizado en esta tesis, es que en estas neuronas la sensibilidad a glicina y a etanol está disminuida, por lo tanto, si se registran solo neuronas D1(-), estas tengan o no tengan la mutación KI  $\alpha 2$ , van a mostrar bajo porcentaje de potenciación por etanol. Por lo tanto, de qué forma podemos asegurar que a lo menos el 50% de las neuronas que registramos en esta tesis corresponden a D1 MSN y no D2, esto podría ser por las corrientes evocadas de glicina.

El  $EC_{50}$  de las D2 MSN corresponde a aproximadamente 61  $\mu M$  de glicina, una concentración mayor a la de las D1 MSN, entonces cuando se aplicaba 10  $\mu M$  de glicina prácticamente no se evocaba respuesta (Förstera, Muñoz et al. 2017). Por lo tanto, al utilizar 10 o 15  $\mu M$  de glicina que corresponden al  $EC_{10}$  con el que se realiza la activación con glicina para evaluar la potenciación por etanol, si solo se hubiesen registrado neuronas de tipo D2, no se hubiese observado una corriente evocada de glicina con amplitud mayor a 20 pA. Y como se observa en la figura 15, cuando se aplicaban 15  $\mu M$  de glicina en las neuronas del nAc tanto del ratón WT como del KI  $\alpha 2$ , se observaban corrientes de glicina mayores de 50 pA, lo que podría sugerir

que no se están registrando neuronas de tipo D2. Por ende, la baja potenciación por etanol que se observa en las neuronas registradas del KI  $\alpha 2$ , no sería por el hecho de estar registrando neuronas de tipo de D2, sino que en las D1 MSN la mutación en  $\alpha 2$  estaría provocando este cambio.

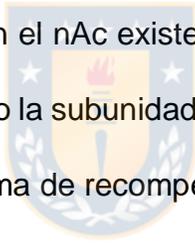
Y es por esto, que junto a los datos que están en literatura más los resultados de esta tesis que acabamos de discutir, podemos sugerir que la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli está presente en el nAc, y formando parte del receptor heteromérico  $\alpha 2\beta$ , el cual tendría una función reguladora en este núcleo.

#### Función de la subunidad $\alpha 2$ del R-Gli en el nAc.

Como se ha mencionado anteriormente, existe la presencia de ARNm para el R-Gli  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$  en el nAc (Jonsson, Morud et al. 2012, Förstera, Muñoz et al. 2017). Otro estudio, utilizando el modelo de ratón KI  $\alpha 1$  indicó que la subunidad  $\alpha 1$  participaba en la regulación de la excitabilidad de las MSN del nAc (Muñoz, Gallegos et al. 2019). Similarmente, en esta tesis utilizando el modelo de ratón KI  $\alpha 2$ , mostramos que la potenciación estaba significativamente atenuada en el nAc del ratón KI  $\alpha 2$  comparado con el ratón WT. La corriente tónica mediada por el R-Gli tampoco fue potenciada por una concentración alta de etanol, y la excitabilidad de las MSN del nAc no se vio afectada por la presencia de etanol. Estos datos indican que la subunidad  $\alpha 2$ , específicamente el R-Gli  $\alpha 2\beta$ , es importante para este proceso porque etanol en las neuronas del nAc del ratón WT redujo el número de potenciales de acción en aproximadamente 30% (figura 18). La tabla 2 muestra la comparación de los resultados de electrofisiología en el nAc obtenidos del análisis de los ratones

KI  $\alpha 1$  y KI  $\alpha 2$ . Podemos ver que ambas mutaciones en el R-Gli afectan la excitabilidad del nAc. Se podría inferir que la subunidad  $\alpha 1$  es más importante y está más expresada en el nAc, ya que 80% de las neuronas registradas en ese modelo de ratón no potenciaron con etanol y el R-Gli al no poder potenciarse no pudo disminuir el número de PA en presencia de etanol, incluso reportando que la excitabilidad del nAc aumentó en aproximadamente un 10% (Muñoz, Gallegos et al. 2019). Aun así, la subunidad  $\alpha 2$  sería igualmente importante, pero expresada en un menor nivel que la  $\alpha 1$ , reafirmando los datos de PCR ya publicados (Förstera, Muñoz et al. 2017).

Por lo tanto, uniendo los datos obtenidos con los modelos de ratones KI  $\alpha 1$  y KI  $\alpha 2$ , podemos apoyar la idea de que en el nAc existe una heterogeneidad con respecto a la expresión del R-Gli, y que tanto la subunidad  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  participan en la regulación inhibitoria de esta región del sistema de recompensa.



	WT	KI $\alpha$ 1	KI $\alpha$ 2
<b>Glycine EC50 (<math>\mu</math>M)</b>	<b>47 <math>\pm</math>6 (54<math>\pm</math>3)</b>	<b>54<math>\pm</math>1</b>	<b>31<math>\pm</math>4</b>
<b>Percentage of potentiation with 50 mM</b>	<b>45 (67)</b>	<b>-13</b>	<b>23</b>
<b>Percentage of neurons that potentiated with 50 mM</b>	<b>80 (92)</b>	<b>20</b>	<b>48</b>
<b>Excitability 100 mM ethanol</b>	<b>Reduced</b>	<b>Increased</b>	<b>Not affected</b>

**Tabla 2. Comparación de resultados de electrofisiología en el nAc entre ratones KI  $\alpha$ 1 y KI  $\alpha$ 2**

Datos del ratón KI  $\alpha$ 1 fueron obtenidos de la publicación de Muñoz et al. 2019.

Los datos entre paréntesis corresponden a los obtenidos de los WT utilizados en esta tesis, los que difieren de los utilizados en el estudio del KI  $\alpha$ 1.



## Rol de la subunidad $\alpha 2$ en el comportamiento frente a los efectos de etanol.

Los estudios previos a la generación del ratón KI  $\alpha 2$  en un sistema recombinante determinaron que los aminoácidos básicos KR389-390 en el loop intracelular de la subunidad  $\alpha 2$  eran críticos para la unión de  $G\beta\gamma$  (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2010). Luego, experimentos adicionales identificaron que la subunidad  $\beta$  le otorga la estructura necesaria para que  $G\beta\gamma$  pueda modular al receptor  $\alpha 2$  y este si se potencia por etanol (Muñoz et al. en preparación). Además de lo encontrado en la subunidad  $\alpha 1$ , los residuos KK385-386 que eran específicos para la modulación de etanol y no para otros moduladores alostéricos (Yevenes, Moraga-Cid et al. 2008), se aplicaba también para los residuos en  $\alpha 2$ . Por lo tanto, el receptor  $\alpha 2\beta$  mutado KR389-390AA se activa con glicina, no se potencia por etanol y no se afecta la modulación por anestésicos generales ni otros n-alcoholes (Muñoz et al. en preparación). Es por esto, que el modelo del ratón KI  $\alpha 2$  era un buen acercamiento para evaluar el rol de la subunidad  $\alpha 2$  en comportamientos específicos de etanol.

El comportamiento del ratón KI  $\alpha 2$  a grandes rasgos era normal, y se comportaba de manera similar al WT (figuras 19, 20, 21 y 22). Esto es relevante porque variados estudios han relacionado mutaciones en el gen GLRA2 con trastornos del espectro autista (Piton, Gauthier et al. 2011, Pilorge, Fassier et al. 2016, Zhang, Ho et al. 2017). La mutación en el KI  $\alpha 2$  pareciera tampoco afectar la expresión del R-Gli, ya que la densidad de corriente a glicina no disminuyó con respecto al WT. Concordante con la reducción de la sensibilidad a etanol en los receptores KI en el nAc, el ratón KI  $\alpha 2$  mostró menos ataxia y sedación inducida por etanol. Por lo tanto, los ratones se recuperan más rápido de los efectos de etanol en las pruebas de

rotarod fijo y en LORR, sin observar cambios en el BEC comparado con ratones WT (figuras 23 y 24). Si bien estos resultados eran esperables en el animal KI  $\alpha 1$ , por la alta presencia del R-Gli en medula espinal y tronco encefálico. Los resultados de esta tesis abren la posibilidad de la expresión del R-Gli  $\alpha 2$  en otras regiones cerebrales que controlan estados de vigilia y conciencia, lo que podría explicar la rápida recuperación de los efectos sedativos de etanol en el ratón KI  $\alpha 2$ .

Dentro de las regiones que controlan los estados de vigilia se encuentran los centros de alerta de la protuberancia como el núcleo tegmental pedúnculo-pontino o el núcleo tegmental laterodorsal; el locus cerúleo, el núcleo dorsal del rafe; los núcleos de alerta del mesencéfalo como la formación reticular mesencefálica, VTA y sustancia gris periacueductal, entre otros (Franks 2008). Estas regiones fueron mencionadas anteriormente en la discusión ya que muchas de estas enviaban proyecciones glicinérgicas hacia el prosencéfalo basal (Bardóczi, Pál et al. 2017) y específicamente al nAc como se mostró en la figura 9. Por lo tanto, estas regiones encargadas de regular estados de vigilia, además de proveer inervación glicinérgica al prosencefalo, podrían expresar R-Gli que estarían regulando su propia activación. Y serían estos receptores los cuales no se potencian en el ratón KI  $\alpha 2$ , y es por esto que observamos que estos ratones se recuperan más rápido de los efectos de etanol. Por su puesto que se necesitarían mayores antecedentes y otros estudios al respecto, sin embargo, podría ser una explicación a los interesantes resultados obtenidos en esta tesis.

### El consumo compulsivo (*binge drinking*) del KI $\alpha 2$ en la prueba DID.

El instituto nacional de abuso a alcohol y alcoholismo (NIAAA) define el consumo compulsivo de etanol, el llamado *binge drinking*, como un patrón de consumo donde se alcanzan valores de BEC mayores a 80 mg/dl en menos de 2 horas (NIAAA 2004), lo que equivale a unas 3-4 bebidas alcohólicas para un hombre y 2-3 para una mujer (Pizon, Becker et al. 2007). Interesantemente, este patrón de consumo es común en adolescentes y adultos jóvenes, el cual presenta importantes consecuencias médicas. Por ejemplo, estudios han investigado que este tipo de consumo afecta futuros comportamientos de consumo, además de alteración en aprendizaje espacial y en memoria (Wagner, Zhou et al. 2014, Younis, Wolstenholme et al. 2019). Nuestros resultados mostraron que el ratón KI  $\alpha 2$  exhibió un patrón de consumo de etanol de tipo *binge*. Los ratones comienzan la prueba DID consumiendo grandes cantidades de etanol, 3.2 g/kg de etanol aproximadamente, resultando en BEC mayores de 110 mg/dl. Consumo que se mantenía en los 2 siguientes días de prueba, hasta el cuarto día donde el acceso a etanol es por 4 horas, lo que resulta en BEC aún mayores. Muy diferente al patrón de consumo observado en los ratones WT, los cuales comienzan bebiendo poco, alcanzando BEC de aproximadamente 70 mg/dl, y luego incrementan el consumo hasta que en el último día de prueba DID, alcanzan valores de alrededor de 150 mg/dl versus los 200 mg/dl del KI  $\alpha 2$  (figura 26). Y este aumento en el consumo de etanol de los ratones KI  $\alpha 2$  era solo observado para etanol, porque los ratones consumían valores de agua similares a los ratones WT.

Como se había mencionado anteriormente, el uso de animales KO puede presentar variadas compensaciones. Aun así, en nuestro laboratorio utilizando un modelo de ratón KO para  $\alpha 2$  encontramos que estos ratones consumían más etanol que los WT en la prueba DID (San Martin et al. en revisión), lo que está en acuerdo con los datos encontrados con el KI  $\alpha 2$ . Por lo tanto, esto refuerza la importancia de la subunidad  $\alpha 2$ , ya que con 2 modelos distintos de estudios se hayan obtenido resultados similares.

Es por esto que, los resultados del KI  $\alpha 2$ , junto con los del KI  $\alpha 1$  (Muñoz, Gallegos et al. 2019), sugieren que el R-Gli tanto la subunidad  $\alpha 1$  como  $\alpha 2$  tienen un rol en la regulación del consumo de etanol. Y como lo proponía la hipótesis de esta tesis, con la mutación el R-Gli no se potencia con etanol, la inhibición del nAc no es suficiente para contrarrestar la excitación dada por el VTA y corteza, y los ratones consumen grandes cantidades de etanol (modelo en figura 30).

Esta hipótesis también está en acuerdo con los resultados publicados por el grupo de Söderpalm y colaboradores, ya que ellos cuando aplicaban STN en el nAc por microdiálisis observaban un aumento en el consumo de etanol (Molander, Löf et al. 2005), y cuando aplicaban un inhibidor del transportador de glicina glial GlyT1 (Org 25935), lo que aumentaba la glicina disponible en el nAc, el consumo de etanol se reducía (Molander, Lidö et al. 2007).

Es importante destacar que estos resultados de alto consumo de etanol en los ratones KI, se aplica principalmente a ratones machos. Interesantemente, el impacto de la mutación  $\alpha 2$  KR389-390AA en las hembras no generó una diferencia significativa frente al consumo de etanol de las hembras WT (figura 27), y esto se

debió a que las hembras WT de por sí consumen grandes cantidades de etanol. Teniendo en cuenta además que las hembras se recuperaron antes que los machos de los efectos atáxicos de etanol (figura 25). Tal como ha sido reportado anteriormente en literatura, las hembras consumen más etanol que los machos (Middaugh, Kelley et al. 1999) y presentan este comportamiento de *binge drinking* el cual estaría mediado por las hormonas sexuales (Satta, Hilderbrand et al. 2018). Aun así, el consumo de las hembras KI  $\alpha 2$  fue mayor al de los machos KI  $\alpha 2$ , como era esperado.

Las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del R-Gli son importantes para comportamientos inducidos por etanol.

Esta tesis nos permitió entender el rol de los R-Gli en el SNC. La potenciación del receptor  $\alpha 1\beta$  y  $\alpha 2\beta$  por etanol produce sedación, por eso, las mutaciones que reducen la sensibilidad a etanol, provoca una reducción de la duración de LORR y acortamiento del tiempo de incoordinación inducida por etanol. Adicionalmente, la presencia de R-Gli en el nAc parece ser importante para el consumo de etanol. Como se ha mencionado anteriormente, el KI  $\alpha 1$  y KI  $\alpha 2$  presentan una alta ingesta de etanol (tabla 3). Si bien, se reportó que los ratones KI  $\alpha 1$  tenían un alto consumo en la prueba DID esto no se vio reflejado en los valores de BEC (a pesar de reportar valores mayores a los encontrados en ratones WT). Los KI  $\alpha 2$  que consumieron aproximadamente 3.2 g/kg de etanol en DID, mostraron valores altos de BEC, los que asocian con un consumo compulsivo. Comparando nuevamente con los resultados del KI  $\alpha 1$ , se mostró que ellos tenían un CPP aumentado, porque los

ratones WT no se condicionaron con 8 sesiones. El KI  $\alpha 2$  también logró condicionarse al lugar asociado a etanol, solo que esta vez los ratones WT también lo hicieron, mostrando una aparente similitud entre ambos genotipos, sin embargo, los datos de KI  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  muestran valores muy cercanos (tiempo en el lado Cs+ del KI  $\alpha 1$   $35 \pm 2$  segundos por minuto y  $34 \pm 2$  en el KI  $\alpha 2$ ). Ahora por qué los WT del CPP del KI  $\alpha 1$  no se condicionaron y los del CPP del KI  $\alpha 2$  si, estudios reportan que la cepa de ratón C57BL/6 en ocasiones presenta CPP positivo y en otras no (Cunningham and Shields 2018), en este caso podría ser debido a diferencias técnicas, a pesar de que se ambos experimentos se realizaron en la misma sala de comportamiento, con ratones WT de la misma generación. De todas maneras, el resultado esperado era que tanto el KI  $\alpha 1$  como el KI  $\alpha 2$  se condicionaran y eso ocurrió (tabla 3). Con respecto a los KI  $\alpha 2$  y los WT de esta tesis, ambos ratones obtienen efectos recompensantes de etanol, y prefieren el lado asociado a etanol en CPP, pero como los efectos intoxicantes de etanol se pierden más rápido en el KI  $\alpha 2$  (por lo analizado con rotarod fijo y LORR), se observa que no hay diferencia en el CPP con respecto al WT, incluso observando que el WT se condiciona aún más (figura 28).

Las tablas 2 y 3 comparan los resultados obtenidos con los ratones KI  $\alpha 1$  y KI  $\alpha 2$  en electrofisiología del nAc y en estudios de comportamiento, respectivamente. Como se observa, existen diferencias entre ambas mutaciones, pero existe una complementariedad parcial entre ambos, específicamente en el análisis del comportamiento frente a etanol de estos ratones. Sin duda las mutaciones generan cambios en el comportamiento de los ratones. Por lo tanto, como proyecciones de

este trabajo también está la generación de una cepa con la doble mutación (doble KI). Y como proponemos en esta tesis sobre la heterogeneidad de R-Gli en el nAc, con expresión de  $\alpha 1$  y de  $\alpha 2$ , puede que se genere un genotipo que presente un consumo aun mayor de etanol.

Finalmente podemos concluir que esta tesis destaca a la subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli en el cerebro adulto, y su participación en regular la inhibición del nAc, en comportamiento frente a los efectos de etanol y en consumo de etanol.

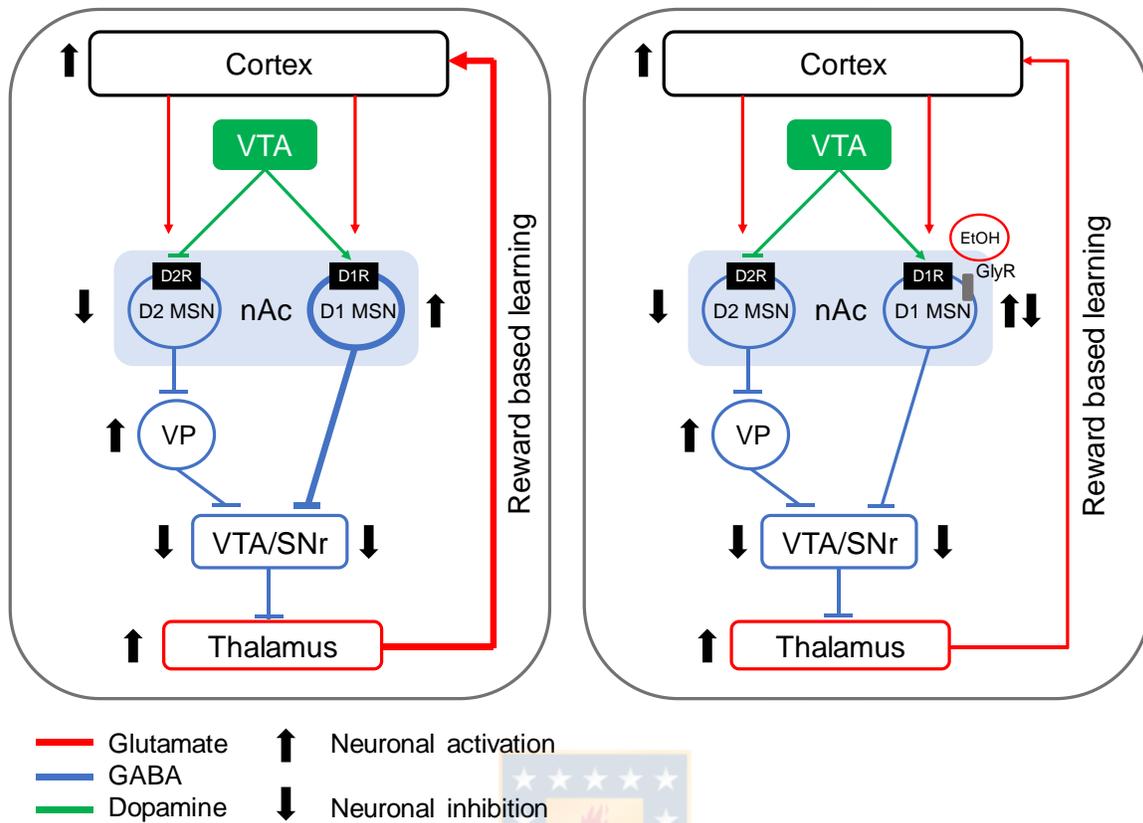


	KI $\alpha$ 1	KI $\alpha$ 2
<b>Fixed-speed Rotarod recovery post injection (min)</b>	*	75
<b>Duration of LORR (min)</b>	23 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2
<b>DID on day 1 (g/kg)</b>	5 $\pm$ 0.5	3.2 $\pm$ 0.2
<b>BEC day 1 of DID (mg/dl)</b>	60	110
<b>CPP 8 sessions (s/min)</b>	35 $\pm$ 2	34 $\pm$ 2

**Tabla 3. Comparación de resultados de comportamiento entre ratones KI  $\alpha$ 1 y KI  $\alpha$ 2**

Datos del ratón KI  $\alpha$ 1 fueron obtenidos de las publicaciones de Aguayo et al. 2014 y Muñoz et al. 2019.

\* la prueba de rotarod fijo se realizó con un protocolo distinto al usado en esta tesis, solo se evaluó hasta los 60 minutos post inyección, tanto los WT como KI  $\alpha$ 1 no lograron llegar a la recuperación completa en ese tiempo.



**Figura 30. Modelo propuesto del trabajo**

El circuito simplificado del sistema de recompensa muestra como el nAc es una región que recibe inervación de la corteza y del VTA cuando hay consumo de etanol. En el modelo de la izquierda se observa que en ausencia del R-Gli (GlyR) que contrarreste la activación del nAc, la vía directa se ve sobre-activada y existe un mayor incentivo a la búsqueda de la droga y se genera el aprendizaje basado en la recompensa. En el modelo de la derecha se observa lo que postulamos en la hipótesis de esta tesis. El R-Gli presente en el nAc, el cual es potenciado por etanol, ejerce un efecto inhibitorio que ayuda a mantener un balance excitatorio/inhibitorio en el nAc, lo que previene la sobre-activación de la vía directa. Cuando este receptor está mutado, en el caso de los ratones KI  $\alpha 1$  y KI  $\alpha 2$ , se pierde parte de esa inhibición y se genera un fenómeno como el del modelo de la izquierda, y es por eso que se observa que los ratones consumen más etanol que los ratones WT.

## Conclusión

Las D1 MSN forman parte de la vía directa del nAc la cual juega un rol importante en recompensa y en neuroplasticidad asociada a adicciones (Nakanishi, Hikida et al. 2014). La presencia de R-Gli con una alta sensibilidad a etanol en estas neuronas serviría como un regulador de la excitabilidad en presencia de esta droga, porque la potenciación aumenta el efecto inhibitorio de los receptores.

Las principales conclusiones que pudimos obtener con la realización de esta tesis:

- Regiones caudales del mesencéfalo serían las principales regiones cerebrales que liberan glicina que activa a los R-Gli en el nAc.
- En las neuronas D1 MSN del nAc, los R-Gli son más sensibles a etanol que en las D2 MSN. Las corrientes tónicas activadas por R-Gli se potencian con concentraciones farmacológicas de etanol, lo que provoca una reducción en el número de potenciales de acción en estas neuronas.
- La subunidad  $\alpha 2$  del R-Gli, formando parte del receptor heteromérico  $\alpha 2\beta$ , estaría presente en el nAc y tendría un rol en la regulación de la excitabilidad de este núcleo.
- La subunidad  $\alpha 2$  también tendría una función en la regulación del comportamiento de ratones frente a la administración de etanol. Los ratones KI  $\alpha 2$  se recuperaban más rápido de los efectos atáxicos y sedativos de etanol.
- Junto con los cambios observados en el nAc, la subunidad  $\alpha 2$  también parece ser importante para la regulación del consumo y preferencia por etanol. Los ratones KI  $\alpha 2$  consumieron más etanol que los ratones WT y se condicionaban a preferir un lugar asociado a etanol.

## Agradecimientos

A los miembros de la comisión evaluadora, Dr. Gonzalo Yévenes, Dr. Francisco Nualart y al Dr. Ramón Sotomayor, les agradezco por la revisión del proyecto, los comentarios y críticas para complementar esta tesis.

Agradecer a CONICYT por la Beca de Doctorado nacional y por la Beca de Pasantía al extranjero. A la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción por el apoyo a asistencia a congresos internacionales; y a los proyectos de investigación DPI 20140008 y NIH R01AA025718 los que permitieron financiar esta tesis.

Agradecer al Dr. David Lovinger del NIH/NIAAA, EEUU por facilitar la cepa de ratón D1-GFP. Al Dr. Gregg Homanics de la Universidad de Pittsburgh, EEUU por la generación de la cepa de ratón KI  $\alpha 2$ . Y al Dr. Hanns Ulrich Zeilhofer de la Universidad de Zurich, Suiza por haber realizado una pasantía en su laboratorio lo que permitió la realización de los estudios de la inervación glicinérgica en el núcleo Accumbens.

En lo personal, tengo que agradecer a mi familia, siempre apoyándome en todas las decisiones de mi vida, donde muchas veces no sabían realmente qué hacía, pero que jamás cuestionaron. Les agradezco a todos por siempre recibirme de la mejor manera en la casa, por aguantarme y por dejarme ser, y hacer lo que me gusta. A mi amiga Ale, desde el día uno en Kine hasta la vida, y a Javiera, the best roommate.

Sin dudas debo agradecer al tutor, Dr. Luis Aguayo. No solo por los años del doctorado, sino que también desde el Magister de Fisiología, siempre fue muy inclusivo conmigo a sus grupos de trabajo y me incentivó a tomar este nuevo rumbo en mi carrera profesional, gracias a su apoyo ingresé y terminé el doctorado.

Una dedicación muy especial es para el Laboratorio de Fisiología, y a todos sus integrantes, no podría haber elegido un mejor lugar de trabajo. Incluso cuando recién llegué al laboratorio, y nunca en mi vida había usado una pipeta o sabía lo que era un equipo de patch. Siempre hubo un grato ambiente de trabajo y me sentí muy bienvenida. Conocí gente increíble, que definitivamente influenciaron la decisión de dedicarme a la investigación y entrar al doctorado. Dani Gonzalez, sestra, gracias por enseñarme y por compartir todas esas series, películas y grandes viajes. Dani Nova gracias por todo el futbol. Gracias a María Paz, Tania, Carlos Felipe, Ixia, Carola y Gustavo, por los partidos de futbol que me alegran la semana. Christian Peters por enseñarme a hacer patch, por ser una gran persona y obviamente por la Fuente Alemana. Gracias a Laurie, el laboratorio no funcionaría sin Ud.

Y por su puesto a todo el Team Ethanol. Partiendo por el gran Braulio Muñoz, gracias por enseñarme prácticamente todo lo que se hacer en el laboratorio. Eres un excelente profesional y una excelente persona. Gracias por heredarme tu puesto, el patch 0, los animales, todo. Gracias a Rodrigo, que por mucho tiempo fuimos los únicos miembros del team. A Loreto, gracias por traer la sabiduría y el orden al team. A Aníbal por siempre querer aportar y por Buffy. A Caro gracias por los

ratoncitos, por apoyar con los experimentos y por todas las salidas al cine (team Marvel). A Jocelyn por tener siempre buena disposición y querer ayudar en todo. Gracias a los integrantes de la salita, los que hacen que el trabajo sea más agradable. Siempre buenas conversaciones, las papitas y las risas. Claramente destaco a Cesar, Vicky, Ana, Jessica y Panchi. Gracias por siempre querer pasar tiempo juntos, a pesar de estar todo el día en el lab, aun así, queremos salir los fines de semana y armar paseos. Me quedo con grandes recuerdos de nuestros viajes, pero también por el apoyo dentro del laboratorio y en la vida.



## Referencias

Abraham, K. P., A. G. Salinas and D. M. Lovinger (2017). "Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits." Neuron **96**(6): 1223-1238.

Aguayo, L. G., P. Castro, T. Mariqueo, B. Muñoz, W. Xiong, L. Zhang, D. M. Lovinger and G. E. Homanics (2014). "Altered sedative effects of ethanol in mice with  $\alpha 1$  glycine receptor subunits that are insensitive to  $G\beta\gamma$  modulation." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **39**(11): 2538-2548.

Aguayo, L. G., J. C. Tapia and F. C. Pancetti (1996). "Potentiation of the glycine-activated  $Cl^-$  current by ethanol in cultured mouse spinal neurons." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **279**(3): 1116-1122.

Aguayo, L. G., B. van Zundert, J. C. Tapia, M. A. Carrasco and F. J. Alvarez (2004). "Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development." Brain research. Brain research reviews **47**(1-3): 33-45.

Avila, A., P. M. Vidal, N. T. Dear, R. J. Harvey, J.-M. Rigo and L. Nguyen (2013). "Glycine Receptor  $\alpha 2$  Subunit Activation Promotes Cortical Interneuron Migration." Cell Reports **4**(4): 738-750.

Badanich, K. A., P. J. Mulholland, J. T. Beckley, H. Trantham-Davidson and J. J. Woodward (2013). "Ethanol Reduces Neuronal Excitability of Lateral Orbitofrontal Cortex Neurons Via a Glycine Receptor Dependent Mechanism." Neuropsychopharmacology **38**(7).

Bahi, A. and J.-L. Dreyer (2012). "Involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in ethanol drinking, ethanol-induced conditioned place preference, and

ethanol-induced psychomotor sensitization in mice." Psychopharmacology **222**(1): 141-153.

Bardóczi, Z., B. Pál, Á. Kőszeghy, T. Wilhelm, M. Watanabe, L. Záborszky, Z. Liposits and I. Kalló (2017). "Glycinergic Input to the Mouse Basal Forebrain Cholinergic Neurons." Journal of Neuroscience **37**(39): 9534-9549.

Betz, H. and B. Laube (2006). "Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity." Journal of neurochemistry **97**(6): 1600-1610.

Blednov, Y. A., J. M. Benavidez, M. Black, C. R. Leiter, E. Osterndorff-Kahanek and A. R. Harris (2015). "Glycine Receptors Containing  $\alpha 2$  or  $\alpha 3$  Subunits Regulate Specific Ethanol-Mediated Behaviors." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **353**(1): 181-191.

Bock, R., H. J. Shin, A. R. Kaplan, A. Dobi, E. Markey, P. F. Kramer, C. M. Gremel, C. H. Christensen, M. F. Adrover and V. A. Alvarez (2013). "Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use." Nature neuroscience **16**(5): 632-638.

Borghese, C. M., Y. A. Blednov, Y. Quan, S. V. Iyer, W. Xiong, S. J. Mihic, L. Zhang, D. M. Lovinger, J. R. Trudell, G. E. Homanics and R. A. Harris (2012). "Characterization of two mutations, M287L and Q266I, in the  $\alpha 1$  glycine receptor subunit that modify sensitivity to alcohols." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **340**(2): 304-316.

Brunton, L. L., B. A. Chabner and B. C. Knollmann (2011). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Edition

Burgos, C. F., B. Muñoz, L. Guzman and L. G. Aguayo (2015). "Ethanol effects on glycinergic transmission: From molecular pharmacology to behavior responses." Pharmacological Research **101**: 18-29.

Burgos, C. F., G. E. Yévenes and L. G. Aguayo (2016). "Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors." Molecular Pharmacology **90**(3): 318-325.

Collaborators, G. A. (2018). "Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." Lancet **392**(10152): 1015-1035.

Cui, P., X.-Y. Li, Y. Zhao, Q. Li, F. Gao, L.-Z. Li, N. Yin, X.-H. Sun and Z. Wang (2017). "Activation of dopamine D1 receptors enhances the temporal summation and excitability of rat retinal ganglion cells." Neuroscience **355**: 71-83.

Cunningham, C. L., C. M. Gremel and P. A. Groblewski (2006). "Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice." Nature Protocols **1**(4).

Cunningham, C. L. and C. N. Shields (2018). "Effects of multi-modal cues on conditioned place preference in C57BL/6J and DBA/2J mice." Psychopharmacology **235**(12): 3535-3543.

Cheng, Y., C. Huang, T. Ma, X. Wei, X. Wang, J. Lu and J. Wang (2017). "Distinct Synaptic Strengthening of the Striatal Direct and Indirect Pathways Drives Alcohol Consumption." Biological Psychiatry **81**(11): 918-929.

Delaney, A. J., A. Esmaili, P. L. Sedlak, J. W. Lynch and P. Sah (2010). "Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala." Neuroscience Letters **469**(2): 237-242.

Di Chiara, G. and A. Imperato (1988). "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(14): 5274-5278.

Dobi, A., G. K. Seabold, C. H. Christensen, R. Bock and V. A. Alvarez (2011). "Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **31**(5): 1895-1904.

Du, J., W. Lü, S. Wu, Y. Cheng and E. Gouaux (2015). "Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy." Nature **526**(7572): 224.

Dutertre, S., M. C. Becker and H. Betz (2012). "Inhibitory Glycine Receptors: An Update." Journal of Biological Chemistry **287**(48): 40216-40223.

Edelman, J. E. and D. A. Fiellin (2016). "Alcohol Use." Annals of Internal Medicine **164**(1).

Eggers, E. D. and A. J. Berger (2004). "Mechanisms for the modulation of native glycine receptor channels by ethanol." Journal of neurophysiology **91**(6): 2685-2695.

Eulenburg, V., W. Arnsen, H. Betz and J. Gomeza (2005). "Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission." Trends in Biochemical Sciences **30**(6): 325-333.

Farokhnia, M., B. D. Browning and L. Leggio (2019). "Prospects for pharmacotherapies to treat alcohol use disorder: an update on recent human studies." Current opinion in psychiatry **32**(4): 255-265.

Findlay, G. S., R. Phelan, M. T. Roberts, G. E. Homanics, S. E. Bergeson, G. F. Lopreato, J. S. Mihic, Y. A. Blednov and A. R. Harris (2003). "Glycine Receptor

Knock-In Mice and Hyperekplexia-Like Phenotypes: Comparisons with the Null Mutant." Journal of Neuroscience **23**(22): 8051-8059.

Förster, B., B. Muñoz, M. K. Lobo, R. Chandra, D. M. Lovinger and L. G. Aguayo (2017). "Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens." The Journal of Physiology **595**(15): 5285-5300.

Foster, E., H. Wildner, L. Tudeau, S. Haueter, W. T. Ralvenius, M. Jegen, H. Johannssen, L. Hösli, K. Haenraets, A. Ghanem, K.-K. Conzelmann, M. Bösl and H. Zeilhofer (2015). "Targeted Ablation, Silencing, and Activation Establish Glycinergic Dorsal Horn Neurons as Key Components of a Spinal Gate for Pain and Itch." Neuron **85**(6): 1289-1304.

Franklin, K. B. and G. Paxinos (2008). The mouse brain in stereotaxic coordinates.

Franks, N. P. (2008). "General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal." Nature Reviews Neuroscience **9**(5): 370-386.

Fu, Y., Y. Yuan, G. Halliday, Z. Rusznák, C. Watson and G. Paxinos (2012). "A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse." Brain Structure and Function **217**(2): 591-612.

Harvey, R. J. and B. K. Yee (2013). "Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain." Nature reviews. Drug discovery **12**(11): 866-885.

Hikida, T., S. Yawata, T. Yamaguchi, T. Danjo, T. Sasaoka, Y. Wang and S. Nakanishi (2013). "Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(1): 342-347.

Huang, X., H. Chen, K. Michelsen, S. Schneider and P. L. Shaffer (2015). "Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$  bound to antagonist strychnine." Nature **526**(7572): 277.

Hyman, S. E., R. C. Malenka and E. J. Nestler (2006). "Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory." Annual review of neuroscience **29**: 565-598.

Jeanes, Z. M., T. R. Buske and R. A. Morrisett (2011). "In Vivo Chronic Intermittent Ethanol Exposure Reverses the Polarity of Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens Shell." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **336**(1): 155-164.

Jonsson, S., J. Morud, C. Pickering, L. Adermark, M. Ericson and B. Söderpalm (2012). "Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development." Brain research **1446**: 12-21.

Jun, S., V. Carlson, S. Ikeda and D. Lovinger (2011). "Vibrodissociation of Neurons from Rodent Brain Slices to Study Synaptic Transmission and Image Presynaptic Terminals." Journal of Visualized Experiments : JoVE(51): 2752.

Koob, G. F. and N. D. Volkow (2016). "Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis." The lancet. Psychiatry **3**(8): 760-773.

Lavin, A. and A. A. Grace (2001). "Stimulation of D1-type dopamine receptors enhances excitability in prefrontal cortical pyramidal neurons in a state-dependent manner." Neuroscience **104**(2): 335-346.

Lee, K.-W., Y. Kim, A. M. Kim, K. Helmin, A. C. Nairn and P. Greengard (2006). "Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-

containing medium spiny neurons in nucleus accumbens." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(9): 3399-3404.

Legendre, P. (2001). "The glycinergic inhibitory synapse." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **58**(5): 760-793.

Lidö, H., M. Ericson, H. Marston and B. Söderpalm (2011). "A Role for Accumbal Glycine Receptors in Modulation of Dopamine Release by the Glycine Transporter-1 Inhibitor Org25935." Frontiers in Psychiatry **2**: 8.

Lobo, M. and E. J. Nestler (2011). "The Striatal Balancing Act in Drug Addiction: Distinct Roles of Direct and Indirect Pathway Medium Spiny Neurons." Frontiers in Neuroanatomy **5**: 41.

Lynch, J. W. (2009). "Native glycine receptor subtypes and their physiological roles." Neuropharmacology **56**(1): 303-309.

Maguire, E. P., T. Macpherson, J. D. Swinny, C. I. Dixon, M. B. Herd, D. Belevi, D. N. Stephens, S. L. King and J. J. Lambert (2014). "Tonic Inhibition of Accumbal Spiny Neurons by Extrasynaptic  $\alpha 4\beta\delta$  GABAA Receptors Modulates the Actions of Psychostimulants." The Journal of Neuroscience **34**(3): 823-838.

Maguire, E. P., E. A. Mitchell, S. J. Greig, N. Corteen, D. J. Balfour, J. D. Swinny, J. J. Lambert and D. Belevi (2014). "Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: a sensitive target for ethanol." Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **39**(5): 1232-1244.

Maleeva, G., F. Peiretti, B. S. Zhorov and P. Bregestovski (2017). "Voltage-Dependent Inhibition of Glycine Receptor Channels by Niflumic Acid." Frontiers in Molecular Neuroscience **10**: 125.

Malosio, M. L., B. Marquèze-Pouey, J. Kuhse and H. Betz (1991). "Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain." The EMBO journal **10**(9): 2401-2409.

McCracken, L. M., D. C. Lowes, M. C. Salling, C. Carreau-Vollmer, N. N. Odean, Y. A. Blednov, H. Betz, A. R. Harris and N. L. Harrison (2017). "Glycine receptor  $\alpha 3$  and  $\alpha 2$  subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(34).

Middaugh, L. D., B. M. Kelley, A.-L. E. Bandy and K. K. McGroarty (1999). "Ethanol Consumption by C57BL/6 Mice Influence of Gender and Procedural Variables." Alcohol **17**(3): 175-183.

Mihic, S. J., Q. Ye, M. J. Wick, V. V. Koltchine, M. D. Krasowski, S. E. Finn, M. P. Mascia, C. F. Valenzuela, K. K. Hanson, E. P. Greenblatt, R. A. Harris and N. L. Harrison (1997). "Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors." Nature **389**(6649): 385-389.

Molander, A., H. H. Lidö, E. Löf, M. Ericson and B. Söderpalm (2007). "The glycine reuptake inhibitor Org 25935 decreases ethanol intake and preference in male wistar rats." Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire) **42**(1): 11-18.

Molander, A., E. Löf, R. Stomberg, M. Ericson and B. Söderpalm (2005). "Involvement of Accumbal Glycine Receptors in the Regulation of Voluntary Ethanol Intake in the Rat." Alcoholism: Clinical and Experimental Research **29**(1): 38-45.

Molander, A. and B. Söderpalm (2005). "Glycine Receptors Regulate Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens." Alcoholism: Clinical and Experimental Research **29**(1): 17-26.

Molchanova, S. M., J. Comhair, D. Karadurmus, E. Piccart, R. J. Harvey, J.-M. Rigo, S. N. Schiffmann, B. Brône and D. Gall (2018). "Tonically Active  $\alpha 2$  Subunit-Containing Glycine Receptors Regulate the Excitability of Striatal Medium Spiny Neurons." Frontiers in Molecular Neuroscience **10**: 442.

Morelli, G., A. Avila, S. Ravanidis, N. Aourz, R. L. Neve, I. Smolders, R. J. Harvey, J.-M. M. Rigo, L. Nguyen and B. Brône (2017). "Cerebral Cortical Circuitry Formation Requires Functional Glycine Receptors." Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991) **27(3)**: 1863-1877.

Muñoz, B., S. Gallegos, C. Peters, P. Murath, D. M. Lovinger, G. E. Homanics and L. G. Aguayo (2019). "Influence of nonsynaptic  $\alpha 1$  glycine receptors on ethanol consumption and place preference." Addiction biology.

Muñoz, B., G. E. Yevenes, B. Förster, D. M. Lovinger and L. G. Aguayo (2018). "Presence of Inhibitory Glycinergic Transmission in Medium Spiny Neurons in the Nucleus Accumbens." Frontiers in molecular neuroscience **11**: 228.

Nakanishi, S., T. Hikida and S. Yawata (2014). "Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors." Neuroscience **282**.

Nakanishi, S., T. Hikida and S. Yawata (2014). "Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors." Neuroscience **282**: 49-59.

Nestler, E. J. (2001). "Molecular Neurobiology of Addiction." The American Journal on Addictions **10(3)**: 201-217.

Nestler, E. J. (2013). "Cellular basis of memory for addiction." Dialogues in clinical neuroscience **15(4)**: 431-443.

NIAAA (2004). "NIAAA council approves definition of binge drinking." NIAAA newsletter **3**(3).

Organization, W. H. (2018). Global status report on alcohol and health 2018: executive summary. World Health Organization.

Pilorge, M., C. Fassier, H. Le Corronc, A. Potey, J. Bai, S. De Gois, E. Delaby, B. Assouline, V. Guinchat, F. Devillard, R. Delorme, G. Nygren, M. Rastam, J. C. Meier, S. Otani, H. Cheval, V. M. James, M. Topf, T. N. Dear, C. Gillberg, M. Leboyer, B. Giros, S. Gautron, J. Hazan, R. J. Harvey, P. Legendre and C. Betancur (2016). "Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism." Mol Psychiatry **21**(7): 936-945.

Piton, A., J. Gauthier, F. F. Hamdan, R. G. Lafrenière, Y. Yang, E. Henrion, S. Laurent, A. Noreau, P. Thibodeau, L. Karemera, D. Spiegelman, F. Kuku, J. Duguay, L. Destroismaisons, P. Jolivet, M. Côté, K. Lachapelle, O. Diallo, A. Raymond, C. Marineau, N. Champagne, L. Xiong, C. Gaspar, J. B. B. Rivière, J. Tarabeux, P. Cossette, M. O. O. Krebs, J. L. Rapoport, A. Addington, L. E. Delisi, L. Mottron, R. Jooper, E. Fombonne, P. Drapeau and G. A. Rouleau (2011). "Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia." Molecular psychiatry **16**(8): 867-880.

Pizon, A. F., C. E. Becker and D. Bikin (2007). "The clinical significance of variations in ethanol toxicokinetics." Journal of Medical Toxicology **3**(2): 63-72.

Renteria, R., E. Y. Maier, T. R. Buske and R. A. Morrisett (2017). "Selective alterations of NMDAR function and plasticity in D1 and D2 medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell following chronic intermittent ethanol exposure." Neuropharmacology **112**: 164-171.

Roberts-Wolfe, D. and A. C. Bobadilla (2018). "Drug Refraining and Seeking Potentiate Synapses on Distinct Populations of Accumbens Medium Spiny Neurons." **38**(32): 7100-7107.

Russo, S. J. and E. J. Nestler (2013). "The brain reward circuitry in mood disorders." Nature reviews. Neuroscience **14**(9): 609-625.

Salling, M. C. and N. L. Harrison (2014). "Strychnine-sensitive glycine receptors on pyramidal neurons in layers II/III of the mouse prefrontal cortex are tonically activated." Journal of neurophysiology **112**(5): 1169-1178.

Sanchez-Chavez, G., M. A. Velazquez-Flores, R. Ruiz Esparza-Garrido and R. Salceda (2017). "Glycine receptor subunits expression in the developing rat retina." Neurochem Int **108**: 177-182.

Satta, R., E. R. Hilderbrand and A. W. Lasek (2018). "Ovarian Hormones Contribute to High Levels of Binge-Like Drinking by Female Mice." Alcoholism: Clinical and Experimental Research **42**(2): 286-294.

Science, A. I. f. B. (2010). Allen Human Brain Atlas.

Sebe, J. Y., E. D. Eggers and A. J. Berger (2003). "Differential effects of ethanol on GABA(A) and glycine receptor-mediated synaptic currents in brain stem motoneurons." Journal of neurophysiology **90**(2): 870-875.

Singer, J. H., E. M. Talley, D. A. Bayliss and A. J. Berger (1998). "Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons." Journal of neurophysiology **80**(5): 2608-2620.

Smith, R. J., M. Lobo, S. Spencer and P. W. Kalivas (2013). "Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not

necessarily synonymous with direct and indirect pathways)." Current Opinion in Neurobiology **23**(4).

Smith, R. J., M. Lobo, S. Spencer and P. W. Kalivas (2013). "Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways)." Current opinion in neurobiology **23**(4): 546-552.

Söderpalm, B., H. H. Lidö and M. Ericson (2017). "The Glycine Receptor-A Functionally Important Primary Brain Target of Ethanol." Alcoholism, clinical and experimental research **41**(11): 1816-1830.

Spanagel, R. (2009). "Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior." Physiological reviews **89**(2): 649-705.

Stevenson, R. A., J. Besheer and C. W. Hodge (2008). "Comparison of ethanol locomotor sensitization in adolescent and adult DBA/2J mice." Psychopharmacology **197**(3): 361-370.

Thiele, T. E., J. C. Crabbe and S. L. Boehm, 2nd (2014). "'Drinking in the Dark' (DID): a simple mouse model of binge-like alcohol intake." Curr Protoc Neurosci **68**: 9 49 41-12.

Volkow, N. D. and M. Morales (2015). "The Brain on Drugs: From Reward to Addiction." Cell **162**(4): 712-725.

Wagner, J. L., F. C. Zhou and C. R. Goodlett (2014). "Effects of one- and three-day binge alcohol exposure in neonatal C57BL/6 mice on spatial learning and memory in adolescence and adulthood." Alcohol (Fayetteville, N.Y.) **48**(2): 99-111.

Wang, J., Y. Cheng, X. Wang, E. Hellard, T. Ma, H. Gil, S. Hamida and D. Ron (2015). "Alcohol Elicits Functional and Structural Plasticity Selectively in Dopamine

D1 Receptor-Expressing Neurons of the Dorsomedial Striatum." The Journal of Neuroscience **35**(33): 11634-11643.

Watanabe, E. and H. Akagi (1995). "Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord." Neuroscience research **23**(4): 377-382.

Ye, J. H., L. Tao, J. Ren, R. Schaefer, K. Krnjevic, P. L. Liu, D. A. Schiller and J. J. McArdle (2001). "Ethanol potentiation of glycine-induced responses in dissociated neurons of rat ventral tegmental area." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **296**(1): 77-83.

Yevenes, G. E., G. Moraga-Cid, A. Avila, L. Guzmán, M. Figueroa, R. W. Peoples and L. G. Aguayo (2010). "Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gbetagamma modulation." The Journal of biological chemistry **285**(39): 30203-30213.

Yevenes, G. E., G. Moraga-Cid, L. Guzmán, S. Haeger, L. Oliveira, J. Olate, G. Schmalzing and L. G. Aguayo (2006). "Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors." The Journal of biological chemistry **281**(51): 39300-39307.

Yevenes, G. E., G. Moraga-Cid, R. W. Peoples, G. Schmalzing and L. G. Aguayo (2008). "A selective G betagamma-linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(51): 20523-20528.

Yevenes, G. E., R. W. Peoples, J. C. Tapia, J. Parodi, X. Soto, J. Olate and L. G. Aguayo (2003). "Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits." Nature neuroscience **6**(8): 819-824.

Yevenes, G. E. and H. Zeilhofer (2011). "Allosteric modulation of glycine receptors." British journal of pharmacology **164**(2): 224-236.

Younis, R. M., J. T. Wolstenholme, D. Bagdas, J. C. Bettinger, M. F. Miles and M. I. Damaj (2019). "Adolescent but not adult ethanol binge drinking modulates ethanol behavioral effects in mice later in life." Pharmacology, biochemistry, and behavior **184**: 172740.

Zeilhofer, H., B. Studler, D. Arabadzisz, C. Schweizer, S. Ahmadi, B. Layh, M. R. Bösl and J. M. Fritschy (2005). "Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice." Journal of Comparative Neurology **482**(2): 123-141.

Zhang, Y., T. N. T. N. T. Ho, R. J. Harvey, J. W. Lynch and A. Keramidas (2017). "Structure-Function Analysis of the GlyR  $\alpha$ 2 Subunit Autism Mutation p.R323L Reveals a Gain-of-Function." Frontiers in molecular neuroscience **10**: 158.

