



**Universidad De Concepción
Facultad De Medicina**

**EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE GLICINA EN NEURONAS DEL NÚCLEO
ACCUMBENS Y SU ROL EN EL CONSUMO Y PREFERENCIA DE ETANOL
EN EL ENVEJECIMIENTO**

Por: Alejandra Andrea Guzmán Castillo

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico de Doctor en Salud Mental

Profesor Guía: Dr. Luis Gerardo Aguayo Hernández

Concepción, Chile 2025

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

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

Dra. Patricia Rubí González
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

Dra. Estefanía Tarifeño Saldivia
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Eduardo Karahanian Vartevanian
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma

Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto NIH RO1 025718, Fondecyt 1221080

Beca de Doctorado Nacional ANID # 21201061

AGRADECIMIENTOS

Este apartado de mi tesis ha sido, sin duda, el más difícil de escribir. Quiero comenzar agradeciendo a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) por el financiamiento otorgado a través de la Beca de Doctorado Nacional, y al programa de Neurociencia, Psiquiatría y Salud Mental (NEPSAM-UdeC) por el apoyo brindado durante este proceso.

En lo solitario del proceso de redacción, no es tan fácil reconectar con esos momentos: planificando experimentos, preparando el cafecito antes de empezar a trabajar, o recolectando datos de comportamiento. Momentos en los que tuve la dicha de compartir con personas de las que aprendí muchísimo.

Lo primero será comenzar agradeciendo a quien me dio la oportunidad de conocer a todas estas personas: el Dr. Aguayo, quien me invitó a trabajar con él, me motivó y presionó lo suficiente para mantenerme "atenta" durante todo este proceso. Muchas gracias, profe.

Querida Lore A., agradezco enormemente que me hayas adoptado desde el primer día. Fue un honor ser tu *padawan*. Aprendí muchísimo de ti y atesoraré siempre esas largas conversaciones en la sala de cirugía y comportamiento. ¡*Que la fuerza esté contigo!*

Al *Team Ethanol* —Loreto, Aníbal y Scarlet— gracias por sus consejos, siempre valiosos para mí. Los admiro muchísimo a todos. Estoy segura de que, donde sea que vayan, serán excelentes investigadores. Querida Laurie, tu silencioso

trabajo resuena en cada uno de los experimentos que realizamos. Muchas gracias.

El apoyo veterinario en esta tesis ha sido fundamental. Por eso, Carolina Benítez, Caro, muchas gracias por tu trabajo y por tu amistad.

Es imposible no agradecer al equipo de apoyo técnico y administrativo del laboratorio: Ixia, Karina, Sra. Sandra, y mi querida Jocelyn. Gracias por tu paciencia, tu voluntad de oro, pero, sobre todo, por tu coraje inspirador.

La academia siempre ha sido mi norte. No siempre es fácil tener clara tu vocación. Agradezco a mi mamá por alentarme a seguir mi camino incluso cuando todo parece en contra, a luchar y soñar, a no tener prejuicios —aunque ella sí los tenga. Ahora ya estás más vieja, olvidadiza y jodida, mami, más te quiero.

También agradezco a quienes, con sus dudas, críticas o indiferencias, hicieron este camino un poco más difícil. Gracias por mostrarme otras caras de la vida académica y personal. Ustedes también me enseñaron a ser más fuerte y a conocer mejor a las personas.

Durante todo este camino del doctorado, hubo altos y bajos en los que compartí largas conversaciones, risas, karaokes, pañuelos... y mucho café. Gracias, Juan Luis, por tu compañía, tus consejos y por enseñarme a ser más paciente. No olvidaré lo aprendido a tu lado.

Mis queridas Lores: Lorenza y Pollo, gracias simplemente por estar, por escuchar, por compartir piña colada conmigo, y, lo más importante, por presentar

al niño. Igna, nuestro viejo chico, gracias por tu compañía, la comida, los reels y mantenernos actualizadas en el mundo de la juventud. Los quiero mucho a los tres.

Dedico las últimas palabras de agradecimiento a quien me ha acompañado durante esta última etapa. Querida Scarlet, me has mostrado el valor de lo más elemental y me has enseñado a ver las cosas de una forma más simple y que en medio del desastre se puede seguir. *What Have I Done to Deserve This?*

RESUMEN

El envejecimiento, proceso caracterizado por cambios graduales e irreversibles, afecta significativamente la estructura y función cerebral. Entre las áreas más impactadas está el Nucleus Accumbens (nAc), clave en la motivación y las conductas adictivas, cuyo deterioro se asocia a trastornos como depresión, demencias y abuso de sustancias. En este contexto, el consumo de alcohol en adultos mayores ha crecido como un problema, con patrones de riesgo en aumento pese a la disminución general del consumo con la edad. Los receptores de glicina (GlyRs), presentes en las neuronas del nAc, son esenciales en la inhibición sináptica y su actividad es potenciada por etanol, especialmente en las neuronas D1. Si bien se ha documentado la disminución de GlyRs con la edad en otras áreas, su afectación en el nAc aún carece de evidencia, aunque podría influir en los cambios neurobiológicos relacionados con el alcohol en la vejez.

El objetivo principal de este estudio fue determinar si los GlyRs en las neuronas D1 del nAc disminuyen durante el envejecimiento y cómo estos cambios se relacionan con el consumo y la preferencia de etanol. Para ello, se plantearon dos objetivos específicos: (I) evaluar la expresión de GlyRs en neuronas D1 del nAc en ratones jóvenes (2 meses), adultos jóvenes (6 meses), de mediana edad (12 meses) y envejecidos (18 meses); y (II) analizar los cambios en el consumo y la preferencia de etanol en los mismos grupos. Mediante la cuantificación de la dinámica de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la exposición a etanol (EtOH) y bicuculina, se observó una mayor reducción en las transientes de Ca^{2+} a los 2

meses en comparación con los grupos de 6 y 12 meses ($p < 0.0029$). La administración de bicuculina, sin embargo, no mostró diferencias significativas en el porcentaje de cambio de las transientes de Ca^{2+} en ninguna de las edades estudiadas ($p < 0.2020$). Los análisis de inmunohistoquímica y RT-qPCR revelaron una reducción significativa de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las neuronas D1 a los 6 y 12 meses ($p < 0.05$), y de la subunidad β desde los 6 hasta los 18 meses ($p < 0.0048$). Conductualmente, se registró una disminución sostenida en el consumo de etanol a los 18 meses, la cual no pudo revertirse mediante la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en el nAc. No obstante, los ensayos de condicionamiento por EtOH indicaron que los ratones dejaron de mostrar preferencia por esta sustancia a los 6 meses, un efecto que fue revertido con la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ en el nAc ($p < 0.05$).

Estos hallazgos resaltan el papel crucial de la subunidad $\alpha 1$ en la mediación de los efectos recompensantes del alcohol y ofrecen una comprensión más profunda de los cambios conductuales relacionados con el consumo de etanol durante el envejecimiento.

ABSTRACT

The process of ageing, which is characterised by gradual and irreversible changes, has a significant impact on the structure and function of the brain. The nucleus accumbens (nAc) is one of the most affected areas, playing a pivotal role in motivation and addictive behaviours. Its deterioration is associated with a range of disorders, including depression, dementia and substance abuse. In this context, alcohol consumption in older adults has emerged as a significant concern, with an increasing prevalence of risky drinking patterns despite a general decline in alcohol consumption with age. Glycine receptors (GlyRs), which are present on nAc neurons, are essential for synaptic inhibition. Ethanol enhances the activity of GlyRs, particularly on D1 neurons. Although the decline of GlyRs with age has been documented in other areas, evidence regarding their involvement in the nAc remains inconclusive. However, it is plausible that they may influence alcohol-related neurobiological changes in old age.

The principal objective of this study was to ascertain whether there is a reduction in GlyRs in nAc D1 neurons during the ageing process and to determine the extent to which these changes are associated with ethanol consumption and preference. In order to achieve these aims, two specific objectives were set out: The first objective was to assess the expression of GlyRs in nAc D1 neurons in young (2 months), adult (6 months), middle-aged (12 months) and aged (18 months) mice. The second objective was to analyse changes in ethanol consumption and preference in the same groups. The quantification of intracellular Ca^{2+} dynamics

in response to ethanol (EtOH) and bicuculline exposure revealed a greater reduction in Ca^{2+} transients at the 2-month age group compared to the 6- and 12-month age groups ($p < 0.0029$). However, administration of bicuculline did not result in a significant difference in the percentage change in Ca^{2+} transients at any of the ages studied ($p < 0.2020$). The results of the immunohistochemistry and RT-qPCR analyses indicated a notable decline in the $\alpha 1$ subunit of GlyR in D1 neurons at both the six- and 12-month time points ($p < 0.05$), as well as a reduction in the β -subunit from six to 18 months ($p < 0.0048$). A sustained decrease in ethanol consumption was observed at 18 months, which was not reversed by overexpression of the $\alpha 1$ subunit of GlyR in the nAc. However, ethanol conditioning assays indicated that mice exhibited a loss of preference for this substance at six months, an effect that was reversed by overexpression of the $\alpha 1$ subunit in the nAc ($p < 0.05$). These results highlight the crucial role of the $\alpha 1$ subunit in mediating the rewarding effects of alcohol and provide further insight into the behavioural changes associated with ethanol consumption during ageing.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE GENERAL	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABLAS	xix
INTRODUCCIÓN	1
<i>Envejecimiento y consumo de alcohol</i>	2
<i>Núcleo Accumbens</i>	4
<i>Núcleo Accumbens y Envejecimiento</i>	8
<i>Receptores de Glicina (GlyRs)</i>	12
Efecto modulador de etanol sobre los GlyRs.....	15
Receptores de Glicina y Envejecimiento.....	17
HIPOTESIS	21

OBJETIVOS	22
<i>Objetivo General.....</i>	<i>22</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>22</i>
Objetivo específico 1. Determinar cambios en la expresión y funcionalidad de GlyRs en neuronas D1 del nAc de ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).	22
Objetivo específico 2. Determinar cambios en el consumo, preferencia de etanol y efectos motores en ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
<i>Animales de experimentación.....</i>	<i>25</i>
<i>Inyección estereotáxica</i>	<i>27</i>
<i>Obtención de rebanadas de cerebro de ratón</i>	<i>28</i>
<i>Análisis de dinámica de calcio intracelular</i>	<i>28</i>
<i>Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....</i>	<i>29</i>
<i>RT qPCR.....</i>	<i>30</i>
<i>Extracción de ARN.</i>	<i>30</i>

Síntesis de ADNc.....	31
qPCR.....	32
<i>Inmunohistoquímica (IHC)</i>	33
<i>Estudios de comportamiento</i>	34
Prueba de consumo de etanol (del inglés: Drinking in the dark, DID).....	34
Prueba de preferencia asociada a un lugar (del inglés: Conditioned Place Preference, CPP).....	35
Prueba de campo abierto (del inglés: Open field assay, OF).....	36
<i>Análisis de datos</i>	37
RESULTADOS	38
<i>Objetivo específico 1. Determinar cambios en la expresión de los GlyR en neuronas D1 del nAc de ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).</i>	38
Actividad 1.1. Caracterizar la funcionalidad del GlyR en MSN del nAc en los distintos grupos etarios de estudio a través del análisis de la dinámica del calcio intracelular en rebanadas perfundidas con etanol.....	39

Actividad 1.2. Caracterizar la expresión y funcionalidad del GlyR en MSN del nAc en los distintos grupos etarios de estudio a través del análisis de la dinámica del calcio intracelular en rebanadas tratadas con bicuculina.	41
Actividad 1.3. Determinar expresión proteica de las subunidades α del GlyR y gefirina en las MSN D1 del nAc mediante inmunohistoquímica en ratones BAC Drd1a-tdTomato.....	43
Actividad 1.4. Determinar niveles de ARNm de las subunidades α 1, α 2, α 3 y β del GlyR y de gefirina en MSN D1 del nAc mediante RT qPCR acoplada a FACS en ratones BAC Drd1a-tdTomato.	49
<i>Objetivo específico 2. Determinar cambios en el consumo y preferencia de etanol de ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).</i>	<i>54</i>
Actividad 2.1. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones de diferentes edades.	54
Actividad 2.2. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.	59

Actividad 2.3. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN D1+.	61
Actividad 2.3. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.	64
Actividad 2.4. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.	66
Actividad 2.5. Determinación de la preferencia por etanol con la prueba Conditioned place preference (CPP) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.	68
Actividad 2.6. Determinación de la preferencia por etanol con la prueba Conditioned place preference (CPP) en ratones adultos jóvenes (6 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.	70
Actividad 2.7. Evaluación de la actividad motora y comportamiento ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones adultos jóvenes (6 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.	72

DISCUSIÓN.....	74
Los receptores de Glicina se expresan durante todo el proceso de envejecimiento.....	74
El envejecimiento reduce la expresión de los receptores de Glicina en el núcleo accumbens.....	76
El envejecimiento reduce el consumo de etanol y la sobreexpresión de GlyR en el Núcleo Accumbens no produce cambios en su consumo.....	84
La sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyRs en el núcleo accumbens restaura el condicionamiento por etanol en ratones adultos jóvenes.....	88
CONCLUSIONES.....	91
GLOSARIO	93
REFERENCIAS.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales aferentes y eferentes de nAc.	5
Figura 2. Expresión de GlyRs en MSN D1 y D2 del nAc.....	13
Figura 3. Esquema de potenciación mediada por etanol en células HEK-293 transfectadas con distintas subunidades del receptor de glicina.	16
Figura 4. Los receptores de glicina afectan la preferencia por el etanol.	17
Figura 5. Análisis de corriente evocadas de glicina en nAc de ratones C57BL/6 a diferentes edades mediante la técnica de patch clamp.	19
Figura 6. Intervalos de edad representativos para las etapas del ciclo vital maduro en ratones C57BL/6J.....	25
Figura 7. Disminución del efecto inhibitorio del etanol en la dinámica del calcio en las MSN del nAc con envejecimiento.	40
Figura 8. Análisis del efecto de bicuculina en la dinámica del calcio en las MSN del nAc durante el envejecimiento.	42
Figura 9. Análisis inmunohistoquímico de subunidad α del GlyR en MSN D1+ y MSN D1- del nAc de ratones de diferentes edades.	46
Figura 10. Análisis inmunohistoquímico de gefirina en MSN D1+ y MSN D1- del nAc de ratones de diferentes edades.....	47
Figura 11. Proceso de obtención de MSNs Accumbales a partir de FACS.	50
Figura 12. Evaluación de la expresión génica de las subunidades α 1, α 2, α 3, β del GlyR y Gefirina en MSN D1+ y MSN D1- del nAc durante el envejecimiento.	52
Figura 13. Análisis de consumo de Etanol mediante prueba DID durante envejecimiento.....	56
Figura 14. Análisis de la concentración de etanol en sangre posterior a la inyección i.p. de 2g/kg a ratones de 3 y 18 meses.	58

Figura 15. Análisis del comportamiento exploratorio y de tipo ansioso durante el envejecimiento.....	60
Figura 16. Efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN D1+ del nAc en el consumo de etanol en ratones de 18 meses.....	63
Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en el consumo de etanol en ratones de 18 meses.	65
Figura 18. Análisis del comportamiento exploratorio y de tipo ansioso después de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en ratones de 18 meses de edad.....	67
Figura 19. Condicionamiento a etanol durante el envejecimiento mediante la prueba CPP.....	69
Figura 20. Efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en el condicionamiento a etanol en ratones de 6 meses.	71
Figura 21. Análisis del comportamiento exploratorio y de tipo ansioso después de sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en ratones de 6 meses de edad.....	73
Figura 22. Efecto del envejecimiento en la expresión de GlyRs en MSNs del nAc	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios reportados en el nAc durante el envejecimiento11

Tabla 2. Cebadores para experimento qRT-PCR.....32

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso fisiológico normal que surge como consecuencia directa de la vida misma y se caracteriza por la presencia de cambios graduales y a veces irreversibles que afectan la estructura y función de uno o varios órganos. Estos cambios provocan transformaciones a nivel biológico, psicológico, conductual y social, que en los humanos se hacen más aparentes a partir de los 60 años (Libertini, 2019; World Health Organization, 2015).

A nivel cerebral, el envejecimiento involucra cambios estructurales, neuroquímicos y funcionales que pueden causar alteraciones progresivas en el control e integración celular y de circuitos (Burke & Barnes, 2006; Ouda et al., 2015). Estas alteraciones pueden provocar cambios en la capacidad de memoria, percepción sensorial, coordinación motora, cognición, memoria de trabajo y funciones ejecutivas (Grau-Perales et al., 2019; Hahr, 2019; Noda et al., 2020)

Además, se sabe que el envejecimiento afecta la función normal de varias regiones del cerebro, como el hipocampo (HC) y la corteza prefrontal (CPF) las que han sido ampliamente estudiadas (Chang et al., 2005; Kelly et al., 2006; Morrison & Baxter, 2012; Rosenzweig et al., 2003). Sin embargo, otra región menos examinada, pero también afectada, es el Núcleo Accumbens (nAc), una región crítica del sistema de recompensa que también participa en la planificación y control motor, toma de decisiones, motivación y conductas adictivas (Collins et al., 2016; Schall et al., 2021; Soares-Cunha et al., 2016).

En consecuencia, los cambios neurobiológicos asociados al nAc pudiesen afectar y causar trastornos neuropsiquiátricos de importante prevalencia en adultos envejecidos, entre los que se destacan el trastorno depresivo mayor, demencias y abuso de sustancias, como el alcohol, los cuales constituyen los principales problemas de salud mental en esta población tanto en Chile, como a nivel mundial (Andreas et al., 2017; Servicio Nacional del Adulto Mayor. SENAMA, 2021).

Envejecimiento y consumo de alcohol

El consumo de alcohol es una práctica frecuente en los adultos mayores (definir edad) con una prevalencia que supera el 50% (Blazer and Wu, 2009; Breslow et al., 2017; Laberge et al., 2020). Aunque el promedio de consumo de alcohol disminuye con la edad (R. Molander et al., 2010) , estudios recientes han reportado que los adultos mayores han incrementado su consumo en los últimos años (Breslow et al., 2017; Keyes et al., 2019), incluyendo tanto a consumidores de riesgo, como a consumidores excesivos (Han et al., 2017; Immonen et al., 2011). Además del promedio de consumo, otros aspectos como la frecuencia y la cantidad consumida por ocasión también presentan diferencias significativas con la edad. En este sentido, se han observado aumentos dependientes de la edad en la frecuencia de consumo y disminuciones en la cantidad de alcohol consumida por evento (Lewis et al., 2018; R. Molander et al., 2010)

Con respecto a los efectos del alcohol, estos han sido bien descritos en humanos adultos y roedores, modelos fundamentales para estudios preclínicos. El alcohol

actúa como depresor del sistema nervioso central (SNC), con propiedades ansiolíticas, sedativas y disruptivas de la memoria (Eckardt et al., 1998). Es bien sabido que el alcohol produce alteraciones marcadas en los procesos de aprendizaje y memoria (White, 2003). Aunque las investigaciones sobre los efectos del alcohol en sujetos envejecidos son limitadas, en humanos se describen efectos neurobiológicos diferenciales incluso a dosis bajas de alcohol. Específicamente, en adultos mayores se observa un peor desempeño en pruebas de evaluación de memoria de trabajo, atención y cognición en comparación con individuos más jóvenes (Garcia et al., 2020; L. Han & Jia, 2021; Lewis et al., 2016; Price et al., 2018). En estudios con modelos animales, los principales efectos del alcohol investigados incluyen cognición, ataxia, hipotermia y sedación. En estos, se ha observado un aumento de la pérdida del control motor, de la hipotermia y de los efectos sedativos dependientes de la edad al comparar ratas adolescentes, adultas y envejecidas (Matthews, Watson, et al., 2019; Ornelas et al., 2015; Perkins et al., 2018; Silveri & Spear, 2000; Van Skike et al., 2010; Watson et al., 2020). En el caso de los efectos sobre la cognición, particularmente en pruebas de memoria espacial, no se han observado diferencias entre animales adolescentes y adultos luego de una dosis aguda de alcohol (Chin et al., 2011; Matthews et al., 2020). Sin embargo, el grupo de ratas envejecidas sí muestran un deterioro en tareas de memoria en general, tanto en las que evalúan memoria espacial como en otras (Matthews et al., 2020).

A pesar de lo anterior, es indudable que el envejecimiento está relacionado con cambios psicosociales que podrían influir en las características de consumo de alcohol (Han et al., 2019, 2017; Wang et al., 2022). Sin embargo, dado los cambios descritos en el cerebro envejecido y los efectos diferenciales del alcohol tanto en humanos como en modelos animales, es probable que exista una base neurobiológica en dichos cambios que ha sido poco explorada y que, dada la evidencia científica disponible, podría estar relacionada con cambios en el sistema de recompensa o sistema mesolímbico.

Núcleo Accumbens

El sistema mesolímbico (SML) presenta una complejidad estructural y funcional significativa, con una vía dopaminérgica que se origina en el área tegmental ventral (VTA) y se proyecta hacia la corteza prefrontal (PFC) y el nAc (Fig. 1). El nAc integra procesos asociados con respuestas de motivación y aversión, siendo esencial en la regulación del comportamiento y la cognición (Alcaro et al., 2007; Hu, 2016). Alteraciones en esta región han sido implicados en trastornos neuropsiquiátricos, como Enfermedad de Alzheimer (EA) (Mukhin et al., 2021; Nobili et al., 2017), depresión (Heshmati et al., 2020; Moriya et al., 2020; Russo and Nestler, 2013) y adicción (Russo & Nestler, 2013; L. Xu et al., 2020).

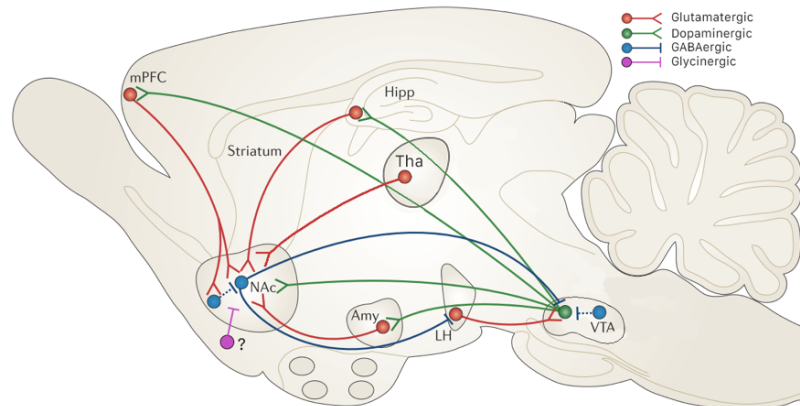


Figura 1. Principales aferentes y eferentes de nAc. Esquema simplificado de las vías glutamatérgicas, dopaminérgicas GABAérgicas y glicinérgicas presentes en el nAc en cerebro de roedor. (Extraído de Russo & Nestler, 2013).

El nAc corresponde a la región ventral del estriado y, además de la vía dopaminérgica proveniente del VTA, recibe aferencias excitatorias glutamatérgicas del HC, la amígdala basolateral y la PFC (Figura 1) (Floresco, 2015). También recibe una amplia inervación GABAérgica y glicinérgica, que contrarresta la excitación mediante la activación de receptores inhibitorios permeables al ion cloruro (Burgos et al., 2016). El balance de la transmisión inhibitoria/excitatoria es fundamental para determinar si se promueve la búsqueda de un estímulo recompensante mediante la desinhibición del tálamo y la corteza cerebral (Russo & Nestler, 2013; Volkow & Morales, 2015a). En el contexto del comportamiento adictivo, todas las drogas de abuso comparten el efecto final de aumentar la disponibilidad de dopamina (DA) desde terminales de neuronas del VTA hacia el nAc (Di Chiara & Imperato, 1988).

En cuanto a su composición, el nAc está constituido en un 90-95% por neuronas espinosas medianas (MSN) de tipo GABAérgicas, que se clasifican en dos grupos según la expresión del receptor de DA: D1, que expresan el receptor de DA tipo 1 (D1R), y D2, que expresan el receptor de DA tipo 2 (D2R) (Castro & Bruchas, 2019; Floresco, 2015). Los D1R son receptores de baja afinidad a la DA, que inducen un aumento de la excitabilidad neuronal y se relacionan con comportamientos asociados a la recompensa; mientras que los D2R poseen alta afinidad a la DA y se implican en comportamientos aversivos (L. Xu et al., 2020). En concreto, las MSNs accumbales reciben aferencias excitatorias desde la corteza, y ante un estímulo recompensante natural o una droga de abuso, las neuronas del VTA liberan DA en el nAc. Según el modelo clásico, las proyecciones de las MSNs D1 y D2 determinan dos vías hacia el VTA: directa e indirecta (Nakanishi et al., 2014). La activación de la vía directa implica que la DA se una al D1R en las MSNs D1, activando estas neuronas GABAérgicas, que proyectan directamente al mesencéfalo ventral, desinhibiendo el tálamo y facilitando conductas motivadas; mientras que las MSNs D2 proyectan al pálido ventral (VP) y luego al mesencéfalo de forma indirecta, inhibiendo el tálamo y suprimiendo la conducta de aproximación. En pocas palabras, la vía directa (D1) promovería respuestas de “avance” o búsqueda de recompensa, y la vía indirecta (D2) actuaría como un “freno” que inhibe acciones inadecuadas o no recompensadas (Kupchik & Kalivas, 2016; Panasiuk et al., 2019). A pesar de lo anterior, estos circuitos no están completamente segregados: estudios con

trazadores neuronales y optogenética demostraron que en el nAc algunas MSNs D1 proyectan vía VP (vía indirecta clásica) y algunas D2 proyectan de forma más directa al tálamo, lo que implicaría un funcionamiento más interdependiente (Kupchik & Kalivas, 2016). De acuerdo con lo anterior, la contribución de cada vía depende del contexto motivacional, lo que sugiere que MSNs D1 y D2 no actúan simplemente como “acelerador” y “freno” opuestos, sino que sus patrones de activación difieren según la fase de la conducta (impulso vs. terminación) y trabajan coordinadamente para ajustar el comportamiento al estado motivacional (Guillaumin et al., 2023; Y. Xu et al., 2024).

En el contexto del comportamiento adictivo, se ha reportado la vinculación de la hiperactividad de la vía directa del nAc con conductas adictivas. La activación de las MSN D1 del nAc potencia la búsqueda de drogas y refuerza conductas de consumo. Mientras que, la activación de las MSNs D2 tendría un efecto opuesto: inhibe o reduce la conducta de búsqueda de la droga, funcionando como una señal de control que limita la compulsión (Koob & Volkow, 2016; Nakanishi et al., 2014). Experimentalmente, *Hikida et al.* describieron en un modelo de ratón, que el bloqueo de la vía directa provocó una marcada reducción en la sensibilización locomotora y el aprendizaje de preferencia condicionada a la cocaína; mientras que, el bloqueo de la vía indirecta no impidió los efectos recompensantes de la droga, pero si, el aprendizaje de respuesta aversivas asociadas (Hikida et al., 2013). Estos reportes indican que la vía directa sería la principal mediadora de los efectos reforzantes de las drogas adictivas, en tanto

que, la indirecta contribuiría más modestamente a frenar dichas conductas o a procesar las consecuencias negativas. En humanos, estudios de neuroimagen apoyan esta diferenciación, dado que en individuos con adicción se ha observado la disminución de receptores D2 accumbales (Volkow & Morales, 2015b), favoreciendo que la vía directa (pro-recompensa) domine y se exacerbe la conducta de búsqueda compulsiva.

Núcleo Accumbens y Envejecimiento

En el contexto del envejecimiento, la evidencia disponible describe cambios, tanto estructurales como neuroquímicos en el nAc (Tabla 1). En términos de volumen, estudios en humanos, mediante el uso de fMRI, revelan una disminución significativa de esta región (Fjell & Walhovd, 2010; Liu et al., 2020; Pressman et al., 2016), mostrando una reducción de al menos 40%, respecto a sujetos jóvenes (Fjell & Walhovd, 2010; Narvacan et al., 2017). Estos cambios se atribuirían principalmente a alteraciones en la microestructura, como la ramificación y la transmisión sináptica (Walsh & Akopian, 2019; Wan et al., 2020). Por otro lado, como correlato de estos cambios neuroanatómicos, estudios en humanos, han asociado la reducción tanto de la densidad como del volumen del nAc con alteraciones de la memoria y la cognición global, tanto en participantes sanos, como con patologías como deterioro cognitivo leve y con EA (Chowdhury et al., 2013; Fu et al., 2021; Wong et al., 2012; Zonneveld et al., 2019).

Cambios adicionales que se han descrito durante el envejecimiento, es la alteración de la transmisión dopaminérgica (Kumakura et al., 2010; Ota et al., 2006). Además, en un modelo en ratas, se describió que la depleción estriatal de DA se asoció con dendritas de las MSNs significativamente más cortas y con menos espinas en comparación con los controles, lo que sugiere que los niveles de DA podrían ser un regulador importante de la morfología neuronal (Azdad et al., 2009). En consecuencia, sería posible plantear que la DA podría participar en la modificación de la microestructura del nAc. Por otro lado, alteraciones en la transmisión dopaminérgica en el nAc podría tener consecuencias en términos de comportamiento. En particular, ha sido descrito que el envejecimiento afecta los mecanismos neuronales dopaminérgicos relacionados con funciones cognitivas (Berry et al., 2016; Ciampa et al., 2022), específicamente, se ha asociado, mediante fMRI, al nAc con una alteración del error de predicción de recompensa en sujetos envejecidos (Chowdhury et al., 2013; Eppinger et al., 2013), que se ha visto revertida al administrar farmacológicamente un precursor de DA, con lo que se concluye no sólo la posible disminución de DA durante envejecimiento; sino su rol en el proceso de aprendizaje basado en recompensa en el nAc (Chowdhury et al., 2013).

Asimismo, el nAc se asocia con el aprendizaje basado en recompensas aversivas (Fenu et al., 2001; Pedroza-Llinás et al., 2009; Ramírez-Lugo et al., 2007)). Particularmente, un estudio en ratas envejecidas mostró una atenuación de la neofobia. Es esperable que, al encontrarse con un nuevo sabor, una rata tienda

a familiarizarse de manera progresiva con ese estímulo; sin embargo, esto tarda significativamente más tiempo en animales envejecidos (Grau-Perales et al., 2019; Morón & Gallo, 2007), lo que a su vez se ha relacionado con un patrón característico de tinción inmunohistoquímica de c-Fos (un marcador de activación neuronal) en el nAc. Un aumento en c-Fos se asoció con una atenuación en la neofobia del gusto. Estas alteraciones podrían estar asociadas a una disminución de la transmisión dopaminérgica que participa en el aprendizaje condicionado de la aversión al gusto (Grau-Perales et al., 2019).

Tal como se mencionó, la DA también tendría un rol preponderante en las conductas adictivas, específicamente en consumo de alcohol; sin embargo, la evidencia científica de cambios en nAc durante el envejecimiento es limitada. Un estudio en ratas, a través del uso de microdiálisis, reveló que luego de perfundir etanol en el nAc, los niveles de DA eran significativamente menores en el grupo de ratas envejecidas (16 meses) en comparación con las más jóvenes (4 meses) (Yoshimoto et al., 1998). Otros estudios, han descrito resultados similares, aunque en otras regiones, como CPF, VTA y estriado, donde luego de la exposición a etanol existe un aumento menor de DA en los grupos de animales de mayor edad (Jaatinen et al., 2013; Woods and Druse, 1996).

En resumen, el envejecimiento involucra cambios en la homeostasis del nAc, cuya activación es determinante en la búsqueda de un estímulo recompensante, y cuyo mecanismo se sustentaría en la disponibilidad de DA en esta región. Por lo tanto, los factores relacionados con la regulación de la excitabilidad de las

MSNs y de la DA en el nAc son de gran relevancia para comprender las bases neurobiológicas de los cambios del comportamiento dados en población envejecida. En consecuencia, en el caso específico de las conductas asociadas al consumo de alcohol, uno de los factores que podría tener un rol relevante, en esta regulación, es el receptor de glicina (Burgos et al., 2015; A. Molander et al., 2005).

Tabla 1. Cambios reportados en el nAc durante el envejecimiento

Estructurales/Morfológicos	
Volumen	↓
Numero de Neuronas	N/↓
Morfología neuronal	Atrofia dendrítica
Neurotransmisores	↓DA, N: Glu, N: GABA
Receptores	N/↓: D1R, N/↓: D1R, ↓NMDA, N/↓: AMPA, N/↓: AChR, N: GABAR, S/I: GlyR
Funcionales	
Plasticidad Neuronal	↓LTD
Asociados al comportamiento	↓ aprendizaje basado en recompensa; ↓ neofobia gustativa, ↓ efectos recompensantes EtOH

↓: disminución, N: normal. DA: dopamina, Glu: glutamato, D1R: receptor D1 de dopamina, LTD: Long-term depression, S/I: sin información.

Receptores de Glicina (GlyRs)

Los GlyRs, junto con los receptores de GABAA ($GABA_A R$), el receptor nicotínico de acetilcolina y el receptor ionotrópico de serotonina (5-HT₃), pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGIC). Tanto GlyR como $GABA_A R$, son los principales componentes de la neurotransmisión sináptica inhibitoria rápida en el SNC (Burgos et al., 2015). Aumentan la permeabilidad de la membrana a aniones, principalmente los iones cloruro, lo que produce una inhibición rápida y eficaz de las membranas neuronales.

Los GlyRs en humanos y animales se componen de subunidades α y β que pueden formar complejos homo (5α) o heteropentaméricos ($4\alpha-1\beta$) (Figura 3). Las subunidades β permiten el anclaje del receptor en la sinapsis mediante la interacción con la proteína gefirina (Durisic et al., 2012; Grudzinska et al., 2005). La composición de los GlyRs varía durante el desarrollo. En modelos animales, la subunidad $\alpha 1$ está ampliamente distribuida y alcanza altos niveles de expresión a los 15 días postnatales (Aguayo et al., 2004; Lynch, 2009). La subunidad $\alpha 2$ se expresa durante el desarrollo embrionario, disminuyendo en etapas avanzadas (Avila, Vidal, et al., 2013; Lynch, 2009). Finalmente, la subunidad $\alpha 3$ se expresa, más tardíamente, alrededor de la tercera semana de maduración posnatal (Aguayo et al., 2004; Lynch, 2009). Durante el envejecimiento, se plantea una posible disminución en la expresión de GlyRs (Konar-Nié et al., 2022).

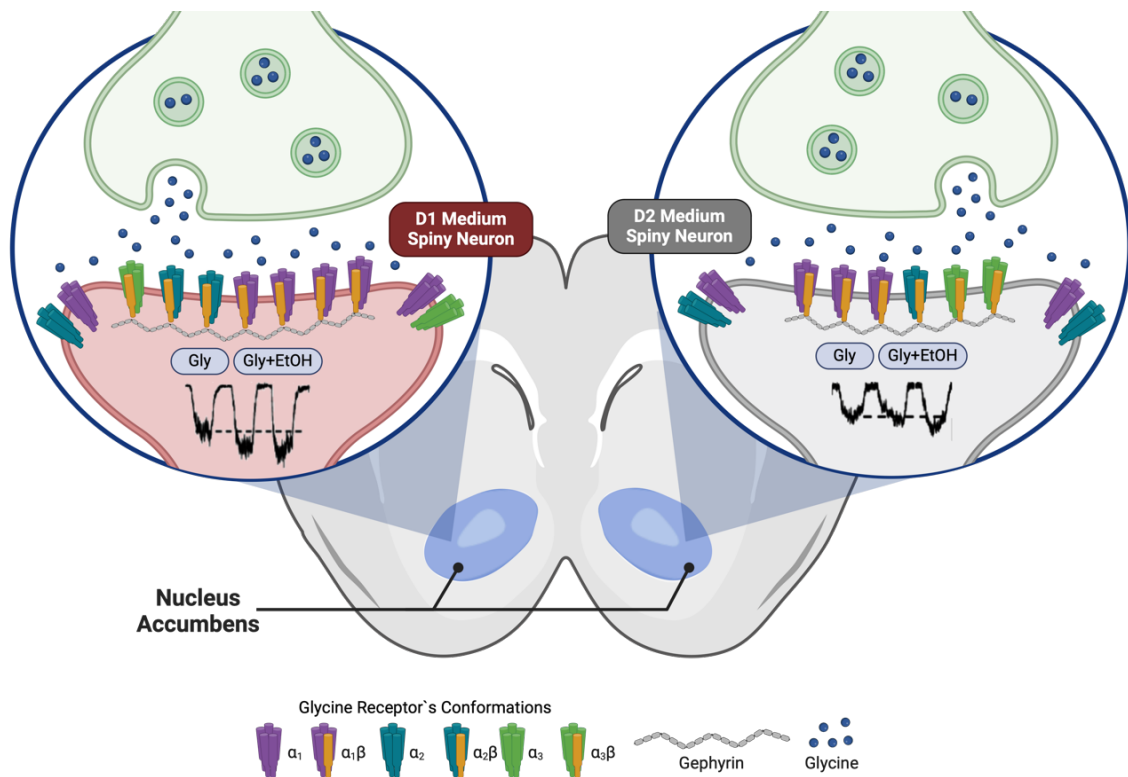


Figura 2. Expresión de GlyRs en MSN D1 y D2 del nAc. A la izquierda, se representa una sinapsis glicinérgica en las MSNs D1, donde se expresan receptores de glicina sinápticos heteroméricos ($\alpha_1\beta$, $\alpha_2\beta$ y $\alpha_3\beta$), con predominancia de las subunidades $\alpha_1\beta$, así como receptores extrasinápticos (α_1 , α_2 y α_3). Las conformaciones predominantes de estos receptores presentan una alta sensibilidad tanto a la glicina como al etanol. El trazo de corriente ilustra la potenciación de la corriente mediada por glicina en presencia de etanol. A la derecha, en la sinapsis glicinérgica de las MSNs D2, se observan conformaciones homoméricas y heteroméricas que, en comparación con las MSNs D1, son menos sensibles a la glicina y no son potenciadas por etanol. Los trazos de corriente muestran corrientes de menor amplitud en comparación con las MSNs D1, sin evidenciarse potenciación por etanol. Además, el esquema muestra

la presencia de la proteína de andamiaje gefirina, la cual facilita el anclaje del receptor heteromérico a la sinapsis a través de la subunidad β . Información adaptada de Förster et al., 2017; Gallegos et al., 2019.

En cuanto a su distribución, se reconoce la presencia de GlyRs en retina (Sánchez-Chávez et al., 2017), médula espinal (Lynch, 2009; Van Zundert et al., 2005) y en regiones cerebrales supraespinales (Jonsson et al., 2012a), entre ellas, CPF (Salling & Harrison, 2014), núcleo dorsal del rafe (Maguire et al., 2014), amígdala (Delaney et al., 2010), HC, cuerpo estriado (McCracken et al., 2017; Molchanova et al., 2018) y nAc (Förster et al., 2017; Muñoz et al., 2018). En el nAc, se ha descrito la presencia de ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β en MSN D1, con una mayor densidad de corriente y sensibilidad a glicina y etanol que las MSN D2 (Förster et al., 2017).

La presencia de GlyR en el nAc sugiere una función inhibitoria en la regulación del circuito de recompensa. En este sentido, estudios in vivo usando microdiálisis muestran que los GlyRs estarían implicados (I) en el aumento extracelular de DA en nAc, posiblemente a través de la modulación alostérica positiva de corrientes tónicas de glicina en las MSN; y (II) en el antagonismo de la entrada excitatoria en esta región (Adermark, 2011; A. Molander & Söderpalm, 2005), siendo ambos, puntos claves para el desarrollo de la adicción.

Efecto modulador de etanol sobre los GlyRs

El etanol (EtOH) es una droga depresora que afecta múltiples sistemas del organismo al ser consumida (Dguzeh et al., 2018). Estudios realizados en neuronas espinales y en motoneuronas del tronco encefálico, mostraron la inhibición de receptores de glutamato tipo NMDA y potenciación del GABA_AR, en ambos casos con altas concentraciones de EtOH (Aguayo et al., 1996; Sebe et al., 2003). Sin embargo, se ha descrito que el EtOH es un modulador alostérico positivo que provoca una potenciación considerablemente mayor de los GlyRs (Aguayo et al., 1996), fundamentalmente en aquellos de tipo homomérico $\alpha 1$ y heteromérico $\alpha 2\beta$ (Figura 3).

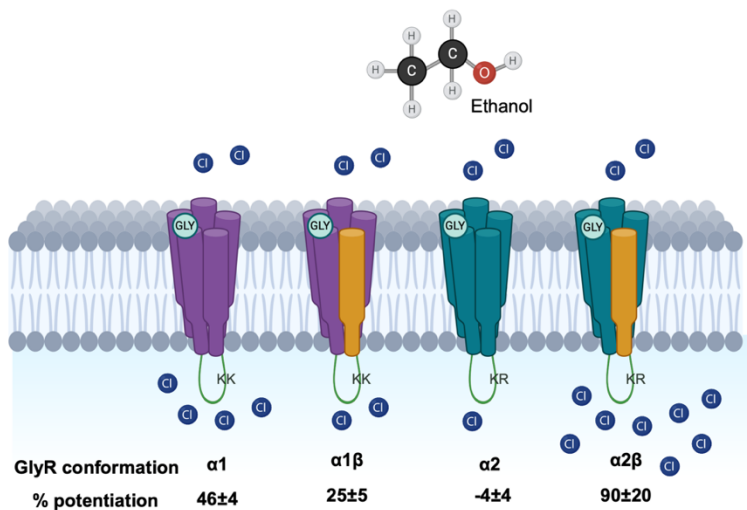


Figura 3. Esquema de potenciación mediada por etanol en células HEK-293 transfectadas con distintas subunidades del receptor de glicina. El esquema resume resultados de mediciones electrofisiológicas de células HEK-293 transfectadas con las distintas subunidades del receptor de glicina con co-perfusión de etanol 100 mM y glicina 15 μ M. Hay diferencias en grado de potenciación de la actividad de los receptores heteroméricos y del receptor homoméricos α 1 y α 2. Los números reflejan el % de potenciación para las distintas conformaciones del receptor. (Modificado de Muñoz et al., 2021)

Específicamente en nAc, se ha demostrado que bajas concentraciones de EtOH (5-20 mM) potencian la función de los GlyRs extrasinápticos α 1 en las MSN D1, provocando una disminución en la excitabilidad de estas (Gallegos et al., 2019). Este efecto no se observó en los receptores sinápticos α 1 (α 1 β) en acumbens, que no mostraron sensibilidad a EtOH (Muñoz et al., 2018). Adicionalmente, mediante el uso de ratones *knock in* para el receptor α 1 (Muñoz et al., 2020) y α 2 (Gallegos et al., 2021), insensibles a EtOH, se observó una disminución de la excitabilidad accumbal al administrar EtOH, sólo en ratones WT. Los estudios de comportamiento mostraron que los ratones *knock in* α 1 tenían una mayor ingesta de EtOH tras la primera exposición a la bebida y una mayor preferencia de lugar condicionado por EtOH (Figura 4).

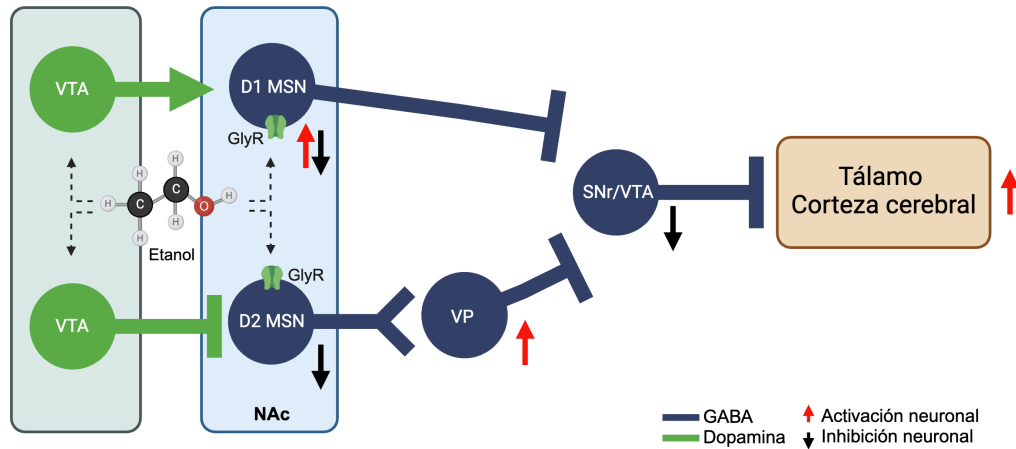


Figura 4. Los receptores de glicina afectan la preferencia por el etanol. En presencia de etanol, se libera un mayor nivel de DA desde el VTA al nAc, lo que activa a las D1 MSN y provoca la desinhibición del tálamo y la corteza cerebral. Los GlyRs presentes en las MSN se activan y se potencian por etanol, inhibiendo las MSNs, regulando su activación. (Modificado de Muñoz et al., 2020). VTA: área tegmental ventral. D1R: receptor de DA 1. D2R: receptor de DA 2. nAc: nucleus accumbens. MSN: neuronas espinosas medias. GlyR: receptor de glicina. VP: pálido ventral. SNr: sustancia nigra pars reticulata (Modificado de Muñoz et al., 2019).

En conjunto, estos datos apoyan la idea de que existe heterogeneidad en la expresión de GlyRs en el nAc, y que las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β podrían estar participando en la regulación inhibitoria de esta región, influyendo en el comportamiento asociado al EtOH.

Receptores de Glicina y Envejecimiento

A pesar de la evidencia existente relacionada a los cambios en la composición del GlyR durante las primeras etapas del desarrollo (Aguayo et al., 2004; Avila,

Vidal, et al., 2013; Lynch, 2009), se desconoce si estos son afectados durante el envejecimiento. Sólo se ha descrito una disminución en los niveles de proteínas de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, cambios en la expresión de las subunidades, que generan distintas composiciones del receptor y una reducción significativa en la unión de estricnina (STN), un inhibidor competitivo del GlyR, en el núcleo coclear dorsal en ratas de edad avanzada (H. Wang et al., 2009).

En consecuencia, ante la escasa evidencia, es posible postular que algunos modelos, como los de Enfermedad de Alzheimer (EA) podrían ser una aproximación a los fenómenos suscitados durante el envejecimiento avanzado, dado que algunas de las características fisiopatológicas de la EA estarían presente en sujetos sanos de edad avanzada (Hof, 1997; Zou et al., 2010). En este contexto, se ha descrito, en un modelo de ratón para EA, cambios electrofisiológicos en los GlyRs del nAc a los 6 meses de progresión de la enfermedad, con una reducción de la amplitud y densidad de corriente glicinérgica, sugiriendo una disminución en el número de GlyRs (Fernández-Pérez et al., 2020). Estos hallazgos concuerdan con datos no publicados de nuestro laboratorio, que muestran una disminución progresiva en la activación de los GlyRs de las MSN de nAc con la edad (Figura 5).

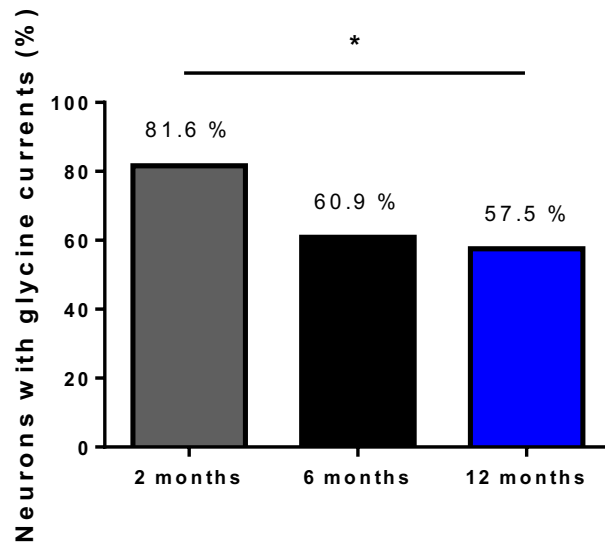


Figura 5. Análisis de corriente evocadas de glicina en nAc de ratones C57BL/6 a diferentes edades mediante la técnica de patch clamp. El gráfico muestra la disminución progresiva de la activación de receptores de glicina accumbales durante el envejecimiento. Prueba χ^2 , $p < 0.05$. $n = 40$ a 49 neuronas por grupo (Manuscrito en preparación, Gallegos. S., Aguayo, L.).

En resumen, **el creciente aumento de la población mundial mayor de 60 años y el efecto negativo del alcohol en el desarrollo de un envejecimiento saludable subrayan la importancia de comprender los factores neurobiológicos que influyen en el consumo de alcohol así como la edad aumenta.** En este sentido, es fundamental considerar que (I) el envejecimiento es un proceso complejo que involucra múltiples cambios cerebrales, incluyendo el centro integrador del sistema de recompensa conocido como nAc, (II) las MSN D1+ del nAc están asociadas con la búsqueda de estímulos gratificantes, y (III) los GlyRs son altamente sensibles al EtOH y contribuyen al equilibrio excitatorio/inhibitorio de esta región del cerebro. En consecuencia, nos preguntamos si durante el envejecimiento **¿hay cambios en la expresión de las distintas subunidades del GlyR en el nAc? y si los hay, ¿afectan igualmente a las MSNs D1 y D2?, y con relación a los cambios en los comportamientos asociados a etanol ¿estarán relacionados a los GlyRs del nAc en el envejecimiento?**

HIPOTESIS

Durante el envejecimiento ocurre una disminución de los receptores de glicina de las neuronas D1 del nAc lo que produce disminución en el consumo y preferencia de etanol en ratones envejecidos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si los receptores de glicina de las neuronas D1 del nAc disminuyen durante el envejecimiento, asociados a cambios en el consumo y preferencia de etanol.

Objetivos Específicos

Objetivo específico 1. Determinar cambios en la expresión y funcionalidad de GlyRs en neuronas D1 del nAc de ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).

Actividad 1.1. Caracterizar la funcionalidad del GlyR en MSN del nAc en los distintos grupos etarios de estudio a través del análisis de la dinámica del calcio en rebanadas perfundidas con etanol.

Actividad 1.2. Caracterizar la funcionalidad del GABA_AR en MSN del nAc en los distintos grupos etarios de estudio a través del análisis de la dinámica del calcio en rebanadas tratadas con bicuculina.

Actividad 1.3. Determinar expresión proteica de las subunidades α del GlyR y gefirina en las MSN D1 del nAc mediante inmunohistoquímica en ratones BAC Drd1a-tdTomato.

Actividad 1.4. Determinar niveles de mRNA de las subunidades α_1 , α_2 , α_3 y β del GlyR en las MSN D1 del nAc mediante RT qPCR acoplada a FACS en ratones BAC Drd1a-tdTomato.

Objetivo específico 2. Determinar cambios en el consumo, preferencia de etanol y efectos motores en ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).

Actividad 2.1. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.

Actividad 2.2. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.

Actividad 2.3. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad α_1 del GlyR en MSN D1+.

Actividad 2.4. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

Actividad 2.5. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

Actividad 2.6. Determinación de la preferencia por etanol con la prueba con la prueba Conditioned place preference (CPP) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.

Actividad 2.7. Determinación de la preferencia por etanol con la prueba Conditioned place preference (CPP) en ratones adultos jóvenes (6 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

Actividad 2.8. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones adultos jóvenes (6 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Los 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,

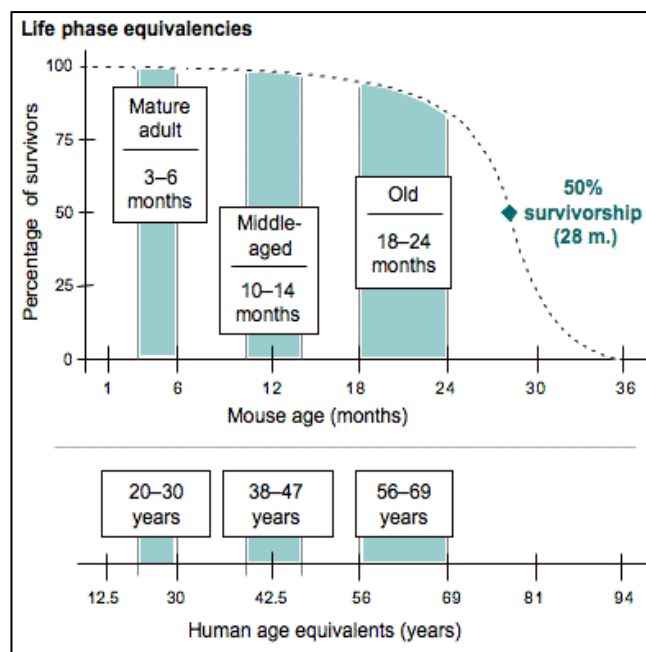


Figura 6. Intervalos de edad representativos para las etapas del ciclo vital maduro en ratones C57BL/6J y comparación con humanos. Imagen adaptada de Flurkey et al., 2007.

adolescentes (2 mo), adultos (6mo), mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo) (Flurkey et al., 2007) .

EEUU). Machos de 2, 6, 12 y 18 meses de vida fueron usados para experimentos de inmunohistoquímica (IHC), RT qPCR, actividad neuronal y comportamiento.

Los grupos etarios se determinaron en base a la definición de las etapas de desarrollo de los ratones y su comparación a la de los humanos (Figura 6). De acuerdo con esto se definieron como ratones

Los ratones se mantuvieron en cajas en grupos de 2 a 4 ratones en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*.

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.

Ratón D1Cre: estos ratones transgénicos expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor D1R de ratón. Se informa que el patrón espacio-temporal de la expresión de Cre en las neuronas MSNs recapitula fielmente el del gen endógeno *Drd1a* en las etapas embrionaria y adulta, según lo evaluado mediante análisis inmunohistológicos. La expresión es prominente en las principales áreas de proyección del sistema dopaminérgico, incluido el nAc (Lemberger et al., 2007).

*Ratón *Drd1a*-tdTomato:* estos ratones mutantes albergan un BAC transgénico que contiene el promotor del receptor de DA D1A de ratón que dirige la expresión de una proteína fluorescente DsRed modificada, tdTomato. Estos ratones *Drd1a*-tdTomato expresan tdTomato en las neuronas estriatonigrales de una manera más precisa y específica que la observada en líneas fundadoras anteriores (Ade et al., 2011), es decir, las MSNs tipo D1 del nAc expresan el reportero tdTomato.

Inyección estereotáxica

Ratones WT y D1Cre fueron anestesiados en una cámara con 5% isoflurano (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 isoflurano (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 uL mediante estereotaxia, 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 realizó inyección bilateral en el nAc de 200 nl con los adenovirus AAV-DIO-GlyR α 1-IRES-mCitrine, AAV-mDlx-GlyR α 1WT-GFP y pAAV-Syn-GCaMP6s-WPRE.SV40, para experimentos de comportamiento que requieren la sobreexpresión de subunidad α 1 del GlyR en MSN D1+ o en nAc total, y análisis de dinámica de calcio, respectivamente. Finalmente, 24 horas posteriores a la cirugía se les administró un tratamiento analgésico (0.1-0.2 mg/kg ketoprofeno/Tramadol, intraperitoneal). Durante todo el procedimiento post-quirúrgico se realizó supervisión periódica para detectar signos de dolor o estrés. Los experimentos se llevaron a cabo 2 a 3 semanas post cirugía. Luego de los experimentos de comportamiento se revisó sitio de inyección para corroborar la presencia de fluorescencia en el sitio de inyección. Los animales que no fueron correctamente inyectados, fueron excluidos del análisis final. La eficacia de los virus AAV-DIO-GlyR α 1-IRES-mCitrine y AAV-mDlx-GlyR α 1WT-GFP, fue

reportada previamente por Araya et al. (2022), mediante las técnicas de Western Blot, electrofisiología y fluorescencia del reportero del virus.

Obtención de rebanadas de cerebro de ratón

Para la obtención y preparación de rebanadas de cerebro en fresco, los ratones fueron decapitados siguiendo protocolo por Jun et al. (Jun et al., 2011). El cerebro fue rápidamente disectado y puesto en solución de corte (en mM): 194 Sacarosa, 30 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 Glucosa (pH 7.4) previamente saturado con 95% O₂ y 5% CO₂ por 30 minutos. El cerebro se adhirió con cianoacrilato a la cámara de corte para obtener las rebanadas de 300 µm 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 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 10 Glucosa, 2 CaCl₂ (pH 7.4 y ajustado con sacarosa a 315-320 mOsm) saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ a 32°C por 1 hora.

Análisis de dinámica de calcio intracelular

La actividad neuronal se estudió a través del análisis de la dinámica de calcio en ratones previamente inyectados por estereotaxica para que expresen el detector de calcio GCamp. Posterior al protocolo de obtención de rebanadas antes descrito, estas fueron mantenidas durante todo el experimento a 30 °C en aCSF continuamente oxigenado. El sistema de registro consistió en un fotómetro

microscópico Horiba PTI D-104 con un tubo fotomultiplicador 710 montado en un microscopio Olympus BX51 (el conjunto incluye un sistema de iluminación LED Boost High-Power de 120 LED y filtros fluorescentes adecuados, todo ello controlado por un ADC EPC 10 y una plataforma de software de HEKA). La señal de calcio se evocó colocando un electrodo estimulador (DS3 Isolated Current Stimulator, Digitimer, Ltda, UK) en el nAc adyacente y próximo al lugar de registro utilizando una intensidad de estímulo entre 400 y 800 μ A durante 1 ms. La fluorescencia se registró durante 20 s y cada 2 min, obteniéndose señales estables. EtOH (20 mM) y la bicuculina (10 μ M) se disolvieron en aCSF y se perfundieron en la cámara de registro. Las respuestas basales se midieron durante 15-20 min antes de las aplicaciones del fármaco para garantizar señales estables. Los resultados obtenidos, que reflejan la actividad neuronal, se expresarán mediante la fórmula dF/F , donde, dF representa el cambio en la fluorescencia, mientras que F se refiere a la fluorescencia basal. La fórmula dF/F permite normalizar los cambios observados en la señal de fluorescencia en comparación con la línea base, facilitando interpretación de la actividad celular en las diferentes condiciones descritas.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Ratones *Drd1a*-tdTomato fueron decapitados, el cerebro diseccionado y rebanado de acuerdo con lo anteriormente descrito, adicionalmente, en cada sesión se procesó además un animal WT de la misma edad como control

negativo. Para ambos casos, el nAc fue rápidamente disectado e inmerso en una solución de trituración (en mM): 20 NaCl, 130 N-methyl-D-glucamina, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 10 Hepes, 10 glucose (pH 7.4 y 340 mOsm). Se trabajó todo el protocolo a 4°C. El tejido disectado fue triturado por aspiración mediante el uso decreciente de puntas de micropipeta y finalmente una aguja de 23G hasta la obtención de una solución opalescente.

Se utilizó el equipo FACS Aria III (BD Biosciences) para el *cell sorting*. El debris fue removido seleccionando FSC-A/SSC-A y los dobletes de células mediante la selección de SSC-H/SSC-W. Luego, los eventos tdTomato positivos y tdTomato negativos se seleccionaron mediante la determinación previa de la ventana de análisis de los eventos observados en ratones WT a 585/42 nm. Finalmente, las células obtenidas se mantuvieron a 4°C y se recogieron en tubos falcon transparentes con 100 µL de PBS en cada tubo. De aquí en adelante, para evitar confusión, los “eventos” serán llamados “neuronas”.

RT qPCR

Extracción de ARN. Se obtuvo ARN total de las células obtenidas mediante FACS, MSN D1+ y MSN D1-. El ARN fue extraído mediante el método de extracción tiocianato de guanidinafenol/cloroformo, homogenizando las muestras en 500 µL de Trizol® e incubándolas por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 10 min. Se

retiró el sobrenadante y se agregó 200 μL de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C, para separar las fases. Una vez recuperada la fase acuosa, se agregaron 500 μL de isopropanol a cada muestra, las que fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue lavado dos veces con 500 μL de etanol 70% v/v y centrifugado a 12.000 g por 5 min a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 10 μL de agua libre de RNasa. El ARN total fue cuantificado midiendo su absorbancia a 260 nm y su pureza se midió por la relación 260/280 nm. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

Síntesis de ADNc. Previo a la síntesis de ADNc, 1 μg de ARN total fue tratado con RNasa (Fermentas International Inc.) donde se obtuvieron 6 μL de solución. La síntesis de ADNc fue realizada utilizando el AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Inc.). Para un volumen final de 20 μL , se incubó el ARN con 1 μL de EDTA y se incubó a 65°C por 10 min. A la mezcla anterior se le agregó 3 μL de OligodT, 10 μL first strand master mix y 1 μL de affinity script RT/RNasa Block, y se programó un ciclo de 25°C por 5 minutos, 42°C por 45 minutos y 95°C por 45 minutos. La reacción de síntesis del ADNc obtenido se realizó en un termociclador Maxygene II (Axygene). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

qPCR. Para este ensayo se utilizó el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). La mezcla de volumen final de 12.5 µL contenía 1 µL de ADNc y 500 nM de los partidores (Tabla 1). Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min, luego se realizaron 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 15 s y 72°C por 15 s, en el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems). La cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct) con relación al gen de referencia ciclofilina. Los resultados fueron expresados aplicando el método $\Delta\Delta C_t$ en los cuales la cantidad de ARN fue expresada como X veces sobre una muestra utilizada como referencia.

Tabla 2. Cebadores para experimento qRT-PCR

Gen	Forward primer	Reverse primer
GlyR α 1	5' GCACCAAGCACTACAACA 3'	5' AGGACAGGATGACGATGAGC 3'
GlyR α 2	5' GAGACAGCAGTGGAATGATTC 3'	5' TCCGCAACAACCTTGTTCAG 3'
GlyR α 3	5' GCCTCCTGATCGTTATTCTATC 3'	5' GAACTCTGTGTGGTCATAGTAAG 3'
GlyR β	5' GGTCCAGGTGATGCTGAACA 3'	5' TTGCCTGTGGTTTCCCAAGT 3'
Gefirina	5' ACCTCTGGGCATGCTCTCTA 3'	5' TGGAGAGAGAGGAGGTGGTG 3'
Ciclofilina	5' ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC 3'	5' ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC3'

Inmunohistoquímica (IHC)

Los ratones *Drd1a-tdTomato* fueron anestesiados (0.2 μ L xilazina/Ketamina) y fijados con PFA al 4% por perfusión vascular. Se extrajo el cerebro y mantuvo en PFA 4% a 4°C por 24 horas, luego fueron traspasados a una solución de sacarosa al 30% por 3 a 5 días a 4°C. Finalmente, los cerebros se criopreservaron en medio NEG 50 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) a -80°C hasta ser rebanados.

Se obtuvieron rebanadas coronales de cerebro de 30 μ m con criostato, las que se almacenaron a -80°C hasta ser teñidas.

Para la tinción, las rebanadas se descongelaron con buffer TRIS PO₄, se realizaron 2 lavados de 10 minutos con el mismo buffer, para luego bloquear y permeabilizar 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-Pan α GlyR (1:300, conejo, Synaptic Systems) o anti-Gefirina (1:300, ratón, Synaptic Systems) y anti-MAP2 (1:200, cobayo, Synaptic Systems) en PBS con 10% de suero de caballo y 0.3% Triton a un volumen de 90 μ L por rebanada. Al día siguiente, las rebanadas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con TRIS PO₄ en agitación. Luego se incubaron por 2 horas en agitación a RT en cámara húmeda con la solución con los anticuerpos secundarios anti-rabbit/Alexa488, anti-cobayo/Alexa647 o anti-mouse/Alexa488 (Jackson Laboratories) y DAPI (1:10000) en PBS con 10% de suero de caballo y 0.3% Tritón a un volumen de 90 μ L por rebanada. Después de 3 lavados por 10

minutos en agitación con TRIS PO₄. 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 microscopio confocal LSM710 (Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron procesadas con el software ZEN black edition (Zeiss, Alemania). Las imágenes obtenidas con objetivo 63x y Z-stack, fueron analizadas con software Fiji.

Estudios de comportamiento

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 & Navarro, 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 25 ml con zipper 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). A los ratones utilizados en la prueba DID, se les extrajo sangre desde la vena facial (20-50 μ L) 10 minutos después de terminar la sesión de consumo el día 4. 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).

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 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 μ 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, estas se realizaron dos veces al día, la primera dos horas después del comienzo del ciclo de luz, y la segunda 5 horas luego de la primera. 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).

Prueba de campo abierto (del inglés: Open field assay, OF). Prueba 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 de tipo ansioso en el animal.

Análisis de datos

Los datos fueron presentados como el promedio \pm SEM para poblaciones con distribución normal o como mediana y rangos intercuartílicos para poblaciones sin distribución normal, determinado por la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando t de Student no pareada y para condiciones con más de 2 factores se utilizó ANOVA (One-way o Two-way) seguido por Bonferroni *post hoc* test para distribuciones normales y Kruskal Wallis seguido por Dunn *post hoc* test para distribuciones no normales. Un nivel de probabilidad (p) menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Se utilizó GraphPad Prism 9 Software (Boston, MA, Estados Unidos) para el análisis de los datos. n.s. no significativo, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p<0.0001.

RESULTADOS

Objetivo específico 1. Determinar cambios en la expresión de los GlyR en neuronas D1 del nAc de ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).

En las actividades 1.1 y 1.2 se realizaron experimentos enfocados en estudiar la funcionalidad y expresión del GlyR en el nAc durante el envejecimiento, debido a la escasa evidencia disponible en la literatura. La funcionalidad del GlyR se analizó mediante la dinámica del calcio intracelular utilizando GCamP, un indicador de calcio genéticamente modificado (GECI), capaz de detectar aumentos de calcio intracelular y transformarlos en una señal fluorescente, la cual se registró como transitoria de calcio. Datos previos no publicados de nuestro laboratorio que analizaron la dinámica de calcio en MSNs del nAc evidenciaron una disminución del efecto de STN (bloqueador de los GlyRs), dependiente de la edad, en ratones de 2, 6 y 12 meses (Armijo, L. datos no publicados), lo cual sería compatible con la disminución de la presencia de GlyRs durante el envejecimiento. Por lo tanto, en este trabajo se decidió realizar este experimento bajo dos condiciones: tratamiento con EtOH, un modulador alostérico positivo del GlyR, y tratamiento con bicuculina, un inhibidor de los receptores GABA_AR que, junto a los GlyRs, son los encargados del tono inhibitorio en el SNC.

Por otro lado, las actividades 1.3 y 1.4 estuvieron orientadas a estudiar la expresión proteica y los niveles de mRNA del GlyR en el nAc, respectivamente, diferenciando entre MSNs D1+ y D1-.

Actividad 1.1. Caracterizar la funcionalidad del GlyR en MSN del nAc en los distintos grupos etarios de estudio a través del análisis de la dinámica del calcio intracelular en rebanadas perfundidas con etanol.

Como primer paso, decidimos estudiar la actividad neuronal mediante la expresión de GCaMP en las MSNs del nAc en ratones de 2, 6 y 12 meses de edad (Figura 7). Las transitorias de calcio fueron registradas mientras las rebanadas de cerebro que contenían el nAc eran perfundidas secuencialmente con ACSF (control), EtOH 20 mM y ACSF (lavado o washout). Las Figuras 6 A-C muestran los trazos representativos del control y tratamiento con EtOH. Los porcentajes indican la diferencia entre la transitorias de calcio del control y del tratamiento con EtOH a los 2, 6 y 12 meses de edad, con un n= 10-11 rebanadas de 3-4 ratones por grupo, correspondientes al $35.0 \pm 7.1\%$, $7.0 \pm 6.2\%$ y $3.5 \pm 4.9\%$, respectivamente ($p < 0.0029$, Prueba de Kruskal-Wallis). La gráfica D muestra el dF/F tratamiento pre/post EtOH, donde se observa una diferencia significativa en el efecto de EtOH a distintas edades ($p < 0.0004$, Prueba de Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* de Dunn).

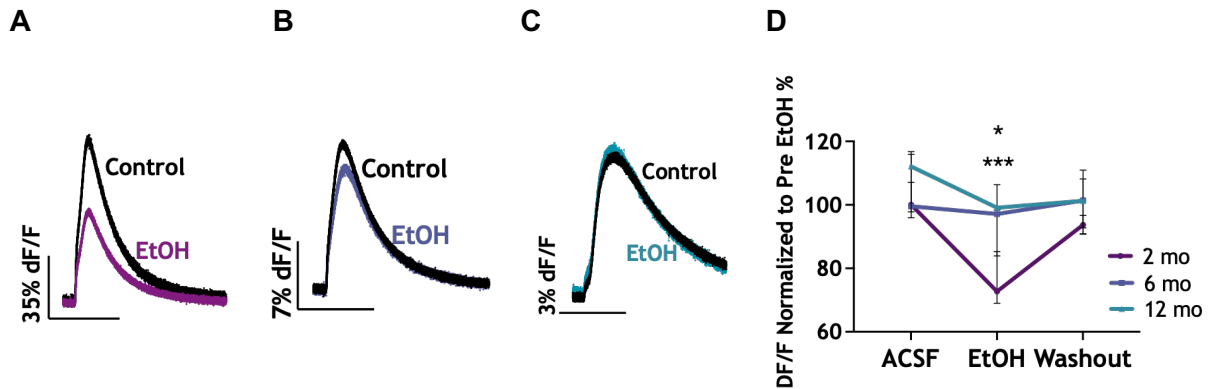


Figura 7. Disminución del efecto inhibitorio del etanol en la dinámica del calcio en las MSN del nAc con envejecimiento. (A-C) Trazos representativos pre/post tratamiento con EtOH a los 2, 6 y 12 meses de edad inyectados con el virus GCaMP6s en MSN accumbales, respectivamente. D) El gráfico muestra la disminución de dF/F a los 2 meses siguiendo exposición a etanol 20 mM. Datos corresponden a la mediana y rangos intercuartílicos. Prueba de Kruskal Wallis y Dunn *post hoc* test; n= 10-11 rebanadas de 3-4 ratones por grupo. *p<0.05*: 2 v/s 6 meses, ***p<0.001: 2 v/s 12 meses,.

Actividad 1.2. Caracterizar la expresión y funcionalidad del GlyR en MSN del nAc en los distintos grupos etarios de estudio a través del análisis de la dinámica del calcio intracelular en rebanadas tratadas con bicuculina.

Para corroborar el resultado observado en el experimento anterior, que podría deberse a una disminución de los GlyRs, realizamos el mismo experimento, pero utilizando bicuculina, bloqueador de receptores GABA_A. El objetivo fue descartar que la disminución en la actividad de las MSNs dependiente de la edad observada anteriormente se debiera a una posible disminución de los GABA_AR, los cuales son potenciados por alta concentración de etanol (Aguayo et al., 1996; Sebe et al., 2003). La Figura 8 A-C muestra trazos representativos del control y tratamiento con bicuculina, donde no se observan diferencias significativas en el porcentaje de cambio, que fueron $137.2 \pm 2.3\%$, $111.5 \pm 53.9\%$ y $74.59 \pm 20.0\%$ a los 2, 6 y 12 meses de edad, respectivamente ($p < 0.2020$; Prueba de Kruskal-Wallis) con un $n = 10-11$ rebanadas de 3-4 ratones por grupo. La gráfica D muestra el dF/F del tratamiento pre/post bicuculina, donde no se observa una diferencia significativa en el efecto de bicuculina al comparar entre las distintas edades ($p < 0.1353$; Prueba de Kruskal-Wallis).

Al inhibir los GABA_AR y estimular a las MSNs, se generó una sobre activación neuronal con consecuente aumento de la señal de calcio intracelular, lo que se tradujo en un aumento de la señal de fluorescencia respecto del control, esto es lo que se observó en los distintos grupos etarios, por lo que se asume que la

función de los GABA_AR se mantiene sin cambios significativos durante envejecimiento.

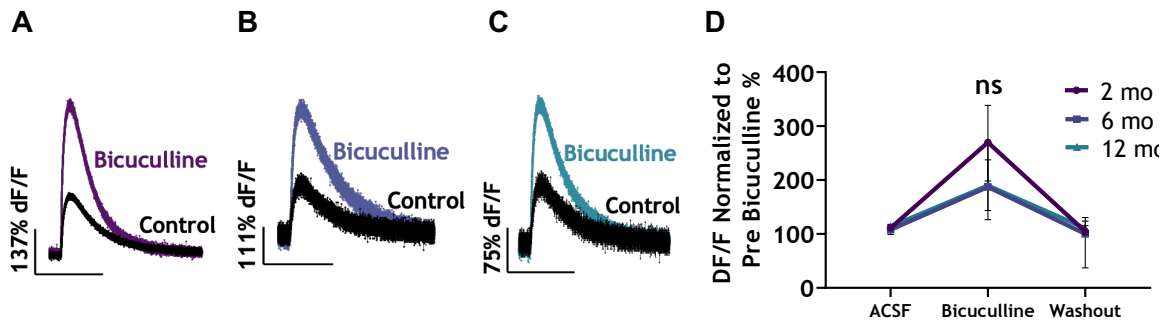


Figura 8. Análisis del efecto de bicuculina en la dinámica del calcio intracelular en las MSN del nAc durante el envejecimiento. (A-C) Trazos representativos pre/post tratamiento con bicuculina a los 2, 6 y 12 meses de edad post transducción del virus GCaMP6s en MSN accumbales, respectivamente. D) El gráfico muestra el aumento de dF/F tras el tratamiento con 10 μ M de Bicuculina. Datos corresponden a la mediana y rangos intercuartílicos. Prueba de Kruskal Wallis y test de Dunn; n= 10-11 rebanadas de 3-4 ratones por grupo.

Actividad 1.3. Determinar expresión proteica de las subunidades α del GlyR y gefirina en las MSN D1 del nAc mediante inmunohistoquímica en ratones BAC Drd1a-tdTomato

Para estudiar la expresión del GlyR en el nAc de ratones a distintas edades, se realizó un análisis inmunohistoquímico en ratones BAC Drd1a-tdTomato de 2, 6, 12 y 18 meses de edad. Para ello utilizamos el anticuerpo pan α -GlyR que reconoce todas las subunidades α del receptor en estudio ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) (Figura 9). De esta manera se marcaron secciones coronales cerebrales que contenían nAc con anticuerpos anti- α GlyR (verde), anti-MAP2 (gris) como marcador neuronal y DAPI (azul) como marcador nuclear. Fue posible inmunodetectar α -GlyR en el nAc de ratones 2, 6, 12 y 18 meses. Con el objetivo de tener un análisis preliminar sobre los cambios en los niveles de expresión proteica del receptor (niveles totales), se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia total a las distintas edades en MSN D1+ y MSN D1- (Figura 9 Q-R). En este análisis se encontró que en las MSNs D1+, los ratones de 2 meses exhiben una intensidad de fluorescencia promedio mayor, 25.2 ± 1.1 AUF (Figura 9B), que los ratones de 6 (Figura 9J) y 18 meses de edad (Figura 9N), 17.0 ± 1.8 y 22.6 ± 2.3 AUF respectivamente, ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, $n=4$ animales por cada condición). Mientras que en las MSNs D1-, no hubo diferencias al comparar en la intensidad de fluorescencia

promedio con el grupo de 2 meses de edad ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, $n=4$ animales por cada condición).

Adicionalmente, se realizó la inmunotinción de gefirina (Figura 10), un marcador post sináptico de sinapsis inhibitoria, que en el caso del GlyR, sirve como proteína de anclaje que se une a la subunidad β y permite que el receptor se localice en la densidad postsináptica (Grudzinska et al., 2005). Al igual que para la subunidad α del GlyR, marcamos secciones coronales que contenían nAc con anticuerpos anti- α GlyR (verde), anti-MAP2 (gris) y DAPI (azul). En esta ocasión igualmente pudimos inmunodetectar gefirina en el nAc de ratones 2, 6, 12 y 18 meses de edad. En la Figura 10Q-R se observa que, en términos de la intensidad de fluorescencia, tanto en MSNs D1+ como en MSNs D1-, hubo una disminución significativa entre los ratones de 2 (22.3 ± 0.9 AUF) meses de edad y los de 6 (14.4 ± 0.1 AUF), 12 (10.6 ± 0.8 AUF) y 18 (11.6 ± 1.7 AUF) meses. ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, $n=4$ animales por cada condición).

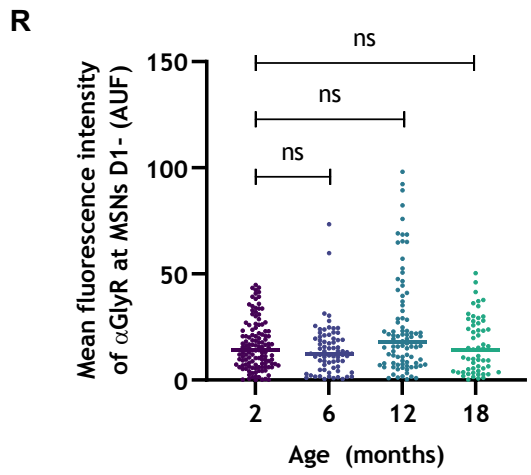
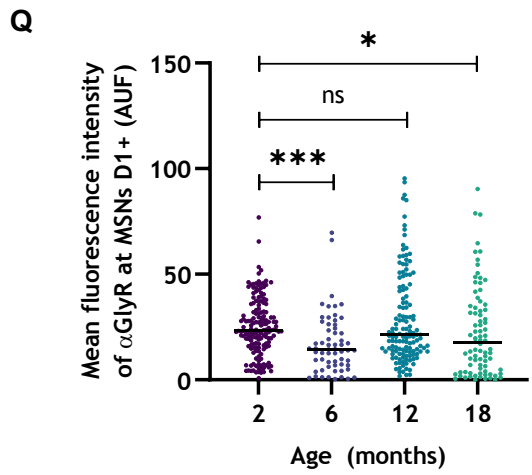
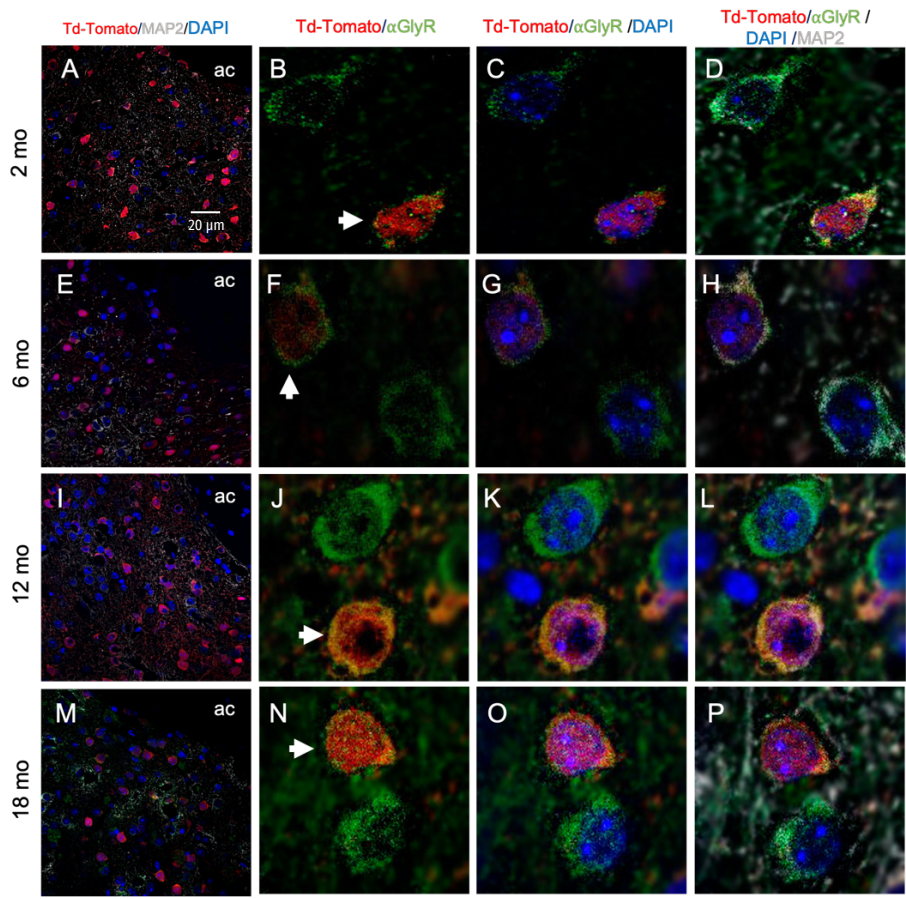


Figura 9. Análisis inmunohistoquímico de subunidad α del GlyR en MSN D1+ y MSN D1- del nAc de ratones de diferentes edades. (A-P) Secciones coronales de ratón *Drd1a-tdTomato* inmunoteñidas con anti-pan- α -GlyR (verde), anti-MAP-2 (gris) y DAPI (azul) como marcador nuclear. Ratones de 2 (A-D), 6 (E-H), 12 (I-L) y 18 (M-P) meses de edad. Para cada una de las edades, se muestran fotomicrografías ampliadas representativas del nivel de expresión de la subunidad α del GlyR en MSNs D1+ y MSNs D1-. En B, F, J y N las flechas indican las MSN D1+ expresando la subunidad α del GlyR. ac: comisura anterior. Q) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia para α GlyR en MSNs D1+ y R) MSNs D1-. AUF: unidades arbitrarias de fluorescencia. Prueba de Kruskal Wallis y test de Dunn. n = 4 por grupo. *p < 0.05, ***p < 0.001.

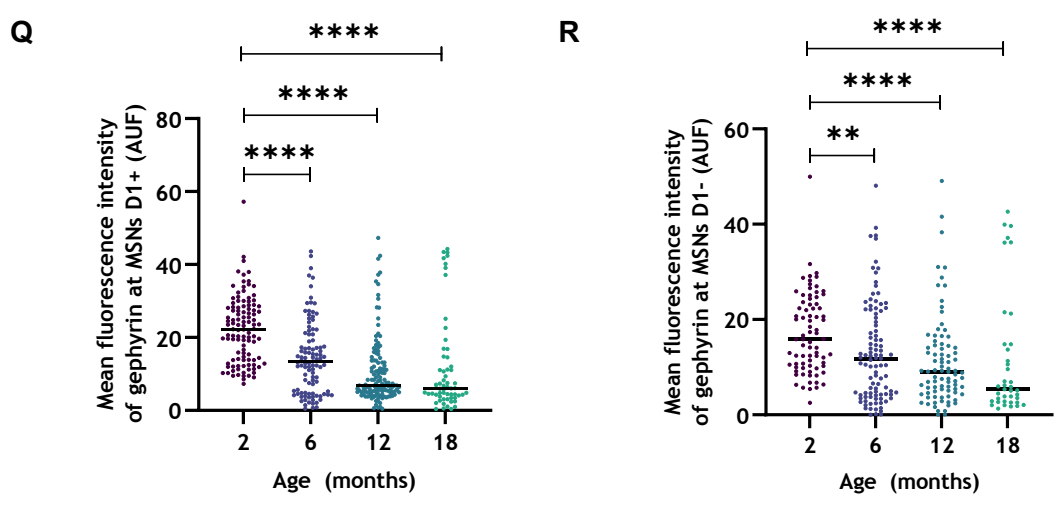
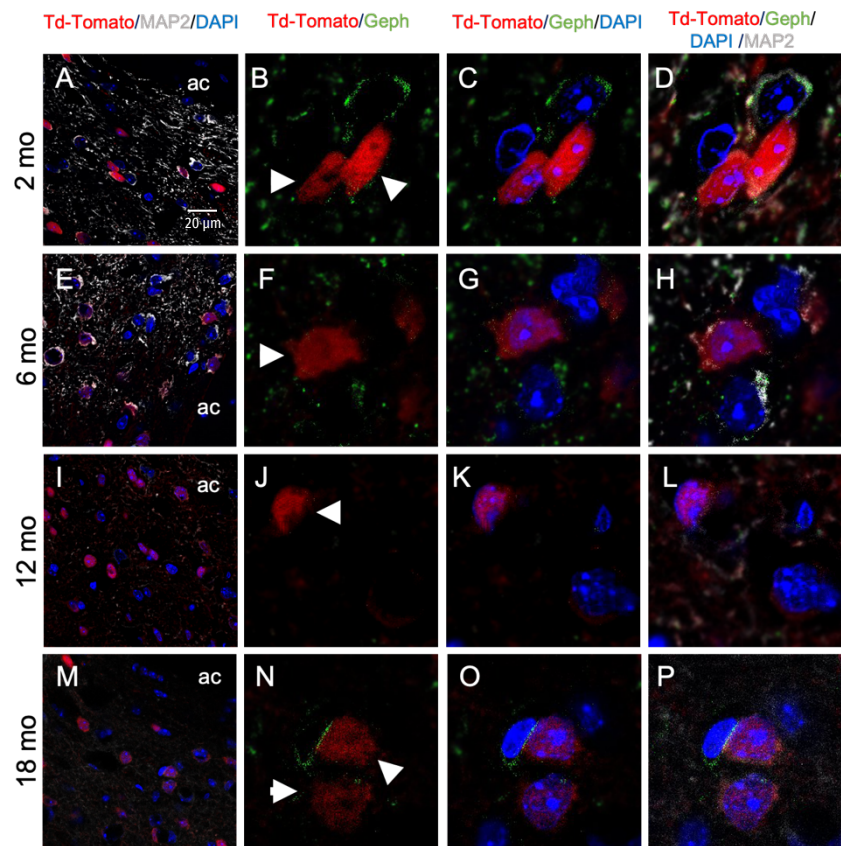
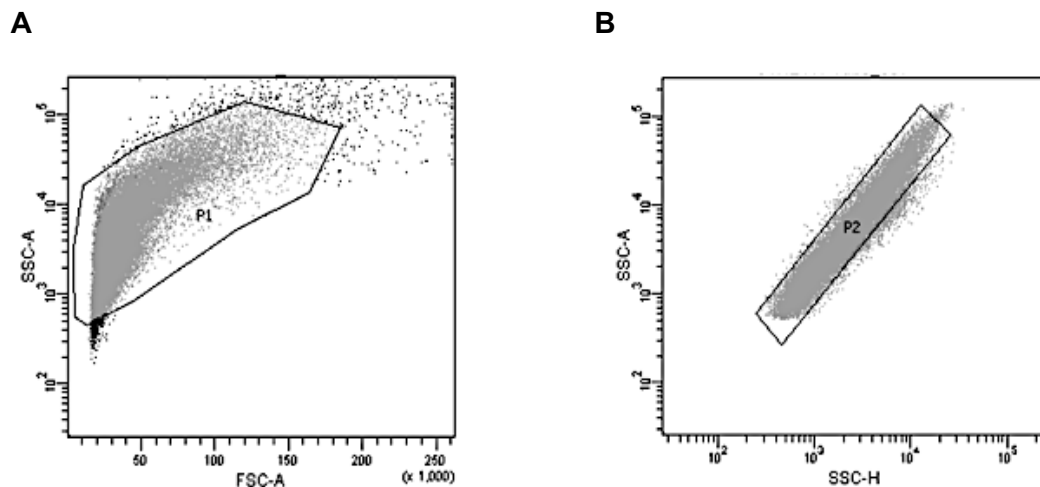


Figura 10. Análisis inmunohistoquímico de gefirina en MSN D1+ y MSN D1- del nAc de ratones de diferentes edades. (A-P) Secciones coronales de ratón Drd1a-tdTomato inmunoteñidas con anti-gefirina (verde), anti-MAP-2 (gris) y DAPI (azul)

como marcador nuclear. Ratones de 2 (A-D), 6 (E-H), 12 (I-L) y 18 (M-P) meses de edad. Para cada una de las edades, se muestran fotomicrografías ampliadas representativas del nivel de expresión de gefirina en MSNs D1+ y MSNs D1-. En B, F, J y N las flechas indican las MSN D1+ expresando Gefirina. ac: comisura anterior. Q) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia para gefirina en MSNs D1+ y R) MSNs D1-. AUF: unidades arbitrarias de fluorescencia. Prueba de Kruskal Wallis y test de Dunn. n = 4 por grupo. **p < 0.01, ****p < 0.0001.

Actividad 1.4. Determinar niveles de ARNm de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y β del GlyR y de gefirina en MSN D1 del nAc mediante RT qPCR acoplada a FACS en ratones BAC Drd1a-tdTomato.

Para estudiar qué subunidades son modificadas en la conformación del GlyR, utilizamos la técnica RT qPCR en MSNs disociadas desde el nAc, identificadas como MSNs D1+ y MSNs D1- mediante FACS. Tras eliminar debris y dobletes celulares mediante la selección de FSC-A/SSC-A y SSC-H/SSC-W, respectivamente (Figura 11 A-B), se utilizó un control negativo WT de la misma edad en cada ensayo para determinar la no presencia de eventos positivos para tdTomato (a 585/42 nm) (Figura 11C). Luego, se analizaron las neuronas del ratón de interés, obteniendo una recuperación de eventos positivos para tdTomato cercana al 5% de los eventos totales registrados, lo que correspondió aproximadamente a 2000-6000 neuronas.



C

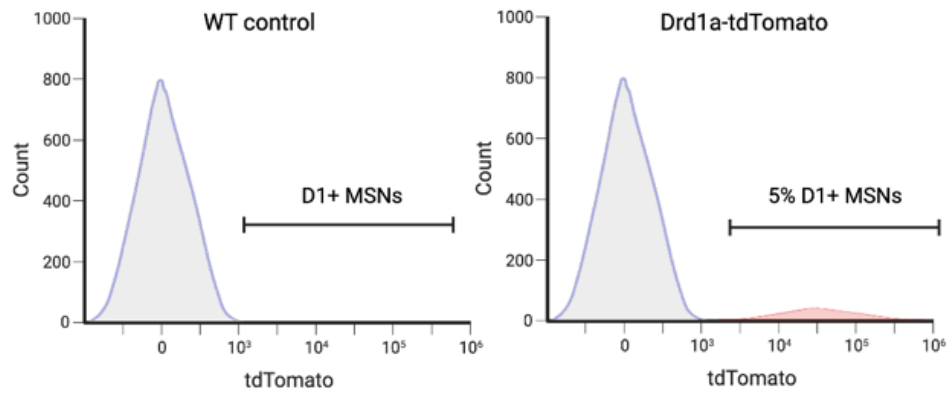


Figura 11. Metodología de FACS para la obtención de MSNs Accumbales. Las MSN D1+ y MSN D1- fueron recuperadas mediante FACS donde A) El debris se eliminó seleccionando FSC-A/SSC-A. B) los dobletes celulares seleccionando SSC-H/SSC-W. C) Las MSN D1+ y MSN D1- se clasificaron seleccionando los eventos positivos y negativos para tdTomato en ratones Drd1a-tdTomato y ratones WT, respectivamente.

En el análisis de expresión de ARNm de las distintas subunidades α del GlyR, se observó que $\alpha 1$ en MSNs D1+ disminuye a partir de los 6 meses, un efecto que se acentúa a los 18 meses de edad ($p < 0.0036$, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, $n = 5-6$ animales por condición). En las MSNs D1, no se observan cambios en la subunidad α hasta los 18 meses, donde se produce una leve disminución ($p < 0.0956$, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, $n = 5-6$ animales por condición) (Figura 12A). Por otro lado, las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ se mantienen relativamente estables, con una leve disminución de $\alpha 2$ en el grupo de 18 meses en las MSNs D1+ ($p < 0.0033$,

Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, n=5-6 animales por condición) y en el de 12 meses en las MSNs D1- ($p < 0.0507$, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, n=5-6 animales por condición) (Figura 12B). La expresión de $\alpha 3$ no presenta diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p < 0.0552$ para MSNs D1+ y $p < 0.3628$ para MSNs D1-, Kruskal-Wallis y test de Dunn para comparaciones múltiples, n=5-6 animales por condición) (Figura 12C).

En cuanto a la subunidad β del GlyR, se observó una disminución en las MSNs D1+ a partir de los 6 meses, incrementándose a los 18 meses de edad ($p < 0.0048$). En las MSNs D1- no se observaron cambios significativos hasta los 18 meses, donde se produjo una leve disminución ($p < 0.0265$) (Figura 12D).

Finalmente, los niveles de ARNm de gefirina variaron de forma similar en las distintas subpoblaciones de MSNs, con una disminución significativa a partir de los 6 meses y posterior estabilización ($p < 0.0103$ para MSNs D1+ y $p < 0.0100$ para MSNs D1-) (Figura 12E).

Estos resultados destacan el dinamismo de la expresión de las subunidades del GlyR durante el envejecimiento, identificando a las subunidades $\alpha 1$ de las MSNs D1+ y la subunidad β , junto con gefirina, como las más afectadas, siendo componentes importantes en la localización sináptica del receptor.

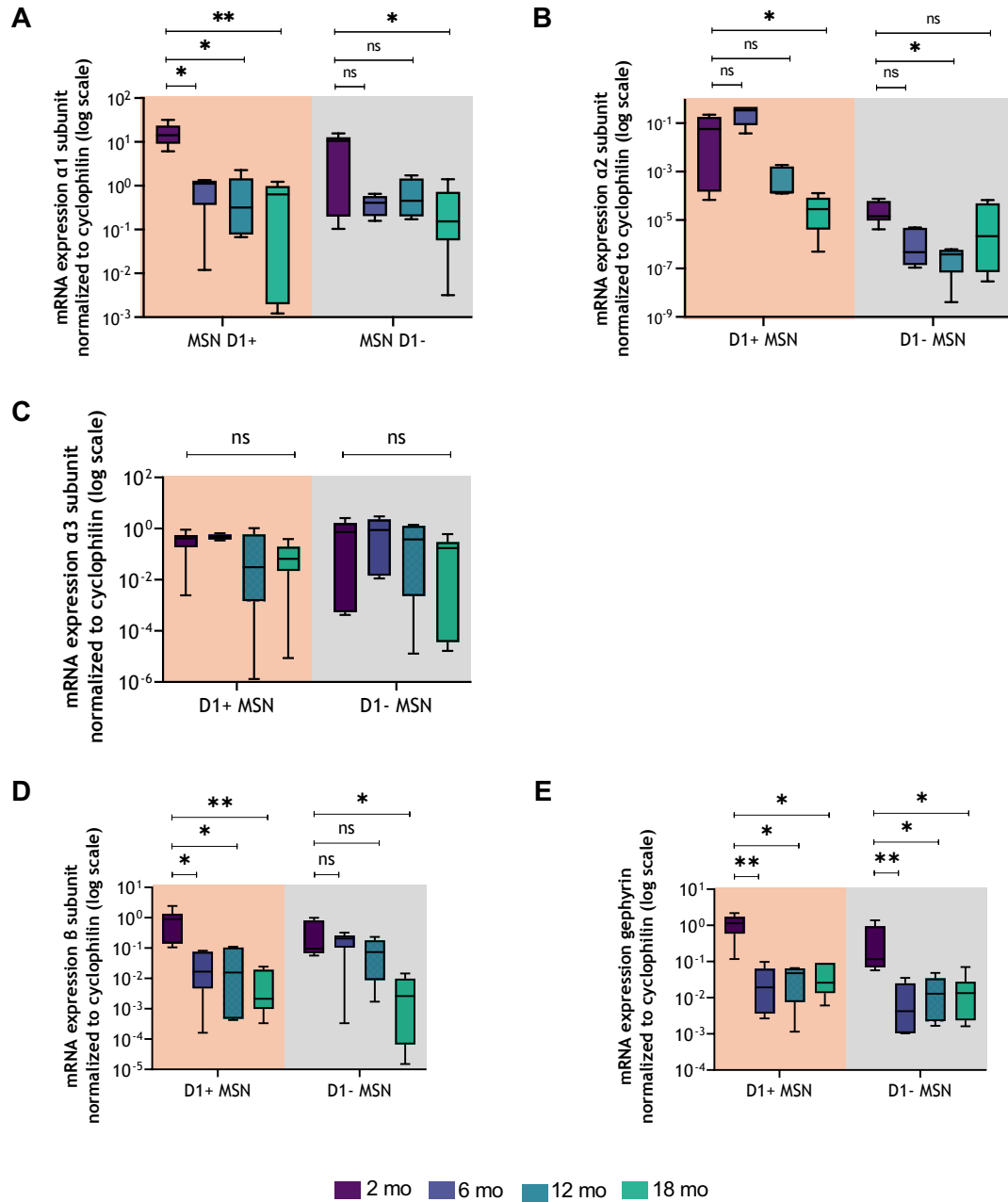


Figura 12. Evaluación de la expresión génica de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, β del GlyR y Gephyrina en MSN D1+ y MSN D1- del nAc durante el envejecimiento. Análisis de expresión relativa de ARNm de A) GlyRa1, B) GlyRa2, C) GlyRa3, D)

GlyR β y E) Gefirina. Cuantificación relativa a la ciclofilina. Prueba de Kruskal Wallis y test de Dunn. n=5-6 ratones por grupo. *p < 0.05; **p < 0.01.

Objetivo específico 2. Determinar cambios en el consumo y preferencia de etanol de ratones jóvenes (2 mo), ratones adultos jóvenes (6 mo), de mediana edad (12 mo) y envejecidos (18 mo).

Actividad 2.1. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones de diferentes edades.

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). Datos en la Figura 13A muestran que ratones de 2 meses consumen mayor cantidad de etanol que los ratones de 18 meses ($F(3, 43) = 9.702$; $p = 0.0001$, Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test $*p < 0.05$ al día 1 y 4, $***p < 0.001$ al día 2 y 3. $n = 6$ 2 mo, $n = 11$ 6 mo, $n = 14$ 12 mo, $n = 17$ 18 mo); mientras que con los grupos de 6 y 12 meses de edad las diferencias se mantienen solo el primer y cuarto día, y el segundo y tercer día, respectivamente. Como control de esta prueba (Figura 13C), a los ratones 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 las distintas edades. Los ratones consumieron en promedio 19.3 ± 2.1 , 21.4 ± 2.1 , 25.5 ± 2.1 y 16.6 ± 2.6 gramos de

agua por kilogramo de peso a los 2, 6, 12 y 18 meses de edad, respectivamente ($F(3, 41) = 2.595$; $p=0.654$ One-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. $n=6$ 2 mo, $n=11$ 6 mo, $n=14$ 12 mo, $n=17$ 18 mo).

Inmediatamente, posterior a la prueba de consumo al cuarto día, se extrajo una muestra de sangre. La Figura 14B muestra la concentración de etanol en sangre (BEC) la que entregó valores que concuerdan con lo encontrado en la prueba DID. Los ratones de 2 meses obtuvieron un valor promedio de 199 ± 41.7 miligramos de etanol por decilitro de sangre (mg/dl), mientras que los de ratones de 6, 12 y 18 meses alcanzaron los 151 ± 9.4 , 106 ± 14.1 y 66.2 ± 18.1 mg/dl en promedio, respectivamente. La caída en el BEC fue incremental, aunque, al comparar con los ratones de dos meses, sólo se hubo diferencias significativas con los grupos de 12 meses y 18 meses de edad ($F(3, 40) = 7.393$; $p=0.0005$; One-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. $n=6$ 2 mo, $n=4$ 12 mo y $n=15$ 18 mo).

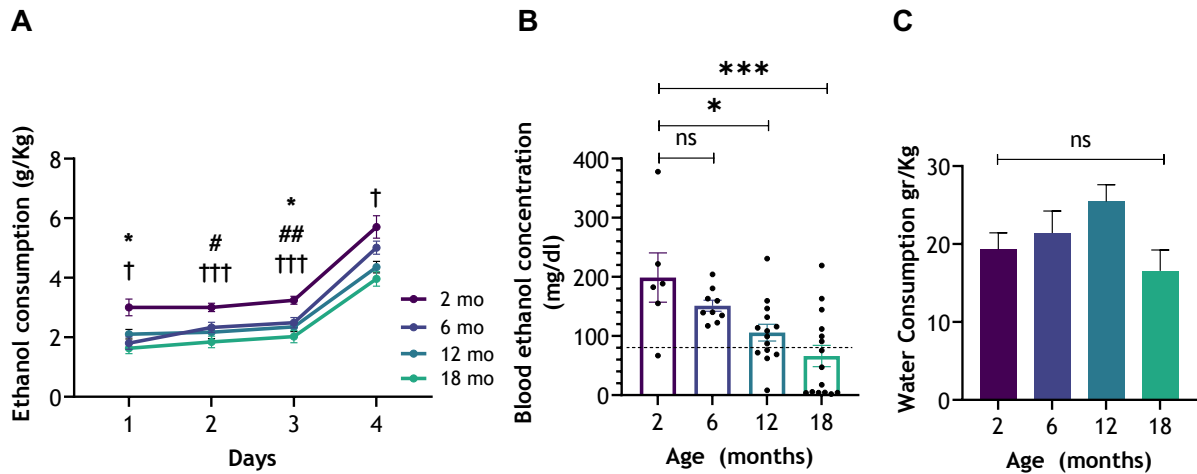


Figura 13. Análisis de consumo de etanol mediante prueba DID durante el envejecimiento. A) El gráfico muestra el consumo de etanol en gramos por kilogramo de peso (g/kg). Datos corresponden al promedio \pm SEM. Two-way ANOVA y prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *: 2 mo v/s 6 mo; #: 2 mo v/s 12 mo; †: 2 mo v/s 18 mo. *††p<0.05; ##p < 0.01; †††p<0.001 B) Concentración de etanol en sangre tras el consumo de etanol el cuarto día de la prueba. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. One-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. **p<0.01. n=6 2 mo, n=4 12 mo y n= 15 18 mo C) Prueba de agua. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. One-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. n=6 2 mo, n=11 6 mo, n=14 12 mo, n=17 18 mo.

Al finalizar esta prueba, concluimos que en este grupo de animales el consumo de etanol disminuyó significativamente a partir de los 12 meses de edad; sin embargo, este cambio se presentó sólo en los días 2 y 3 de la prueba, a diferencia de lo observado en el grupo de 18 meses de edad, donde en los 4 días que dura la prueba, estos consumieron significativamente menos etanol que los animales de 2 meses. Adicionalmente, el grupo de ratones de 18 meses de edad no

alcanzó un BEC promedio de 80 mg/dL, que es la concentración considerada como consumo compulsivo según el National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA)(National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2023). Antes de pasar a la siguiente actividad, quisimos descartar que los niveles más bajos encontrados en el BEC de los ratones de 18 meses, no se debieran a un metabolismo más acelerado del etanol en estos ratones. Para esto, realizamos inyecciones i.p. de 2 g/kg de etanol a ratones de 3 y 18 meses y comparamos los valores de BEC, extrayendo una muestra de sangre, una hora post inyección de etanol. Encontramos que tanto los ratones jóvenes como los envejecidos mantenían niveles de BEC similares una hora luego de la inyección de etanol (Figura 14), encontrando valores de 191.1 ± 2.2 mg/dl y 191.1 ± 12.7 mg/dl para ratones de 3 y 18 meses, respectivamente. De esta forma, podemos confirmar que los bajos valores de BEC que se encontraron posterior a la prueba de DID en los ratones de 18 meses, efectivamente era producto por una disminución en el consumo y no por un metabolismo de etanol mayor que en animales jóvenes.

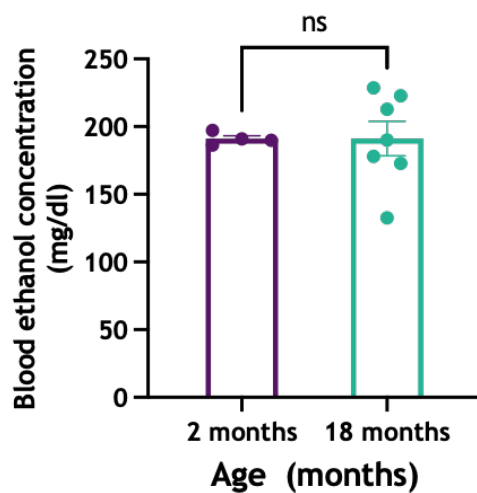


Figura 14. Análisis de la concentración de etanol en sangre posterior a la inyección i.p. de 2g/kg a ratones de 2 y 18 meses. A) El gráfico muestra la concentración de etanol en sangre obtenida en ratones de 2 y 18 meses, una hora posterior a la inyección de 2 g/kg de etanol i.p. Datos corresponden al promedio \pm SEM. Prueba de t de Student no pareada. $n= 4$ de 2 meses y $n= 7$ de 18 meses. $p= 0.9977$ no significativo.

Actividad 2.2. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.

Para evaluar el comportamiento motor basal y exploratorio durante el envejecimiento, 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 15A muestra que los ratones de 6 y 12 meses de edad realizan la prueba de manera similar a los ratones 2 meses; mientras que el grupo de 18 meses recorren una menor distancia a partir de los 10 minutos ($F(9,72) = 1.523$; $p=0.1564$ Two-way ANOVA; $n= 6-8$ por grupo).

En el caso del análisis de la trayectoria (Figura 15B), en los ratones de las distintas edades no hubo diferencias en el tiempo que pasaron en el centro de la caja, los registros promedios fueron de 29.1 ± 1.8 , 30.4 ± 1.9 , 29.6 ± 7.5 , 26.5 ± 4.7 segundos los primeros 5 minutos de prueba para los ratones de 2, 6, 12 y 18 meses de edad, respectivamente ($F(9, 72) = 0.9230$; $p= 0.5105$ Two-way ANOVA; $n= 6-8$ por grupo). Lo anterior es relevante, ya que, si algún grupo de ratones hubiera pasado más tiempo en los bordes versus el centro, esto podría sugerir la presencia de un comportamiento de tipo ansioso. Por lo que se puede afirmar que los ratones de 6, 12 y 18 meses de edad no presentan

comportamiento de tipo ansioso y exploran un ambiente nuevo similar a ratones de 2 meses.

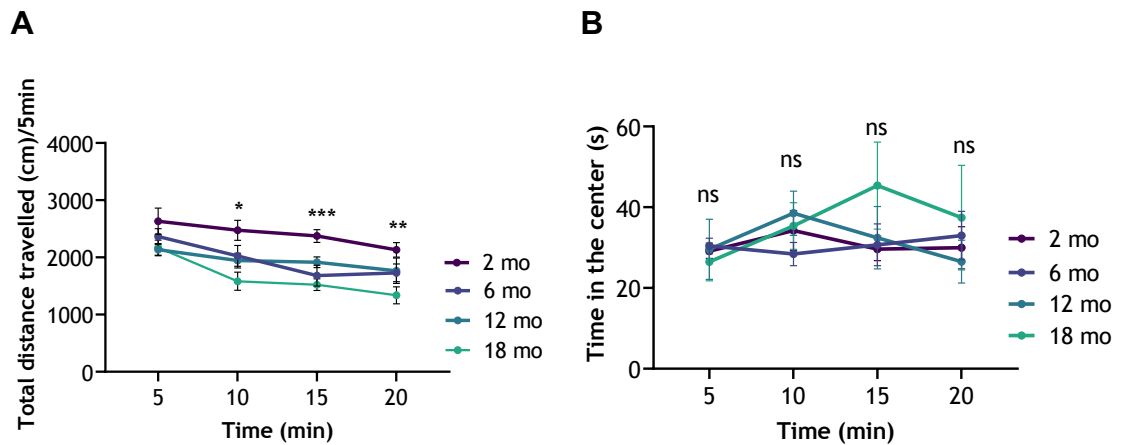


Figura 15. Análisis del comportamiento exploratorio y de tipo ansioso durante el envejecimiento. A) Ensayo de open field en condiciones basales. Ratones pueden explorar un ambiente abierto nuevo durante 20 minutos. Se registra la distancia recorrida cada 5 minutos de prueba. B) Gráfico muestra el tiempo en que los ratones recorren el centro de la caja cada 5 minutos de un total de 20 minutos. n= 8-9 por grupo. Datos corresponden al promedio \pm SEM. Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. *: 2mo v/s 18mo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Actividad 2.3. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN D1+.

En base a los resultados obtenidos en la prueba de consumo de etanol a distintas edades (Fig. 13), donde se observó una disminución sostenida a los 18 meses de edad con un BEC significativamente menor al comparar con el grupo de ratones de 2 meses, intentamos mostrar una causalidad a este efecto del envejecimiento. Nos preguntamos si esta disminución se podría revertir al sobreexpresar la subunidad $\alpha 1$ del GlyR específicamente en MSN D1+ del nAc en este grupo de animales. Por lo tanto, se indujo la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN D1+ del nAc a través de la inyección estereotáxica de partículas adenovirales de AAV-DIO-GlyR $\alpha 1$ -IRES-mCitrine en ratones D1 Cre de 18 meses de edad. Finalmente, se revisaron sitios de inyección para corroborar la presencia del reportero.

En la Figura 16A se observa que, tanto el grupo de ratones en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR ($\alpha 1$ GlyR AAV), como el grupo control (Empty AAV), consumieron etanol de manera muy similar durante toda la prueba ($F(3,18) = 1.056$; $p = 0.3922$, Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. $n = 4$ por grupo). Como control de esta prueba, se midió el consumo de agua durante 2 horas también en la fase oscura del día (Figura 16C), y se observó que no existieron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones. El grupo $\alpha 1$ GlyR AAV consumió en promedio 13.3 ± 8.6 gramos de agua por kilogramo de

peso y el grupo control consumió 19.1 ± 7.1 g/kg ($t(6) = 1.044$, $p = 0.3369$; prueba de t de Student no pareada, $n = 4$ por grupo).

Finalmente, a los ratones se le extrajo una muestra sanguínea luego del cuarto día de consumo. La Figura 16B muestra la concentración de etanol en sangre (BEC) la que entregó valores que concuerdan con lo encontrado en la prueba DID. Los ratones $\alpha 1$ GlyR AAV obtuvieron en promedio 81.08 mg/dl de etanol en sangre, mientras que los de ratones Empty AAV 85.86 mg/dl posterior al cuarto día de consumo ($t(6) = 0.07326$; $p = 0.9440$; prueba de t de Student no pareada, $n = 4$ por grupo).

A pesar de los anterior, y considerando que el número de animales es insuficiente para obtener una conclusión definitiva respecto del efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN D1+ del nAc en el aumento del consumo de etanol en este grupo de animales, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, revelaron que la inducción de la expresión de una subunidad $\alpha 1$ insensible al etanol en MSN D1+ del nAc, fue incapaz de afectar a la sensibilidad al etanol en GlyRs o afectar al consumo de etanol en ratones. Por otra parte, el uso de un AAV que transdujo una subunidad $\alpha 1$ WT del GlyR en todas las MSNs del nAc de los ratones, esto sí provocó cambios en la ingesta de etanol en la prueba DID y en la concentración de etanol en sangre (Araya et al., 2022). Y aunque estos resultados fueron obtenidos en un grupo de ratones más jóvenes, consideramos que es probable que la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR solo en la MSNs D1+ en el nAc no sea suficiente para generar cambios en el

comportamiento asociado al consumo de etanol, por lo que se decidió sobreexpresar esta misma subunidad globalmente, es decir, en todo el nAc.

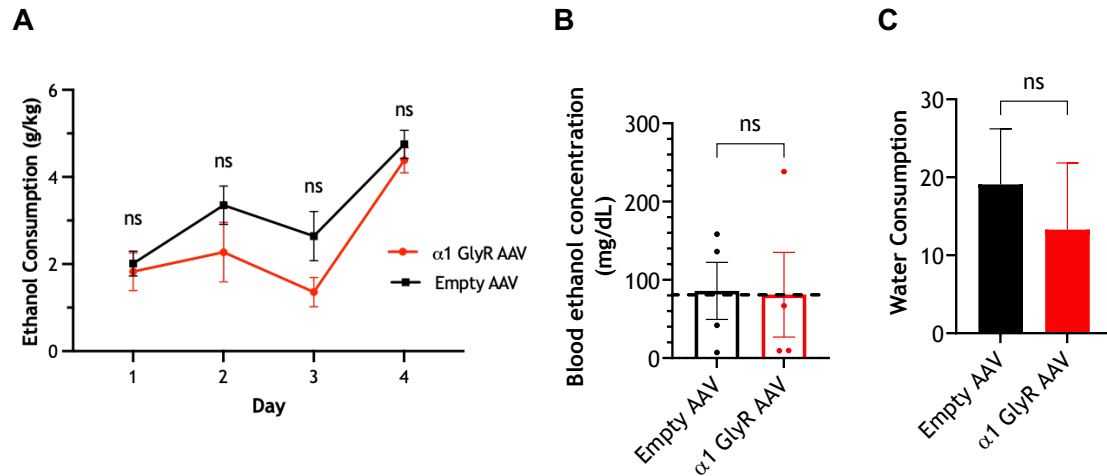


Figura 16. Efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN D1+ del nAc en el consumo de etanol en ratones de 18 meses. A) El gráfico muestra el consumo de etanol en gramos por kilogramo de peso (g/kg) en ratones donde se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR (curva roja) y de ratones inyectados con AAV control (curva negra). B) Concentración de etanol en sangre tras el consumo de etanol el cuarto día de la prueba C) El gráfico muestra el consumo de agua en gramos por kilogramo de peso (g/kg). Los datos corresponden al promedio \pm SEM, Two-way ANOVA para A y prueba t de Student no apareada para B y C; ns: no significativo; n= 4 por grupo.

Actividad 2.3. Determinación del consumo de etanol con la prueba Drinking in the dark (DID) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

Para esta actividad se llevó a cabo la sobreexpresión global de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR MSNs del nAc a través de la inyección estereotáxica de partículas adenovirales de AAV-mDlx-GlyR $\alpha 1$ WT-GFP en ratones WT de 18 meses de edad. Posterior al experimento, se revisaron sitios de inyección para corroborar la presencia del reportero.

En la Figura 17A se observa que, al igual que en el experimento anterior, tanto el grupo de ratones en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR ($\alpha 1$ GlyR AAV), como el grupo control (Empty AAV), consumieron etanol de manera muy similar durante toda la prueba ($F(3,63) = 0.4508$; $p = 0.7176$, Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test. $n = 12$ $\alpha 1$ GlyR AAV, $n = 11$ Empty AAV). Se midió el consumo de agua como control de esta prueba (Figura 17C), se observó que no existen diferencias significativas entre ambos grupos de ratones. El grupo $\alpha 1$ GlyR AAV consumió en promedio 20.5 ± 3.3 gramos de agua por kilogramo de peso y el grupo Empty AAV consumió 15.0 ± 4.6 g/kg ($t(17) = 1.001$, $p = 0.3308$; prueba de t de Student no pareada, $n = 12$ $\alpha 1$ GlyR AAV, $n = 11$ Empty AAV).

Luego del cuarto día, a los ratones se les extrajo una muestra sanguínea para medir los niveles de etanol en sangre. La Figura 17B muestra la BEC, que entregó valores que concuerdan con lo encontrado en la prueba DID. Los ratones $\alpha 1$ GlyR AAV obtuvieron en promedio 117.7 ± 18 mg/dl de etanol en sangre, mientras que

los ratones control 75.2 ± 15.7 mg/dl, ($t(21) = 1.758$; $p = 0.5716$; prueba de t de Student no pareada, $n = 12$ $\alpha 1$ GlyR AAV, $n = 11$ Empty AAV). Si bien los valores del BEC son mayores en los ratones en que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR, esto no es estadísticamente significativo.

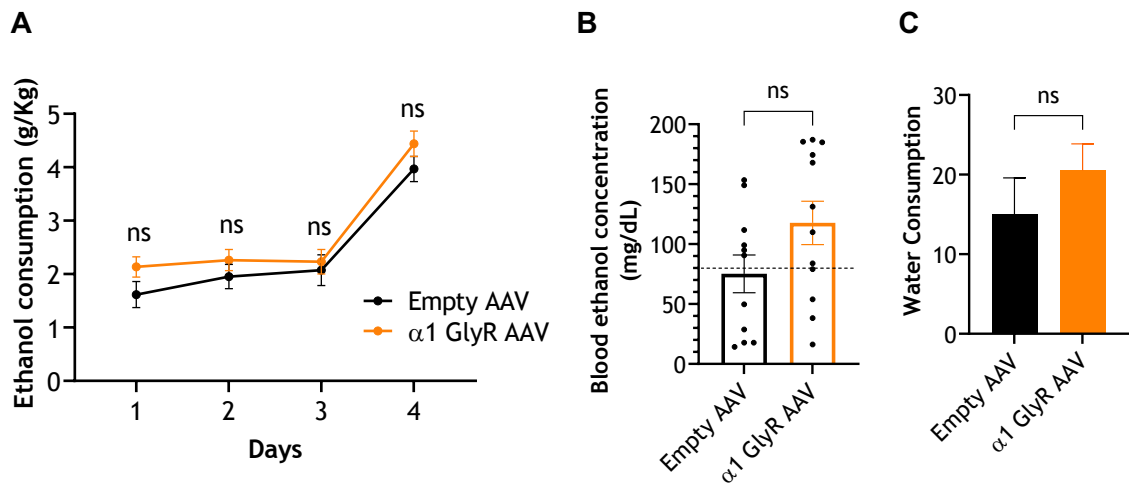


Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en el consumo de etanol en ratones de 18 meses. A) El gráfico muestra el consumo de etanol en gramos por kilogramo de peso (g/kg) en ratones donde se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en todo el nAc (curva naranja) y de ratones inyectados con AAV control (curva negra). B) Concentración de etanol en sangre tras el consumo de etanol el cuarto día de la prueba C) El gráfico muestra el consumo de agua en gramos por kilogramo de peso (g/kg). Los datos corresponden al promedio \pm SEM, Two-way ANOVA para A y prueba t de Student no apareada para B y C; $n = 12$ $\alpha 1$ GlyR AAV, $n = 11$ Empty AAV.

Actividad 2.4. Evaluación de la actividad motora y comportamiento de tipo ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones envejecidos (18 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

De la misma manera a la actividad anterior, previo a la prueba de DID en los ratones WT de 18 meses inyectados por estereotaxia, se realizó el test OF.

En esta ocasión, en relación con la actividad motora (Figura 18A), durante los primeros 5 minutos de la prueba, los ratones que sobreexpresaron la subunidad $\alpha 1$ del GlyR ($\alpha 1$ GlyR) recorren una distancia considerablemente menor (1333 ± 166 cm) en comparación al control (Empty AAV) (2353 ± 130 cm). Sin embargo, ya a los 10 minutos de la prueba esta diferencia desaparece y en el último intervalo los grupos $\alpha 1$ GlyR y Empty AAV recorren una distancia muy similar de 1465 ± 110 y 1496 ± 181 cm, respectivamente ($F(3,48) = 8.224$; $p = 0.0002$ Two-way ANOVA; $n = 11$ $\alpha 1$ GlyR y $n = 7$ Empty AAV).

En el caso del análisis de la trayectoria, en la Figura 17B se observa que tanto los ratones $\alpha 1$ AAV GlyR como los Empty AAV pasan un tiempo muy similar en el centro de la caja durante toda la prueba ($F(3,48) = 5924$; $p = 0.6230$ Two-way ANOVA; $n = 11$ $\alpha 1$ GlyR y $n = 7$ Empty AAV). En consecuencia, es posible sostener de idea de que por un lado, la inyección estereotóxica no provocó daños, y por otro, que no hubo diferencias en la presencia de comportamiento de tipo ansioso ni tampoco en las características del comportamiento exploratorio entre los ratones de 18 meses que sobreexpresaron la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc y el grupo control.

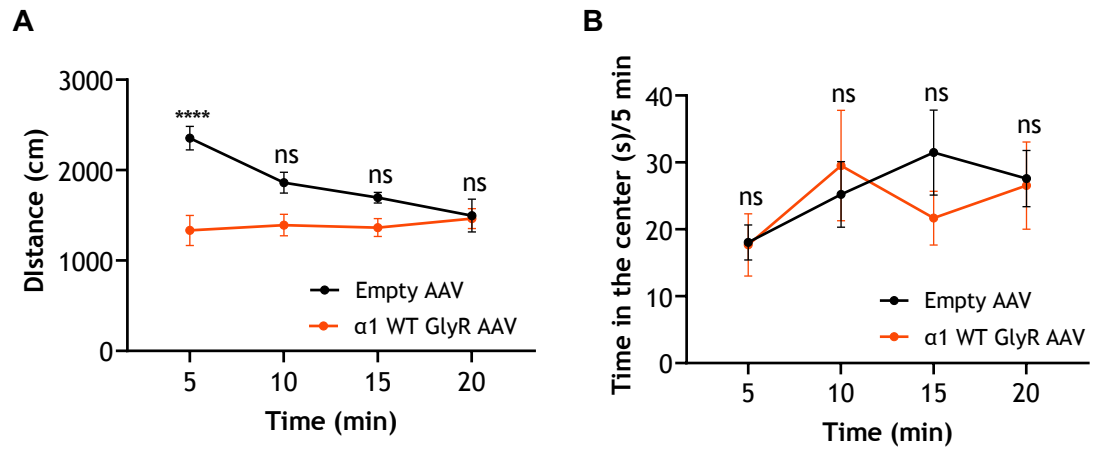


Figura 18. Análisis del comportamiento exploratorio y de tipo ansioso después de la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en ratones de 18 meses de edad. A) Ensayo de open field en condiciones basales. Ratones WT de 18 mo pueden explorar un ambiente abierto nuevo durante 20 minutos. Se registra la distancia recorrida cada 5 minutos de prueba. B) Gráfico muestra el tiempo en que los ratones recorren el centro de la caja cada 5 minutos de un total de 20 minutos. $n = 11$ GlyR $\alpha 1$ y $n = 7$ Empty AAV. Datos corresponden al promedio \pm SEM. Two-way ANOVA y prueba de comparación múltiple de Bonferroni. **** $p = 0.0001$.

Actividad 2.5. Determinación de la preferencia por etanol con la prueba Conditioned place preference (CPP) en ratones de los distintos grupos etarios de estudio.

Se utilizó el experimento de preferencia condicionada a un lugar (CPP, del inglés conditioned place preference). En la Figura 19A se observa el gráfico que muestra que previo a las sesiones de condicionamiento, los ratones de 2, 6, 12, y 18 meses de edad no tienen preferencia por un lugar y pasan la misma cantidad de tiempo en ambas cámaras de condicionamiento. Luego de las 16 sesiones de condicionamiento (Figura 19B), la prueba final de 30 minutos determinó que solo los ratones de 2 meses prefieren el lugar asociado a etanol ($F(7,51) = 2.121$; $p=0.0578$; Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test, $*p<0.05$, $n=12$ 2 mo, $n=12$ 6mo, $n=6$ 12 mo, $n=5$ 18 mo).

Los datos obtenidos en esta prueba permitieron determinar que a partir de los 6 meses los ratones dejan de condicionarse por etanol, por lo que se decidió sobreexpresar la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc en este grupo con la finalidad de observar si era posible revertir este resultado.

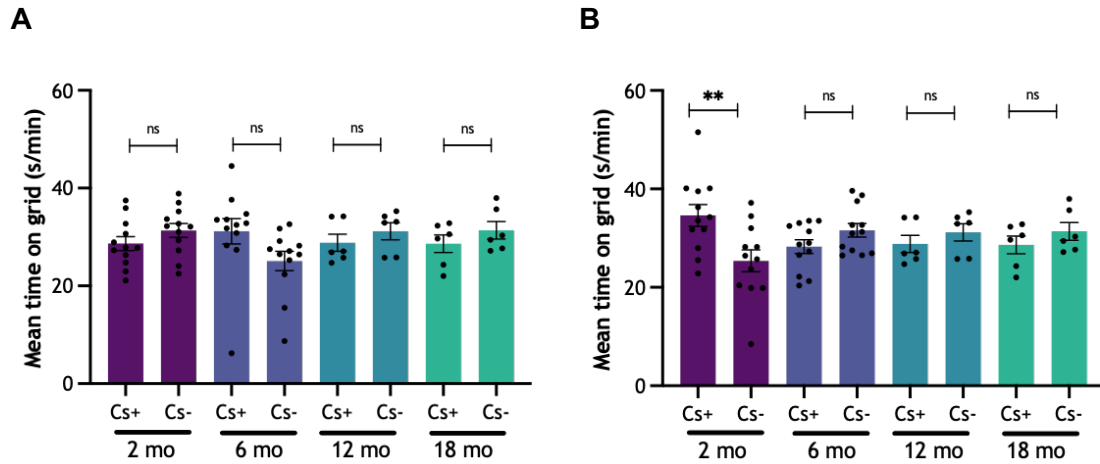


Figura 19. Condicionamiento a etanol solo es detectable a los 2 meses. A) Tiempo de preferencia en cada cámara de CPP, previo a las 16 sesiones de condicionamiento a 2, 6, 12 y 18 meses. Se grafican los segundos en un minuto de prueba. B) Gráfico muestra el tiempo de preferencia luego de las 16 sesiones de condicionamiento. Solo ratones WT de 2 meses se condicionaron a preferir el lado asociado a etanol. n= 12 por grupo. Datos corresponden al promedio \pm SEM. Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test; ** $p < 0.01$.

Actividad 2.6. Determinación de la preferencia por etanol con la prueba Conditioned place preference (CPP) en ratones adultos jóvenes (6 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

La sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc se hizo a través de la inyección estereotáxica del virus AAV-mDlx-GlyR $\alpha 1$ WT-GFP, como control se utilizó AAV-mDlx-GFP, luego de 3 semanas se llevó a cabo la prueba y finalmente se revisaron sitios de inyección para corroborar la presencia del reportero. En la Figura 20A se observa el gráfico que muestra que previo a las sesiones de condicionamiento, ninguno de los dos grupos de ratones de 6 meses de edad tuvo preferencia por un lugar y pasaron la misma cantidad de tiempo en ambas cámaras de condicionamiento. Luego de las 16 sesiones de condicionamiento (Figura 20B), la prueba final de 30 minutos determinó que la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc fue capaz de generar el condicionamiento por etanol, de manera similar a lo encontrado en los ratones de 2 meses de edad de experimento anterior ($F(3, 24) = 4.307$; $p=0.0140$; Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test; $n=10$ ratones por grupo).

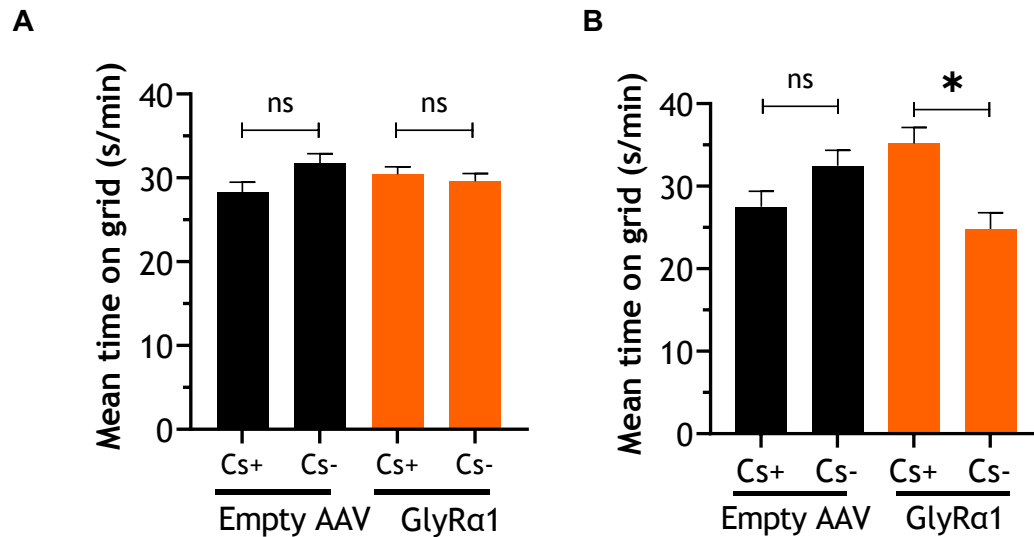


Figura 20. Recuperación de condicionamiento a etanol en ratones de 6 meses después de sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc. A) Gráfico muestra el tiempo de preferencia a cada cámara de CPP, previo a las 16 sesiones de condicionamiento. Se grafican los segundos en un minuto de prueba. B) Gráfico muestra el tiempo de preferencia luego de las 16 sesiones de condicionamiento. Ratones que sobreexpresaron la subunidad $\alpha 1$ del GlyR se condicionaron a preferir el lado asociado a etanol. $n = 10$ por grupo. Datos corresponden al promedio \pm SEM. Two-way ANOVA y Bonferroni *post hoc* test; $*p < 0.05$.

Actividad 2.7. Evaluación de la actividad motora y comportamiento ansioso mediante la prueba Open Field (OF) en ratones adultos jóvenes (6 mo) en los que se sobreexpresó la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc.

Para evaluar si la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc tenía algún efecto en la actividad motora o en el comportamiento de tipo ansioso en los ratones WT de 6 meses que se iban a someter a la prueba de CPP, se les realizó previamente el test OF.

La Figura 21A muestra que los ratones que sobreexpresaron la subunidad $\alpha 1$ del GlyR ($\alpha 1$ GlyR) realizan la prueba de manera similar a los ratones control (Empty AAV). Los ratones $\alpha 1$ GlyR recorren 1893 ± 225 cm en los primeros 5 minutos y 1860 ± 263 cm los últimos 5 minutos de la prueba, los ratones Empty AAV recorrieron 1640 ± 135 cm los primeros 5 minutos y 1253 ± 198 cm los últimos 5 minutos de prueba ($F_{3,48} = 0.8312$; $p = 0.4833$ Two-way ANOVA; $n = 11$ $\alpha 1$ GlyR y $n = 7$ Empty AAV). El mismo comportamiento se observa en el análisis de la trayectoria (Figura 20B) donde se ve que tanto los ratones con AAV GlyR $\alpha 1$ como los Empty AAV pasan por las esquinas y por el centro de la caja. Los registros fueron de 12.4 ± 2 y 17.8 ± 3 segundos en los primeros 5 minutos de prueba para el ratón $\alpha 1$ GlyR y el Empty AAV, respectivamente ($F_{3,48} = 2.536$; $p = 0.0677$ Two-way ANOVA; $n = 11$ $\alpha 1$ GlyR y $n = 7$ Empty AAV). Por lo que se puede afirmar que los ratones de 6 meses que sobreexpresaron la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSNs del nAc no presentaron comportamientos de tipo ansiosos, exploraron un ambiente nuevo al igual de cómo lo realizan los ratones controles

de su misma edad y además la inyección estereotáxica no provocó alguna alteración neurológica o motora detectable.

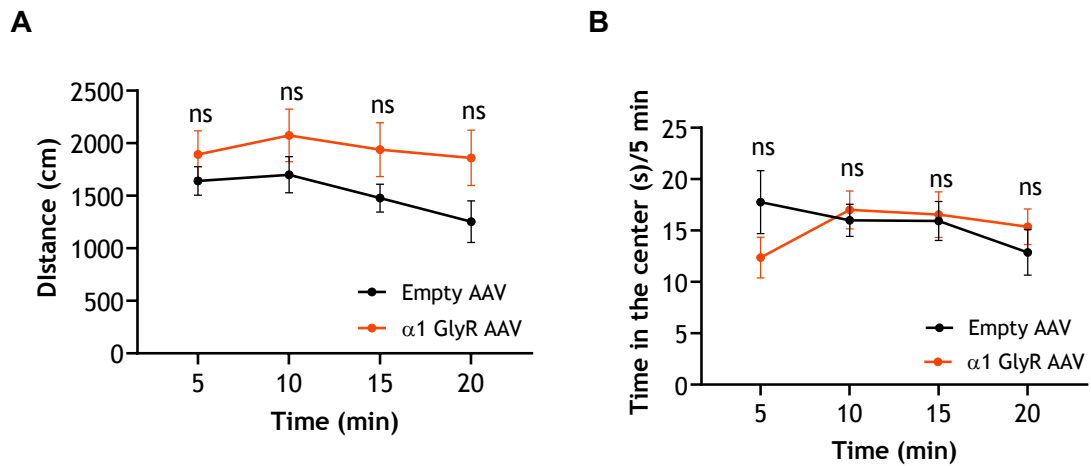


Figura 21. Análisis del comportamiento exploratorio y de tipo ansioso después de sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en MSN del nAc en ratones de 6 meses de edad. A) Ensayo de open field en condiciones basales. Ratones pueden explorar un ambiente abierto nuevo durante 20 minutos. Se registra la distancia recorrida cada 5 minutos de prueba. La distancia recorrida no varía significativamente entre los ratones que sobreexpresan la subunidad $\alpha 1$ del GlyR frente al grupo control. B) Gráfico muestra el tiempo en que los ratones recorren el centro de la caja cada 5 minutos de un total de 20 minutos. $n = 11$ $\alpha 1$ GlyR y $n = 7$ Empty AAV. Datos corresponden al promedio \pm SEM. Two-way ANOVA y prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis examinó la expresión y función de los GlyRs en el nAc de ratones a través del envejecimiento y su impacto en el consumo y preferencia por el EtOH. Específicamente, se analizaron: 1) los cambios en la expresión de las subunidades de GlyRs y la actividad neuronal en respuesta a la potenciación con etanol. Además, se abordaron, 2) los cambios en el consumo y susceptibilidad al condicionamiento a EtOH, utilizando la prueba DID y CPP, respectivamente. Finalmente, se realizó 4) la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en el nAc a modo de rescate y su efecto en los comportamientos asociados a EtOH antes mencionados.

A continuación, se discutirán con más detalle los principales resultados obtenidos:

Los receptores de Glicina se expresan durante todo el proceso de envejecimiento

Los resultados de esta tesis muestran que los GlyRs se expresan en el nAc de ratones envejecidos, lo que respalda la hipótesis de que estos receptores están presentes en edades avanzadas. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que los estudios que investigan cómo cambia la expresión de los GlyRs en el nAc durante el envejecimiento son prácticamente inexistentes. Aunque se han estudiado áreas como la retina (Sánchez-Chávez et al., 2017), el tronco encefálico (Kungel & Friauf, 1997), la corteza (Becker et al., 1993) y la médula

espinal (Watanabe & Akagi, 1995) estos estudios se han enfocado solo en las primeras etapas del desarrollo y no cuentan con mas literatura que repliquen sus resultados. Adicionalmente, existen investigaciones previas investigaciones previas se han centrado en etapas tardías de la adolescencia, es decir alrededor de los 2 meses de edad (Avila, Nguyen, et al., 2013; Avila, Vidal, et al., 2013; Malosio et al., 1991). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado en ratas, lo que limita la generalización de los hallazgos a otras especies y contextos.

Nuestros resultados, obtenidos a través del análisis de actividad neuronal mediante el estudio de la dinámica de calcio, mostraron que al potenciar el GlyR del nAc con EtOH había una disminución en la activación neuronal (indicada por la disminución de dF/F) a los 2 meses de edad. Sin embargo, a los 6 y 12 meses de edad el efecto de EtOH fue significativamente menor (Figura 7). Por otro lado, el ensayo de inhibición de los $GABA_A$ R, utilizando bicuculina, nos permitió descartar que estos cambios durante el envejecimiento estuvieran relacionados con estos receptores (Figura 8). Estos hallazgos, junto con resultados previos de nuestro laboratorio, en los que se utilizó STN, un inhibidor del GlyR, y se observó una disminución en el aumento de dF/F dependiente de la edad, nos permiten afirmar que la expresión de los GlyRs disminuye con la edad y/o que cambia su expresión a subunidades menos sensibles a etanol, y que ese efecto no es atribuible a los $GABA_A$ R. Esto podría tener importantes implicancias para la

función del nAc durante el envejecimiento, algunas de las cuales serán abordadas más adelante.

El envejecimiento reduce la expresión de los receptores de Glicina en el núcleo accumbens

En el presente trabajo, utilizando RT-qPCR, se detectó por primera vez la expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y β del GlyR tanto en MSNs D1+ como en D1- del nAc de ratón a distintas edades. En términos de la presencia de las subunidades en el cerebro, estos datos están en línea con otros autores que las han descrito en ratas adolescentes y jóvenes (Racca et al., 1998; Sato et al., 1991, 1992). Sin embargo, estos trabajos han descrito una expresión predominante de la subunidad $\alpha 2$ del GlyR en múltiples áreas cerebrales, incluyendo el nAc (Jonsson et al., 2012b; Sato et al., 1991). Estos resultados contrastan con nuestros hallazgos, en los que se observa una baja expresión de esta subunidad. A pesar de lo anterior, esta diferencia es previsible, dado que los resultados fueron obtenidos en un modelo distinto al nuestro. Si bien existen similitudes entre los modelos de rata y ratón, los resultados obtenidos no siempre son comprobables, dado que son especies que se desarrollan a tiempos diferentes. Por ejemplo, una rata de 2 meses se encuentra en la etapa de adolescencia temprana, y su equivalente de edad en años humanos es de 6 años (Sengupta, 2013); mientras que, un ratón de 2 meses corresponde a una etapa de adolescencia tardía y equivale a 16 años humanos (Dutta & Sengupta, 2016;

Flurkey et al., 2007). Esta diferencia es importante cuando se trata de evaluar la expresión de las subunidades del GlyR, dado que ha sido descrito que las subunidades $\alpha 2$ y β están ampliamente expresadas en el cerebro durante la etapa embrionaria, participando en su desarrollo. Después del nacimiento, la subunidad $\alpha 2$ disminuye lentamente su expresión, restringiéndose a algunas áreas, como hipocampo, corteza, tálamo, entre otras (Avila, Nguyen, et al., 2013; Avila, Vidal, et al., 2013). Adicionalmente, las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 3$, comenzarían a expresarse en el periodo postnatal; sin embargo, a los 15 días de vida, la expresión cerebral de estas subunidades a nivel de proteína aun no es detectable (Avila, Nguyen, et al., 2013). De acuerdo con lo anteriormente descrito, es previsible que en ratas de 2 meses (60 días) de edad, que se encuentran en una etapa del desarrollo más temprana que la del ratón, predomine la expresión de la subunidad $\alpha 2$, sobre $\alpha 1$ y $\alpha 3$, apoyando nuestros resultados que indican que en la adolescencia-adulthood, esta no sería la subunidad mayormente expresada, al menos en el nAc.

A pesar de la limitada evidencia existente, Förster et al. (2017), describieron en ratones C57BL/6J (modelo igual al utilizado en esta tesis) de 1 a 4 meses de edad, no sólo la presencia de las subunidades $\alpha 1-3$ y β en el nAc; sino que también una mayor expresión de la subunidad $\alpha 1$ en esta región, lo cual está en línea con lo encontrado en esta tesis (Förster et al., 2017). Además, los datos de los autores describen un nivel levemente más alto ($p < 0.05$) de la subunidad $\alpha 1$ en MSNs D1+ en comparación con MSNs D1-, a diferencia de lo encontrado

en nuestros análisis, donde esa diferencia es observable sólo a los 6 meses de edad.

La subunidad β del GlyR se coensambla con las subunidades α en diversas estequiometrías (Durisic et al., 2012; Muñoz et al., 2021). La subunidad β dirige al receptor a las sinapsis mediante una interacción directa con la proteína de andamiaje gefirina, esencial para la localización y estabilización de los receptores en la membrana postsináptica (Burgos et al., 2016b) (Figura 2).

Los estudios han demostrado que el mRNA de esta subunidad se expresa ampliamente en todo el SNC, incluyendo la médula espinal y el cerebro (Malosio et al., 1991; Wiessler et al., 2024). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha investigado ampliamente el papel de esta subunidad en el contexto del envejecimiento.

En nuestro estudio, realizamos un análisis de la expresión de mRNA y encontramos que la expresión de β disminuye a partir de los 6 meses en las MSN D1+ del nAc, mientras que en las MSN D1- esta disminución se observa más tardíamente, a los 18 meses de edad. La disminución de la subunidad β implicaría el cambio conformacional del GlyR durante el envejecimiento, de una configuración heteromérica a una más de carácter homomérica, es decir, una disminución sináptica del receptor a lo largo del tiempo.

En línea con lo anterior, la gefirina es una proteína que ancla, agrupa y estabiliza los GlyRs y GABA_ARs en las sinapsis inhibitorias del cerebro de los mamíferos (Choi & Ko, 2015; Sassoè-Pognetto & Fritschy, 2000). Las funciones de gefirina

descritas en la literatura incluyen un rol fundamental en la maduración y el mantenimiento de las sinapsis, actuando como un sensor que ajusta la transmisión sináptica en respuesta a cambios en la actividad de la red global. Además, se ha vinculado a ciertas formas de plasticidad sináptica (Choi & Ko, 2015; Petrini et al., 2014).

Se ha descrito que la expresión de gefirina es amplia en el cerebro, sin embargo, los estudios que abordan lo que sucede con gefirina durante el envejecimiento son casi inexistentes. En esta tesis, a través de ensayos de IHC y análisis de la expresión de mRNA, encontramos que la expresión disminuye de manera importante a partir de los 6 meses de edad ($p < 0.01$), tanto en MSN D1+, como MSN D1- del nAc. Otros estudios que han investigado la expresión de gefirina durante el envejecimiento, han incluido otras áreas como el núcleo coclear dorsal y la corteza visual, reportando tanto un aumento como una disminución, respectivamente (Pinto et al., 2010; H. Wang et al., 2009). A pesar de lo anterior, hasta la fecha no hemos encontrado estudios que incluyan al nAc.

Por otro lado, la disminución de la expresión de gefirina ha sido descrita previamente, y se ha asociado a patologías neuropsiquiátricas, incluyendo bipolaridad, trastornos del ánimo como la depresión (Choi & Ko, 2015), y enfermedades neurodegenerativas como la EA (Agarwal et al., 2008; Choi & Ko, 2015; Hales et al., 2013). De manera interesante, algunos de estos resultados han sido producto de análisis hechos en el nAc (Fernández-Pérez et al., 2020; Heshmati et al., 2020b), lo que resulta relevante, considerando la alta prevalencia

de síntomas de anhedonia y enfermedades neurodegenerativas, en particular la EA, que presenta la población de adultos mayores (Andreas et al., 2017; Servicio Nacional del Adulto Mayor. SENAMA, 2021).

En otras palabras, no solo existe una disminución de la expresión de las subunidades del GlyR en el nAc durante el envejecimiento, sino también cambios en la proporción en la que estas se expresan. Por ejemplo, si consideramos las subunidades α : $\alpha 1$ disminuiría de manera progresiva durante el envejecimiento (MSN D1+); aun así, es la que se expresa mayormente durante toda la vida. Por otro lado, $\alpha 2$ muestra muy poca disminución y $\alpha 3$ se mantendría estable, por lo que proporcionalmente ambas aumentarían su expresión durante el envejecimiento. La subunidad β del GlyR y gefirina, que interactúan para posicionar al receptor en la hendidura sináptica, también disminuyen a partir de los 6 meses, aumentando la proporción de conformaciones homoméricas, de expresión extrasináptica.

Este patrón de cambio en las subunidades del GlyR en subpoblaciones de MSNs del nAc sugiere evidentemente cambios diferenciales en la transmisión glicinérgica. En este sentido, datos de electrofisiología de nuestro laboratorio, en proceso de publicación, muestran que la sensibilidad del GlyR a glicina disminuye entre los 2 y 12 meses de edad, con una EC_{50} de 41.9 ± 4 y 90.2 ± 11 μM de glicina respectivamente, las cuales son muy similares a las descritas para las conformaciones de $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$, que bordean en promedio los 43 μM y la conformación $\alpha 2$, que es de 86 μM (Muñoz et al., 2021). Esto está en línea con

nuestros resultados, donde los 12 meses de edad se muestra una disminución en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ y β en las MSN D1+, y un aumento relativo de la subunidad $\alpha 2$. Adicionalmente, las modificaciones en la conformación del GlyR implican variaciones en sus propiedades en relación con el EtOH, incluyendo una disminución en la sensibilidad a este (dato no publicado del laboratorio, mencionado previamente en la introducción). Estos hallazgos son coherentes con los resultados obtenidos, donde se observó que, a los 2 meses de edad, las MSNs del nAc presentaban una mayor probabilidad de expresión de GlyRs con las conformaciones $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$ en comparación con los 12 meses. A esta edad, la potenciación neta por EtOH sería menor debido a la disminución de estas configuraciones del receptor, resultando en un aumento relativo de la conformación $\alpha 2$ homomérica (Figura 22).

En resumen, nuestros datos indican que el envejecimiento induce cambios significativos en la expresión de las subunidades del GlyR y de gefirina en las neuronas D1+ del nAc, lo que sugiere una alteración en la transmisión glicinérgica sináptica y extrasináptica. Estas modificaciones en la composición y la localización del GlyR pueden tener implicaciones funcionales importantes, incluyendo una disminución en la sensibilidad al EtOH. A continuación, abordaremos cómo estos cambios en la expresión de GlyR se relacionan con las alteraciones en el comportamiento de consumo y preferencia de EtOH en diferentes etapas del envejecimiento.

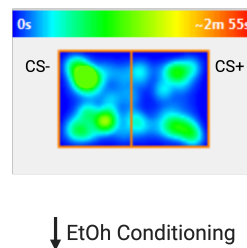
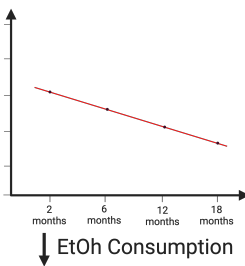
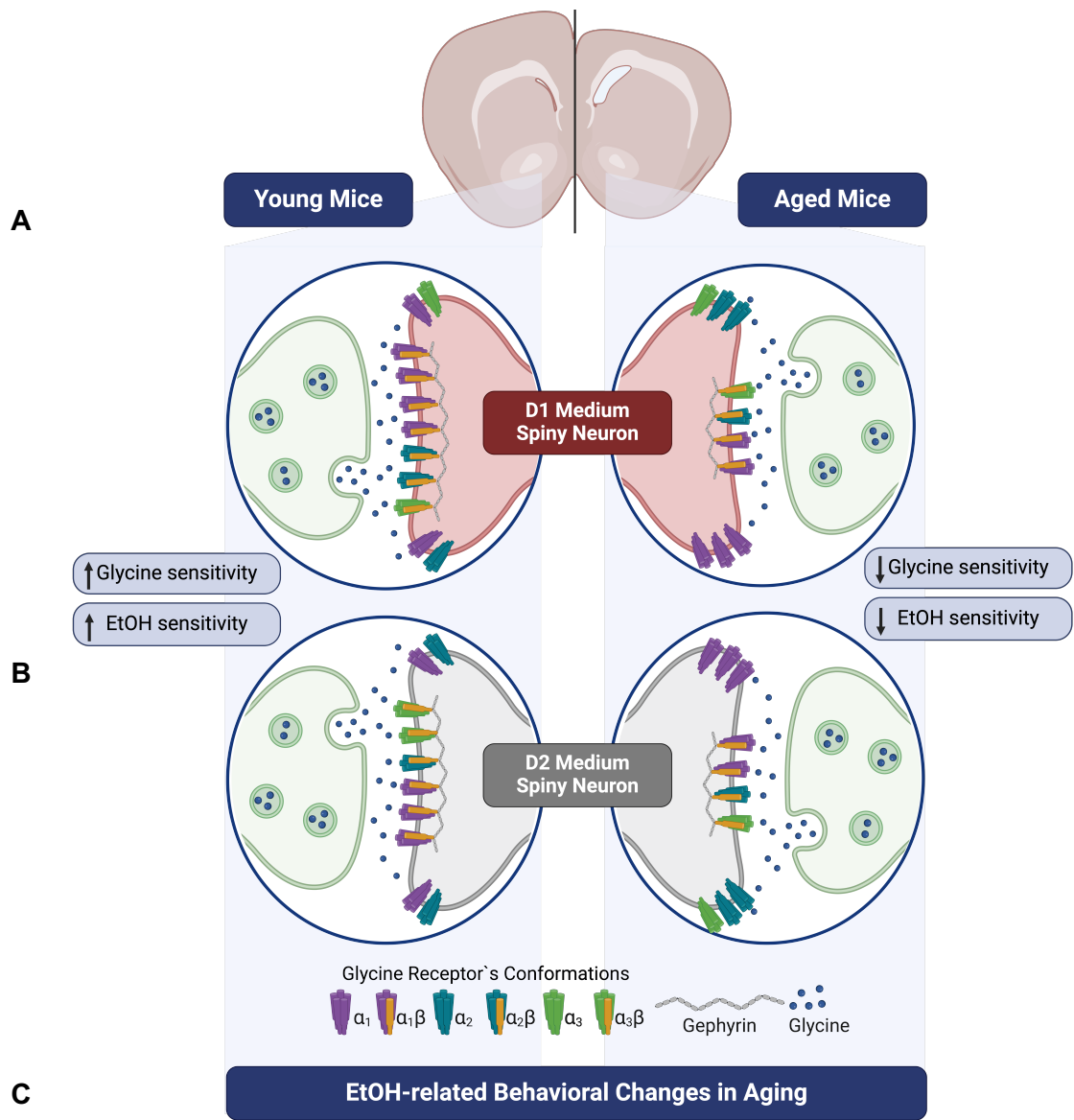


Figura 22. Efecto del envejecimiento en la expresión de GlyRs en MSNs del nAc y en comportamiento asociados al consumo de etanol de ratones

Arriba a la izquierda se muestra ampliación de una sección coronal de cerebro que contiene el NAc en ratón joven. En A se representa una sinapsis glicinérgica en las MSNs D1. En ratones jóvenes, hay predominancia en la expresión de GlyRs sinápticos $\alpha 1\beta$. Las conformaciones predominantes de estos receptores presentan una alta sensibilidad tanto a glicina como al EtOH. En ratones envejecidos, se observa disminución de GlyRs sinápticos, que afecta en mayor grado a $\alpha 1\beta$, junto con la disminución de la subunidad β y gefirina. En B se representa una sinapsis glicinérgica en las MSNs D2, estas presentan menor una expresión de conformaciones del GlyR sensibles tanto a glicina como a EtOH que las D1. Durante el proceso de envejecimiento, se observa una disminución tanto de subunidad β , como de gefirina. En C cambios conductuales asociados al envejecimiento.

El envejecimiento reduce el consumo de etanol y la sobreexpresión de GlyR en el Núcleo Accumbens no produce cambios en su consumo

Analizamos el consumo de EtOH a distintas edades mediante la prueba DID, observamos que este disminuye progresivamente durante el envejecimiento, al igual que la concentración de BEC en cada uno de los grupos. Según las directrices del NIAAA, los animales de 2, 6 y 12 meses de edad muestran un consumo excesivo de alcohol al alcanzar un BEC promedio superior a 80 mg/dL (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2023). Nuestros hallazgos son consistentes con estudios previos que describen una disminución en el consumo de alcohol tanto en modelos en roedores como en humanos a medida que se envejece (Matthews, Schneider, et al., 2019; R. C. Molander et al., 2019; Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol. SENDA, 2018).

Si bien la tendencia general de disminución en el consumo de EtOH observada en nuestros resultados, es crucial considerar que estudios poblacionales en humanos indican cambios en el patrón de consumo en los adultos mayores. En estas poblaciones, aun cuando la reducción es en el consumo total, se observa un aumento en la frecuencia de consumo sin alcanzar niveles excesivos (Lewis et al., 2018; R. Molander et al., 2010), o, en algunos casos, un mantenimiento del consumo excesivo a lo largo del tiempo (Breslow et al., 2017b; B. H. Han et al., 2017b). Esta dinámica de consumo puede estar influenciada por varios factores, incluyendo cambios en la fisiología y en el metabolismo del alcohol durante el

envejecimiento, así como variaciones en los contextos sociales y de comportamiento (Bonnechère et al., 2022; Dare et al., 2020; Immonen et al., 2011b; Milic et al., 2018; R. Molander et al., 2010; Q. Wang et al., 2022b).

En nuestro estudio, esta situación se refleja parcialmente en la dispersión de los datos observados en el BEC (Figura 13B), la cual aumentó conforme los ratones envejecen, alcanzando un promedio de 66.2 ± 18.1 mg/dL a los 18 meses donde se observa un grupo de animales con un BEC superior a los 80 mg/dL. Esta variabilidad sugiere que, aunque el consumo total de EtOH disminuye, algunos individuos continúan consumiendo alcohol en cantidades que resultan en niveles significativos de BEC, mientras que otros muestran una reducción más pronunciada en su ingesta.

Posterior a la prueba de consumo y a los resultados del análisis de la expresión del GlyR, a modo de poder recuperar la función perdida con el envejecimiento, decidimos sobreexpresar subunidad $\alpha 1$ específicamente en las MSN D1+ del nAc en ratones D1 Cre de 18 meses de edad, dado que esta era una subunidad del GlyR que se veía disminuida en estas neuronas y, que estos ratones mostraron tener el menor consumo de EtOH entre los grupos etarios estudiados. En estos experimentos no obtuvimos diferencias en el volumen de EtOH consumido ni en el BEC cuando comparamos con los ratones controles (Figura 16B). De manera similar, en el estudio de Araya *et al.*, la sobreexpresión de una subunidad $\alpha 1$ mutante, insensible al EtOH, en MSN D1+ del nAc, disminuyó la potenciación del

etanol en las MSNs D1+, pero no modificó consumo de EtOH de los ratones inyectados (Araya et al., 2022).

Estos resultados plantean una interrogante clave: ¿era esperable que la sobreexpresión de $\alpha 1$ revirtiera la reducción del consumo de EtOH inducida por el envejecimiento? Si bien los datos obtenidos en ratones de 6 meses sugieren que la subunidad $\alpha 1$ es esencial en el condicionamiento por etanol, la falta de efecto en el consumo de ratones de 18 meses indica que otros factores pueden estar modulando la respuesta al etanol en edades avanzadas.

En particular, la reorganización de la composición del GlyR con el envejecimiento podría haber alterado la funcionalidad de $\alpha 1$, afectando su interacción con otras subunidades y con proteínas de andamiaje sináptico como gefirina. Además, considerando que los cambios neurobiológicos asociados al envejecimiento afectan múltiples regiones cerebrales, es posible que la modulación de los GlyRs en un grupo específico de MSNs del nAc no sea suficiente para restaurar la sensibilidad al etanol en su totalidad.

Para evaluar esta posibilidad, se llevó a cabo la sobreexpresión global de $\alpha 1$ en el nAc de ratones de 18 meses. Sin embargo, tampoco se observaron diferencias significativas en el consumo de EtOH ni en el BEC respecto al grupo de control. No obstante, se observó una tendencia al aumento del BEC en los ratones que sobreexpresaron $\alpha 1$, alcanzando un promedio de 117.7 ± 18 mg/dL, superando el umbral de 80 mg/dL, lo que no se había registrado previamente en esta cohorte.

En el estudio de *Araya et al. (2022)*, la sobreexpresión de $\alpha 1$ en el nAc se realizó en ratones mutantes con una versión insensible al EtOH de esta subunidad. Esto resultó en un menor consumo de EtOH en comparación con los controles. Además, al evaluar la prueba de consumo, los autores describieron una reducción significativa en el grupo con sobreexpresión global, lo que sugiere que la manipulación simultánea de MSNs D1 y D2 puede ser más efectiva (*Araya et al., 2022*). Esta diferencia con nuestros resultados podría estar explicada por la edad de los animales estudiados. Mientras que *Araya et al.* utilizaron ratones de 45 a 60 días, nuestro estudio incluyó ratones de 18 meses, lo que implica diferencias en los cambios neurobiológicos inducidos por el envejecimiento. Finalmente, nuestros hallazgos sugieren que el envejecimiento provoca una disminución progresiva en el consumo de EtOH y en los niveles de BEC alcanzadas en los ratones, reflejando un patrón similar al observado en estudios humanos. La sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR, tanto en MSNs D1+ como globalmente en el nAc, no fue suficiente para revertir la reducción del consumo de EtOH en la vejez. Esto sugiere que los cambios neurobiológicos asociados al envejecimiento pueden influir en la modulación del consumo de alcohol, destacando la complejidad de los mecanismos subyacentes y la necesidad de explorar más a fondo la interacción entre distintos tipos de neuronas y sus receptores en el nAc durante el envejecimiento.

La sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyRs en el núcleo accumbens restaura el condicionamiento por etanol en ratones adultos jóvenes

La prueba de preferencia de lugar condicionada por el etanol o CPP nos permitió evaluar el condicionamiento por EtOH a distintas edades. Si bien no se han reportado antecedentes de este fenómeno durante el envejecimiento en la literatura, existe evidencia que compara la aversión condicionada al gusto, utilizando una inyección intraperitoneal de EtOH en ratas adolescentes y adultas. En estos estudios han mostrado que las ratas envejecidas son más sensibles a los efectos aversivos del EtOH que las ratas adolescentes (Anderson et al., 2010; Saalfield & Spear, 2016, 2019).

En nuestros experimentos, solo el grupo de 2 meses mostró una preferencia condicionada por el etanol, lo que sugiere una mayor susceptibilidad a sus efectos reforzantes en etapas tempranas de la vida. Se ha descrito que la administración intraperitoneal de etanol en animales envejecidos genera una menor activación del nAc, evidenciada por una disminución en la expresión de c-Fos (Saalfield & Spear, 2019). Esto es relevante, ya que la activación de GlyRs sinápticos regula la liberación de dopamina en el nAc, un neurotransmisor clave en el procesamiento de recompensas asociado al consumo de drogas de abuso (A. Molander & Söderpalm, 2005).

Si bien la reducción en la expresión de $\alpha 1$ podría explicar la menor respuesta al etanol en ratones envejecidos, otros mecanismos neurobiológicos podrían estar

involucrados. En particular, la disminución de la subunidad β y de gefirina podría afectar la estabilidad sináptica de los GlyRs, reduciendo su capacidad de modular la liberación de DA en respuesta al EtOH.

Para evaluar esta posibilidad, se realizó la sobreexpresión global de $\alpha 1$ en el nAc de ratones de 6 meses, lo que permitió restaurar el condicionamiento por EtOH, reproduciendo el comportamiento observado en ratones de 2 meses. Este hallazgo indica que la subunidad $\alpha 1$ es clave en la mediación de los efectos reforzantes del EtOH en el nAc y que su sobreexpresión puede restaurar la susceptibilidad al condicionamiento incluso en edades adultas.

Es importante mencionar que, como controles de los procedimientos realizados, tanto para las inyecciones estereotáxicas como para los efectos de EtOH, realizamos pruebas de OF, en las cuales no encontramos diferencias significativas entre los grupos etarios evaluados. Esto es relevante, ya que los animales se comportan de manera similar en condiciones controles, no tienen alteraciones locomotoras o comportamientos de tipo ansioso que podrían haber dado falsos cambios en las pruebas de consumo o condicionamiento. Por otro lado, con la medición del BEC en ratones inyectados se descartan posibles cambios por distinto metabolismo del EtOH en las distintas edades.

En resumen, nuestros hallazgos indican que el envejecimiento induce cambios significativos en la expresión y función de los GlyRs en el nAc, reflejados en la reducción de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β del GlyR, así como de la proteína de

anclaje gefirina en determinadas edades. Esta alteración en la transmisión glicinérgica podría contribuir a la disminución de la sensibilidad al etanol observada en los ratones envejecidos.

Estos cambios funcionales se correlacionan con la disminución del consumo y del condicionamiento por etanol a partir de los 6 meses de edad. Aunque la sobreexpresión de $\alpha 1$ en el nAc no logró restaurar el consumo de etanol en ratones de 18 meses, sí permitió recuperar la preferencia condicionada en ratones de 6 meses, lo que sugiere que esta subunidad es clave en los efectos reforzantes del alcohol. Sin embargo, la falta de efecto sobre el consumo de etanol en animales envejecidos sugiere que otros factores, como la reorganización sináptica de los GlyRs y su interacción con gefirina, pueden ser determinantes en la respuesta conductual al etanol.

Estos resultados tienen implicaciones relevantes para comprender cómo el envejecimiento afecta la regulación de la recompensa y la sensibilidad a sustancias adictivas. Además, abren nuevas interrogantes sobre la contribución de la reorganización sináptica de los GlyRs en la plasticidad neuronal del nAc y su relación con trastornos neuropsiquiátricos en la vejez. Estudios futuros podrían evaluar si la modulación simultánea de $\alpha 1$ y β , o la estabilización de gefirina, podría restaurar no solo la preferencia condicionada, sino también el consumo de etanol en ratones envejecidos.

CONCLUSIONES

Se establece como principales conclusiones obtenidas en esta tesis que:

- Los GlyRs están presentes en el nAc durante todo el envejecimiento, pero su expresión disminuye progresivamente con la edad, afectando principalmente a las MSN D1+.
- Las subunidades $\alpha 1$ y β presentan una reducción significativa con la edad, con un mayor impacto en las MSN D1+ en comparación con las MSN D1-.
- La disminución en la expresión de gefirina y la subunidad β durante el envejecimiento sugiere un cambio en la conformación de los GlyRs, favoreciendo configuraciones homoméricas y extrasinápticas, lo que podría alterar la transmisión inhibitoria en el nAc y reducir la sensibilidad al etanol.
- Se observó una disminución progresiva en el consumo de EtOH y en las concentraciones de etanol en sangre en ratones a medida que envejecen, reflejando patrones similares a los descritos en humanos.
- La sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en las MSN D1+ o de manera global en el nAc no logró aumentar el consumo de EtOH en ratones de 18 meses, lo que sugiere que otros mecanismos neurobiológicos pueden estar modulando la ingesta de alcohol en etapas avanzadas de la vida.
- Solo los ratones jóvenes (2 meses) mostraron condicionamiento por EtOH, lo que indica una mayor susceptibilidad a los efectos reforzantes del etanol en etapas tempranas de la vida.

- La sobreexpresión global de la subunidad $\alpha 1$ del GlyR en el nAc de ratones de 6 meses restauró el condicionamiento por etanol, sugiriendo que esta subunidad es fundamental para la mediación de los efectos recompensantes del alcohol en el nAc.
- Los hallazgos de esta tesis sugieren que la reorganización de los GlyRs y su interacción con proteínas de andamiaje como gefirina pueden desempeñar un papel clave en la regulación de la recompensa durante el envejecimiento, afectando tanto el consumo de etanol como su capacidad de generar refuerzo.

GLOSARIO

5-HT	: Serotonina
ac	: Comisura anterior (del inglés: anterior commissure)
aCSF	: Líquido céfalo raquídeo artificial
ADNc	: Ácido desoxiribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
BEC	: Concentración de etanol en sangre (del inglés: blood ethanol concentration)
CPF	: Corteza prefrontal
CPP	: Prueba de preferencia asociada a un lugar (del inglés: Conditioned Place Preference)
D1R	: Receptor de dopamina tipo 1
D2R	: Receptor de dopamina tipo 2
DA	: Dopamina
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DID	: Prueba de consumo de etanol (del inglés: Drinking in the dark)
EtOH	: Etanol
FACS	: Clasificación de Células Activada por Fluorescencia (del inglés: Fluorescence-activated cell sorting)
GABA _A R	: Receptores de GABA A
GECI	: Indicadores de calcio codificados genéticamente (del inglés: genetically encoded Calcium indicator)
GlyR	: Receptor de glicina
HC	: Hipocampo
IHC	: Inmunohistoquímica

LGIC	: Canales iónicos controlados por ligando
mARN	: ARN mensajero
MSN	: Neurona espinosa mediana (de inglés: Medium Spiny Neuron)
nAc	: Nucleus Accumbens
NIAAA	: National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
OF	: Prueba de campo abierto (del inglés: Open field assay)
PBS	: Tampón fosfato salino (del inglés: phosphate buffered saline)
PFA	: Paraformaldehído
SEM	: Error estándar de la media (del inglés: standard error of the mean)
SML	: Sistema mesolímbico
SNr	: Sustancia nigra pars reticulata
STN	: Estricnina
VP	: Núcleo Pálido ventral
VTA	: Área tegmental ventral
WT	: Animal silvestre (del inglés: Wild Type)

REFERENCIAS

- Ade, K. K., Wan, Y., Chen, M., Gloss, B., & Calakos, N. (2011). An improved BAC transgenic fluorescent reporter line for sensitive and specific identification of striatonigral medium spiny neurons. *Front Syst Neurosci.*, 8(5). <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00032>
- Adermark, L. (2011). Subregion-specific modulation of excitatory input and dopaminergic output in the striatum by tonically activated glycine and GABAA receptors. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(OCTOBER 2011), 85. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00085>
- Agarwal, S., Tannenberg, R. K., & Dodd, P. R. (2008). Reduced expression of the inhibitory synapse scaffolding protein gephyrin in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 14(3), 313–321. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-14305>
- Aguayo, L. G., Tapia, J. C., & Pancetti, F. C. (1996). Potentiation of the glycine-activated Cl⁻ current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279(3), 1116–1122.
- Aguayo, L. G., Van Zundert, B., Tapia, J. C., Carrasco, M. A., & Alvarez, F. J. (2004). Changes on the properties of glycine receptors during neuronal development. *Brain Research Reviews*, 47(1–3), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.06.007>
- Alcaro, A., Huber, R., & Panksepp, J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. In *Brain Research Reviews* (Vol. 56, Issue 2, pp. 283–321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.07.014>
- Anderson, R. I., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2010). Ethanol-Induced Conditioned Taste Aversion in Male Sprague-Dawley Rats: Impact of Age and Stress. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(12), 2106–2115. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2010.01307.X>
- Andreas, S., Schulz, H., Volkert, J., Dehoust, M., Sehner, S., Suling, A., Ausín, B., Canuto, A., Crawford, M., Da Ronch, C., Grassi, L., Hershkovitz, Y., Muñoz, M., Quirk, A., Rotenstein, O., Belé Santos-Olmo, A., Shalev, A., Strehle, J., Weber, K., ... Härtel, M. (2017). Prevalence of mental disorders in elderly people: the European MentDis_ICF65+ study. *British Journal of Psychiatry*, 210(2), 125–131. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.115.180463>
- Araya, A., Gallegos, S., Maldonado, A., Rivera-Meza, M., Chandra, R., Lobo, M. K., & Aguayo, L. G. (2022). Overexpression of wild type glycine alpha 1 subunit rescues ethanol sensitivity in accumbal receptors and reduces binge drinking in mice. *Neuropsychopharmacology* 2022 48:9, 48(9), 1367–1376. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01459-2>
- Avila, A., Nguyen, L., & Rigo, J.-M. (2013). Glycine receptors and brain development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(OCT). <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00184>
- Avila, A., Vidal, P. M., Dear, T. N., Harvey, R. J., Rigo, J. M., & Nguyen, L. (2013). Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Reports*, 4(4), 738–750. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.016>

- Azdad, K., Chàvez, M., Bishop, P. D., Wetzelaer, P., & Marescau, B. (2009). Homeostatic Plasticity of Striatal Neurons Intrinsic Excitability following Dopamine Depletion. *PLoS ONE*, 4(9), 6908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006908>
- Becker, C. M., Betz, H., & Schröder, H. (1993). Expression of inhibitory glycine receptors in postnatal rat cerebral cortex. *Brain Research*, 606(2), 220–226. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90988-Y](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90988-Y)
- Berry, A. S., Shah, V. D., Baker, S. L., Vogel, J. W., O'Neil, J. P., Janabi, M., Schwimmer, H. D., Marks, S. M., & Jagust, W. J. (2016). Aging Affects Dopaminergic Neural Mechanisms of Cognitive Flexibility. *The Journal of Neuroscience*, 36(50), 12559–12569. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0626-16.2016>
- Blazer, D. G., & Wu, L.-T. (2009). The Epidemiology of Substance Use and Disorders Among Middle Aged and Elderly Community Adults: National Survey on Drug Use and Health. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 17(3), 237–245. <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e318190b8ef>
- Bonnechère, B., Samadoulougou, S., Cisse, K., Tassebedo, S., Kouanda, S., & Kirakoya-Samadoulougou, F. (2022). Alcohol consumption and associated risk factors in Burkina Faso: Results of a population-based cross-sectional survey. *BMJ Open*, 12(2). <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2021-058005>
- Breslow, R. A., Castle, I.-J. P., Chen, C. M., & Graubard, B. I. (2017a). Trends in Alcohol Consumption Among Older Americans: National Health Interview Surveys, 1997 to 2014. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(5), 976–986. <https://doi.org/10.1111/acer.13365>
- Breslow, R. A., Castle, I.-J. P., Chen, C. M., & Graubard, B. I. (2017b). Trends in Alcohol Consumption Among Older Americans: National Health Interview Surveys, 1997 to 2014. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 41(5), 976–986. <https://doi.org/10.1111/acer.13365>
- Burgos, C. F., Muñoz, B., Guzman, L., & Aguayo, L. G. (2015). Ethanol effects on glycinergic transmission: From molecular pharmacology to behavior responses. *Pharmacological Research*, 101, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.002>
- Burgos, C. F., Yévenes, G. E., & Aguayo, L. G. (2016a). Structure and pharmacologic modulation of inhibitory glycine receptors. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 90, Issue 3, pp. 318–325). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105726>
- Burgos, C. F., Yévenes, G. E., & Aguayo, L. G. (2016b). Structure and pharmacologic modulation of inhibitory glycine receptors. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 90, Issue 3, pp. 318–325). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105726>
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience* 2006 7:1, 7(1), 30–40. <https://doi.org/10.1038/nrn1809>

- Castro, D. C., & Bruchas, M. R. (2019). A Motivational and Neuropeptidergic Hub: Anatomical and Functional Diversity within the Nucleus Accumbens Shell. In *Neuron* (Vol. 102, Issue 3, pp. 529–552). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.003>
- Chang, Y. M., Rosene, D. L., Killiany, R. J., Mangiamele, L. A., & Luebke, J. I. (2005). Increased Action Potential Firing Rates of Layer 2/3 Pyramidal Cells in the Prefrontal Cortex are Significantly Related to Cognitive Performance in Aged Monkeys. *Cerebral Cortex*, *15*(4), 409–418. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHH144>
- Chin, V. S., Van Skike, C. E., Berry, R. B., Kirk, R. E., Diaz-Granados, J., & Matthews, D. B. (2011). Effect of acute ethanol and acute allopregnanolone on spatial memory in adolescent and adult rats. *Alcohol*, *45*(5), 473–483. <https://doi.org/10.1016/J.ALCOHOL.2011.03.001>
- Choi, G., & Ko, J. (2015). Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Experimental & Molecular Medicine* *2015* *47*:4, *47*(4), e158–e158. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.5>
- Chowdhury, R., Guitart-Masip, M., Lambert, C., Dayan, P., Huys, Q., Düzel, E., & Dolan, R. J. (2013). Dopamine restores reward prediction errors in old age. *Nature Neuroscience*, *16*(5), 648–653. <https://doi.org/10.1038/nn.3364>
- Ciampa, C. J., Parent, J. H., Lapoint, M. R., Swinerton, K. N., Taylor, M. M., Tennant, V. R., Whitman, A. J., Jagust, W. J., & Berry, A. S. (2022). Elevated Dopamine Synthesis as a Mechanism of Cognitive Resilience in Aging. *Cerebral Cortex*, *32*(13), 2762–2772. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab379>
- Collins, A. L., Aitken, T. J., Greenfield, V. Y., Ostlund, S. B., & Wassum, K. M. (2016). Nucleus Accumbens Acetylcholine Receptors Modulate Dopamine and Motivation. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *41*(12), 2830–2838. <https://doi.org/10.1038/NPP.2016.81>
- Cunningham, C. L., Gremel, C. M., & Groblewski, P. A. (2006). Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature Protocols* *2006* *1*:4, *1*(4), 1662–1670. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.279>
- Dare, J., Wilkinson, C., Traumer, L., Kusk, K. H., McDermott, M., Uridge, L., & Grønkjær, M. (2020). “Women of my age tend to drink”: the social construction of alcohol use by Australian and Danish women aged 50–70 years. *Sociology of Health & Illness*, *42*(1), 35–49. <https://doi.org/10.1111/1467-9566.12991>
- Delaney, A. J., Esmaeili, A., Sedlak, P. L., Lynch, J. W., & Sah, P. (2010). Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala. *Neuroscience Letters*, *469*(2), 237–242.
- Dguzeh, U., Haddad, N., Smith, K., Johnson, J., Doye, A., Gwathmey, J., & Haddad, G. (2018). Alcoholism: A Multi-Systemic Cellular Insult to Organs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(6), 1083. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061083>
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (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*, *85*(14), 5274–5278.

- Duriscic, N., Godin, A. G., Wever, C. M., Heyes, C. D., Lakadamyali, M., & Dent, J. A. (2012). Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *Journal of Neuroscience*, *32*(37), 12915–12920.
- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, *152*, 244–248. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2015.10.025>
- Eckardt, M. J., File, S. E., Gessa, G. L., Grant, K. A., Guerri, C., Hoffman, P. L., Kalant, H., Koob, G. F., Li, T. K., & Tabakoff, B. (1998). Effects of Moderate Alcohol Consumption on the Central Nervous System*. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *22*(5), 998–1040. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.1998.TB03695.X>
- Eppinger, B., Schuck, N. W., Nystrom, L. E., & Cohen, J. D. (2013). Reduced Striatal responses to reward prediction errors in older compared with younger adults. *Journal of Neuroscience*, *33*(24), 9905–9912. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2942-12.2013>
- Fenu, S., Bassareo, V., & Di Chiara, G. (2001). A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(17), 6897–6904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06897.2001>
- Fernández-Pérez, E. J., Gallegos, S., Armijo-Weingart, L., Araya, A., Riffo-Lepe, N. O., Cayuman, F., & Aguayo, L. G. (2020). Changes in neuronal excitability and synaptic transmission in nucleus accumbens in a transgenic Alzheimer's disease mouse model. *Scientific Reports*, *10*(1), 19606. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76456-w>
- Fjell, A. M., & Walhovd, K. B. (2010). Structural brain changes in aging: Courses, causes and cognitive consequences. In *Reviews in the Neurosciences* (Vol. 21, Issue 3, pp. 187–221). Freund Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2010.21.3.187>
- Floresco, S. B. (2015). The nucleus accumbens: An interface between cognition, emotion, and action. *Annual Review of Psychology*, *66*, 25–32. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010213-115159>
- Flurkey, K., Mcurrer, J., & Harrison, D. (2007). Mouse Models in Aging Research. In *The Mouse in Biomedical Research* (Vol. 3, pp. 637–672). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>
- Förstera, B., Muñoz, B., Lobo, M. K., Chandra, R., Lovinger, D. M., & Aguayo, L. G. (2017). Presence of ethanol-sensitive glycine receptors in medium spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *The Journal of Physiology*, *595*(15), 5285–5300. <https://doi.org/10.1113/JP273767>
- Fu, Z., Zhao, M., Wang, X., He, Y., Tian, Y., Yang, Y., Han, Y., & Li, S. (2021). Altered Neuroanatomical Asymmetries of Subcortical Structures in Subjective Cognitive Decline, Amnestic Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *79*(3), 1121–1132. <https://doi.org/10.3233/JAD-201116>
- Gallegos, S., Muñoz, B., Araya, A., & Aguayo, L. G. (2019). High ethanol sensitive glycine receptors regulate firing in D1 medium spiny neurons in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, *160*, 107773. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107773>

- Gallegos, S., San Martin, L., Araya, A., Lovinger, D. M., Homanics, G. E., & Aguayo, L. G. (2021). Reduced sedation and increased ethanol consumption in knock-in mice expressing an ethanol insensitive alpha 2 subunit of the glycine receptor. *Neuropsychopharmacology*, *46*(3), 528–536. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0689-9>
- Garcia, C. C., Lewis, B., Boissoneault, J., & Nixon, S. J. (2020). Effects of Age and Acute Moderate Alcohol Consumption on Electrophysiological Indices of Attention. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, *81*(3), 372. <https://doi.org/10.15288/JSAD.2020.81.372>
- Grau-Perales, A. B., Gómez-Chacón, B., & Gallo, M. (2019). Differential activity pattern of c-Fos in the nucleus accumbens between adult and aged rats during flavor recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *371*, 111935. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111935>
- Grudzinska, J., Schemm, R., Haeger, S., Nicke, A., Schmalzing, G., Betz, H., & Laube, B. (2005). The β subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*, *45*(5), 727–739.
- Guillaumin, M. C. C., Viskaitis, P., Bracey, E., Burdakov, D., & Peleg-Raibstein, D. (2023). Disentangling the role of NAc D1 and D2 cells in hedonic eating. *Molecular Psychiatry*, *28*(8), 3531. <https://doi.org/10.1038/S41380-023-02131-X>
- Hahr, J. Y. (2019). Physiology of aging. *Medical Hypotheses*, *123*, 83–85. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2018.12.016>
- Hales, C. M., Rees, H., Seyfried, N. T., Dammer, E. B., Duong, D. M., Gearing, M., Montine, T. J., Troncoso, J. C., Thambisetty, M., Levey, A. I., Lah, J. J., & Wingo, T. S. (2013). Abnormal Gephyrin Immunoreactivity Associated with Alzheimer's Disease Pathologic Changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *72*(11), 1009. <https://doi.org/10.1097/01.JNEN.0000435847.59828.DB>
- Han, B. H., Moore, A. A., Ferris, R., & Palamar, J. J. (2019). Binge Drinking Among Older Adults in the United States, 2015 to 2017. *Journal of the American Geriatrics Society*, *67*(10), 2139–2144. <https://doi.org/10.1111/jgs.16071>
- Han, B. H., Moore, A. A., Sherman, S., Keyes, K. M., & Palamar, J. J. (2017a). Demographic trends of binge alcohol use and alcohol use disorders among older adults in the United States, 2005–2014. *Drug and Alcohol Dependence*, *170*, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.003>
- Han, B. H., Moore, A. A., Sherman, S., Keyes, K. M., & Palamar, J. J. (2017b). Demographic trends of binge alcohol use and alcohol use disorders among older adults in the United States, 2005–2014. *Drug and Alcohol Dependence*, *170*, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.11.003>
- Han, L., & Jia, J. (2021). Long-term effects of alcohol consumption on cognitive function in seniors: a cohort study in China. *BMC Geriatrics*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/S12877-021-02606-Y>
- Heshmati, M., Christoffel, D. J., LeClair, K., Cathomas, F., Golden, S. A., Aleyasin, H., Turecki, G., Friedman, A. K., Han, M. H., Menard, C., & Russo, S. J. (2020a). Depression and social defeat stress are associated with inhibitory synaptic changes in the nucleus accumbens.

- Journal of Neuroscience*, 40(32), 6228–6233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2568-19.2020>
- Heshmati, M., Christoffel, D. J., LeClair, K., Cathomas, F., Golden, S. A., Aleyasin, H., Turecki, G., Friedman, A. K., Han, M. H., Menard, C., & Russo, S. J. (2020b). Depression and social defeat stress are associated with inhibitory synaptic changes in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 40(32), 6228–6233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2568-19.2020>
- Hikida, T., Yawata, S., Yamaguchi, T., Danjo, T., Sasaoka, T., Wang, Y., & Nakanishi, S. (2013). Pathway-specific modulation of nucleus accumbens in reward and aversive behavior via selective transmitter receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 342–347. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1220358110/ASSET/BAD5BAEE-5037-4019-9A87-495EB8973490/ASSETS/GRAPHIC/PNAS.1220358110FIG06.JPEG>
- Hof, P. R. (1997). Morphology and neurochemical characteristics of the vulnerable neurons in brain aging and Alzheimer's disease. *European Neurology*, 37(2), 71–81. <https://doi.org/10.1159/000117414>
- Hu, H. (2016). Reward and Aversion. *Annual Review of Neuroscience*, 39, 297–324. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-014106>
- Immonen, S., Valvanne, J., & Pitkala, K. H. (2011a). Prevalence of at-risk drinking among older adults and associated sociodemographic and health-related factors. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 15(9), 789–794. <https://doi.org/10.1007/s12603-011-0115-4>
- Immonen, S., Valvanne, J., & Pitkala, K. H. (2011b). Prevalence of at-risk drinking among older adults and associated sociodemographic and health-related factors. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 15(9), 789–794. <https://doi.org/10.1007/s12603-011-0115-4>
- Jaatinen, P., Sarviharju, M., Raivio, N., Eriksson, C. J. P., Hervonen, A., & Kiianmaa, K. (2013). Effects of Lifelong Ethanol Consumption on Brain Monoamine Transmitters in Alcohol-Preferring Alko Alcohol (AA) Rats. *Brain Sciences* 2013, Vol. 3, Pages 790-799, 3(2), 790–799. <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI3020790>
- Jonsson, S., Morud, J., Pickering, C., Adermark, L., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2012a). Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development. *Brain Research*, 1446, 12–21.
- Jonsson, S., Morud, J., Pickering, C., Adermark, L., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2012b). Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development. *Brain Research*, 1446, 12–21. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.01.050>
- Jun, S. B., Cuzon Carlson, V., Ikeda, S., & Lovinger, D. (2011). Vibrodissociation of Neurons from Rodent Brain Slices to Study Synaptic Transmission and Image Presynaptic Terminals. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 51, e2752. <https://doi.org/10.3791/2752>
- Kelly, K. M., Nadon, N. L., Morrison, J. H., Thibault, O., Barnes, C. A., & Blalock, E. M. (2006). The neurobiology of aging. *Epilepsy Research*, 68(SUPPL. 1), 5–20. <https://doi.org/10.1016/J.EPLEPSYRES.2005.07.015>

- Keyes, K. M., Calvo, E., Ornstein, K. A., Rutherford, C., Fox, M. P., Staudinger, U. M., & Fried, L. P. (2019). Alcohol Consumption in Later Life and Mortality in the United States: Results from 9 Waves of the Health and Retirement Study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(8), 1734–1746. <https://doi.org/10.1111/acer.14125>
- Konar-Nié, M., Guzman-Castillo, A., Armijo-Weingart, L., & Aguayo, L. G. (2022). Aging in nucleus accumbens and its impact on alcohol use disorders. *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/J.ALCOHOL.2022.08.004>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kumakura, Y., Vernaleken, I., Buchholz, H.-G., Borghammer, P., Danielsen, E., Gründer, G., Heinz, A., Bartenstein, P., & Cumming, P. (2010). Age-dependent decline of steady state dopamine storage capacity of human brain: An FDOPA PET study. *Neurobiology of Aging*, 31(3), 447–463. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.005>
- Kungel, M., & Friauf, E. (1997). Physiology and pharmacology of native glycine receptors in developing rat auditory brainstem neurons. *Developmental Brain Research*, 102(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00087-4)
- Kupchik, Y. M., & Kalivas, P. W. (2016). The Direct and Indirect Pathways of the Nucleus Accumbens are not What You Think. *Neuropsychopharmacology*, 42(1), 369. <https://doi.org/10.1038/NPP.2016.160>
- Laberge, S., Bigelow, P., Lagarde, E., & Crizzle, A. M. (2020). Examining the Association Between Alcohol Consumption and Health Conditions in Community Dwelling Older Adults. *Journal of Community Health*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10900-020-00842-8>
- Lemberger, T., Parlato, R., Dassel, D., Westphal, M., Casanova, E., Turiault, M., Tronche, F., Schiffmann, S. N., & Schütz, G. (2007). Expression of Cre recombinase in dopaminergic neurons. *BMC Neuroscience*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-4/FIGURES/8>
- Lewis, B., Boissoneault, J., Frazier, I., & Nixon, S. J. (2016). Effects of Age and Acute Moderate Alcohol Administration on Neurophysiology During Simulated Driving. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(12), 2519–2527. <https://doi.org/10.1111/ACER.13243>
- Lewis, B., Garcia, C. C., & Nixon, S. J. (2018). Drinking patterns and adherence to “low-risk” guidelines among community-residing older adults. *Drug and Alcohol Dependence*, 187, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.02.031>
- Libertini, G. (2019). Aging Definition. In *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging* (pp. 1–10). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69892-2_29-1
- Liu, H., Liu, T., Jiang, J., Cheng, J., Liu, Y., Li, D., Dong, C., Niu, H., Li, S., Zhang, J., Brodaty, H., Sachdev, P., & Wen, W. (2020). Differential longitudinal changes in structural complexity and volumetric measures in community-dwelling older individuals. *Neurobiology of Aging*, 91, 26–35. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2020.02.023>
- Lynch, J. W. (2009). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56(1), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.034>

- Maguire, E. P., Mitchell, E. A., Greig, S. J., Corteen, N., Balfour, D. J. K., Swinny, J. D., Lambert, J. J., & Belelli, D. (2014). Extrasynaptic glycine receptors of rodent dorsal raphe serotonergic neurons: A sensitive target for ethanol. *Neuropsychopharmacology*, *39*(5), 1232–1244. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.326>
- Malosio, M. L., Marquèze-Pouey, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO Journal*, *10*(9), 2401–2409. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB07779.X>
- Matthews, D. B., Scaletty, S., Schreiber, A., & Trapp, S. (2020). Acute ethanol administration produces larger spatial and nonspatial memory impairments in 29–33 month old rats compared to adult and 18–24 month old rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *199*, 173074. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2020.173074>
- Matthews, D. B., Schneider, A., Kastner, A., Scaletty, S., & Szenay, R. (2019). I can't drink what I used to: The interaction between ethanol and the aging brain. In *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 148). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irm.2019.09.003>
- Matthews, D. B., Watson, M. R., James, K., Kastner, A., Schneider, A., & Mittleman, G. (2019). The impact of low to moderate chronic intermittent ethanol exposure on behavioral endpoints in aged, adult, and adolescent rats. *Alcohol*, *78*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/J.ALCOHOL.2018.11.005>
- McCracken, L. M., Lowes, D. C., Salling, M. C., Carreau-Vollmer, C., Odean, N. N., Blednov, Y. A., Betz, H., Harris, R. A., & Harrison, N. L. (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), E7179–E7186.
- Milic, J., Glisic, M., Voortman, T., Borba, L. P., Asllanaj, E., Rojas, L. Z., Troup, J., Kieffe-de Jong, J. C., van Beeck, E., Muka, T., & Franco, O. H. (2018). Menopause, ageing, and alcohol use disorders in women. In *Maturitas* (Vol. 111, pp. 100–109). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.03.006>
- Molander, A., L??f, E., Stomberg, R., Ericson, M., & S??derpalm, B. (2005). Involvement of Accumbal Glycine Receptors in the Regulation of Voluntary Ethanol Intake in the Rat. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, *29*(1), 38–45. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000150009.78622.E0>
- Molander, A., & Söderpalm, B. (2005). Glycine Receptors Regulate Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, *29*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000150006.17168.F7>
- Molander, R. C., Yonker, J. A., & Krahn, D. D. (2019). *Age: Results From the Wisconsin Longitudinal Study*. *34*(7), 1182–1192. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01195.x>.Age-Related
- Molander, R., Yonker, J., & Krahn, D. (2010). Age-related changes in drinking patterns from mid-to older age: results from the Wisconsin longitudinal study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *34*(7), 1182–1192.
- Molchanova, S. M., Comhair, J., Karadurmus, D., Piccart, E., Harvey, R. J., Rigo, J.-M., Schiffmann, S. N., Bröne, B., & Gall, D. (2018). Tonically active $\alpha 2$ subunit-containing glycine

- receptors regulate the excitability of striatal medium spiny neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 442.
- Moriya, H., Tiger, M., Tateno, A., Sakayori, T., Masuoka, T., Kim, W. C., Arakawa, R., & Okubo, Y. (2020). Low dopamine transporter binding in the nucleus accumbens in geriatric patients with severe depression. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 74(8), 424–430. <https://doi.org/10.1111/pcn.13020>
- Morón, I., & Gallo, M. (2007). Effect of previous taste experiences on taste neophobia in young-adult and aged rats. *Physiology & Behavior*, 90(2–3), 308–317. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2006.09.036>
- Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience* 2012 13:4, 13(4), 240–250. <https://doi.org/10.1038/nrn3200>
- Mukhin, V. N., Borovets, I. R., Sizov, V. V., Pavlov, K. I., & Klimenko, V. M. (2021). β -Amyloid and Lithium Affect the Magnitude of Phasic Dopamine Release in the Shell of the Nucleus Accumbens. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 51(2), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01058-6>
- Muñoz, B., Gallegos, S., Peters, C., Murath, P., Lovinger, D. M., Homanics, G. E., & Aguayo, L. G. (2020). Influence of nonsynaptic α 1 glycine receptors on ethanol consumption and place preference. *Addiction Biology*, 25(2). <https://doi.org/10.1111/adb.12726>
- Muñoz, B., Mariqueo, T., Murath, P., Peters, C., Yevenes, G. E., Moraga-Cid, G., Peoples, R. W., & Aguayo, L. G. (2021). Modulatory Actions of the Glycine Receptor β Subunit on the Positive Allosteric Modulation of Ethanol in α 2 Containing Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2021.763868>
- Muñoz, B., Yevenes, G. E., Förstera, B., Lovinger, D. M., & Aguayo, L. G. (2018). Presence of Inhibitory Glycinergic Transmission in Medium Spiny Neurons in the Nucleus Accumbens. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 228. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00228>
- Nakanishi, S., Hikida, T., & Yawata, S. (2014). Distinct dopaminergic control of the direct and indirect pathways in reward-based and avoidance learning behaviors. *Neuroscience*, 282, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.026>
- Narvacan, K., Treit, S., Camicioli, R., Martin, W., & Beaulieu, C. (2017). *Evolution of Deep Gray Matter Volume Across the Human Lifespan*. <https://doi.org/10.1002/hbm.23604>
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2023). *Drinking Levels Defined. Research-based information on drinking and its impact*. Niaaa.Nih.Gov. <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>
- Nobili, A., Latagliata, E. C., Viscomi, M. T., Cavallucci, V., Cutuli, D., Giacobazzo, G., Krashia, P., Rizzo, F. R., Marino, R., Federici, M., De Bartolo, P., Aversa, D., Dell'Acqua, M. C., Cordella, A., Sancandi, M., Keller, F., Petrosini, L., Puglisi-Allegra, S., Mercuri, N. B., ... D'Amelio, M. (2017). Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms14727>

- Noda, S., Sato, S., Fukuda, T., Tada, N., & Hattori, N. (2020). Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice. *Molecular Brain*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13041-020-00585-6>
- Ornelas, L. C., Novier, A., Van Skike, C. E., Diaz-Granados, J. L., & Matthews, D. B. (2015). The effects of acute alcohol on motor impairments in adolescent, adult, and aged rats. *Alcohol*, 49(2), 121–126.
- Ota, M., Yasuno, F., Ito, H., Seki, C., Nozaki, S., Asada, T., & Suhara, T. (2006). Age-related decline of dopamine synthesis in the living human brain measured by positron emission tomography with I-[β -11C]DOPA. *Life Sciences*, 79(8), 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.02.017>
- Ouda, L., Profant, O., & Syka, J. (2015). Age-related changes in the central auditory system. *Cell and Tissue Research*, 361(1), 337–358. <https://doi.org/10.1007/S00441-014-2107-2>
- Panasiuk, M., Hertz, A., & Gale-Grant, O. (2019). Nucleus Accumbens Dopamine Receptor 1 Expressing Neurons Are Instrumental in Appetitive Aggression. *The Journal of Neuroscience*, 39(34), 6610. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0772-19.2019>
- Pedroza-Llinás, R., Ramírez-Lugo, L., Guzmán-Ramos, K., Zavala-Vega, S., & Bermúdez-Rattoni, F. (2009). Safe taste memory consolidation is disrupted by a protein synthesis inhibitor in the nucleus accumbens shell. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(1), 45–52. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2009.02.011>
- Perkins, A. E., Vore, A. S., Lovelock, D., Varlinskaya, E., & Deak, T. (2018). Late aging alters behavioral sensitivity to ethanol in a sex-specific manner in Fischer 344 rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 175(607), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.07.012>
- Petrini, E. M., Ravasenga, T., Hausrat, T. J., Iurilli, G., Olcese, U., Racine, V., Sibarita, J. B., Jacob, T. C., Moss, S. J., Benfenati, F., Medini, P., Kneussel, M., & Barberis, A. (2014). Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABAA receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS4921>
- Pinto, J. G. A., Hornby, K. R., Jones, D. G., & Murphy, K. M. (2010). Developmental changes in GABAergic mechanisms in human visual cortex across the lifespan. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4(JUN), 1421. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2010.00016/BIBTEX>
- Pressman, P. S., Noniyeva, Y., Bott, N., Dutt, S., Sturm, V., Miller, B. L., & Kramer, J. H. (2016). Comparing Volume Loss in Neuroanatomical Regions of Emotion versus Regions of Cognition in Healthy Aging. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158187>
- Price, J. L., Lewis, B., Boissoneault, J., Frazier, I. R., & Nixon, S. J. (2018). Effects of acute alcohol and driving complexity in older and younger adults. *Psychopharmacology*, 235(3), 887–896. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4806-3>
- Racca, C., Gardiol, A., & Triller, A. (1998). Cell-specific dendritic localization of glycine receptor α subunit messenger RNAs. *Neuroscience*, 84(4), 997–1012. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00585-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00585-X)
- Ramírez-Lugo, L., Nú, L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2007). Taste Memory Formation: Role of Nucleus Accumbens. *Chemical Senses*, 32(1), 93–97. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl023>
- Rosenzweig, E. S., Redish, A. D., McNaughton, B. L., & Barnes, C. A. (2003). Hippocampal map realignment and spatial learning. *Nature Neuroscience* 2003 6:6, 6(6), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nn1053>

- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 2013 14:9, 14(9), 609–625. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Saalfeld, J., & Spear, L. (2016). The ontogeny of ethanol aversion. *Physiology & Behavior*, 156, 164–170. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2016.01.011>
- Saalfeld, J., & Spear, L. (2019). Fos activation patterns related to acute ethanol and conditioned taste aversion in adolescent and adult rats. *Alcohol*, 78, 57–68. <https://doi.org/10.1016/J.ALCOHOL.2019.02.004>
- Salling, M. C., & Harrison, N. L. (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.
- Sánchez-Chávez, G., Velázquez-Flores, M. Á., Esparza-Garrido, R. R., & Salceda, R. (2017). Glycine receptor subunits expression in the developing rat retina. *Neurochemistry International*, 108, 177–182.
- Sassoè-Pognetto, M., & Fritschy, J. M. (2000). Gephyrin, a major postsynaptic protein of GABAergic synapses. *European Journal of Neuroscience*, 12(7), 2205–2210. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2000.00106.X>
- Sato, K., Kiyama, H., & Tohyama, M. (1992). Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha 2 subunit mRNA in the rat brain. *Brain Research*, 590(1–2), 95–108. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91085-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91085-S)
- Sato, K., Zhang, J. H., Saika, T., Sato, M., Tada, K., & Tohyama, M. (1991). Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: an analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 43(2–3), 381–395. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90302-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90302-5)
- Schall, T. A., Wright, W. J., & Dong, Y. (2021). Nucleus Accumbens Fast-spiking Interneurons in Motivational and Addictive Behaviors. *Molecular Psychiatry*, 26(1), 234. <https://doi.org/10.1038/S41380-020-0683-Y>
- Sebe, J. Y., Eggers, E. D., & Berger, A. J. (2003). Differential effects of ethanol on GABAA and glycine receptor-mediated synaptic currents in brain stem motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, 90(2), 870–875.
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624. [/pmc/articles/PMC3733029/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23733302/)
- Servicio Nacional del Adulto Mayor. SENAMA. (2021). *Estrategias de Salud mental en Personas mayores*.
- Servicio Nacional para la Prevención y Rehabilitación del Consumo de Drogas y Alcohol. SENDA. (2018). *Décimo Tercer Estudio Nacional de Drogas en Población General de Chile*. <https://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2020/02/ENPEG-2018.pdf>
- Silveri, M. M., & Spear, L. P. (2000). Ontogeny of ethanol elimination and ethanol-induced hypothermia. *Alcohol*, 20(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(99\)00055-5](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00055-5)

- Soares-Cunha, C., Coimbra, B., David-Pereira, A., Borges, S., Pinto, L., Costa, P., Sousa, N., & Rodrigues, A. J. (2016). Activation of D2 dopamine receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens increases motivation. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms11829>
- Thiele, T. E., & Navarro, M. (2014). “Drinking in the dark” (DID) procedures: A model of binge-like ethanol drinking in non-dependent mice. *Alcohol*, 48(3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.08.005>
- Van Skike, C. E., Botta, P., Chin, V. S., Tokunaga, S., McDaniel, J. M., Venard, J., Diaz-Granados, J. L., Valenzuela, C. F., & Matthews, D. B. (2010). Behavioral effects of ethanol in cerebellum are age dependent: potential system and molecular mechanisms. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(12), 2070–2080.
- Van Zundert, B., Castro, P., & Aguayo, L. G. (2005). Glycinergic and GABAergic synaptic transmission are differentially affected by gephyrin in spinal neurons. *Brain Research*, 1050(1–2), 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.05.014>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015a). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.07.046>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015b). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.07.046>
- Walsh, J. P., & Akopian, G. (2019). Physiological aging at striatal synapses. *Journal of Neuroscience Research*, 97(12), 1720–1727. <https://doi.org/10.1002/JNR.24484>
- Wan, M., Xia, R., Lin, H., Qiu, P., He, J., Ye, Y., Tao, J., Chen, L., & Zheng, G. (2020). Volumetric and Diffusion Abnormalities in Subcortical Nuclei of Older Adults With Cognitive Frailty. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 543527. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2020.00202/BIBTEX>
- Wang, H., Turner, J. G., Ling, L., Parrish, J. L., Hughes, L. F., & Caspary, D. M. (2009). Age-related changes in glycine receptor subunit composition and binding in dorsal cochlear nucleus. *Neuroscience*, 160(1), 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.079>
- Wang, Q., Zhang, Y., & Wu, C. (2022a). Alcohol consumption and associated factors among middle-aged and older adults: results from China Health and Retirement Longitudinal Study. *BMC Public Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12889-022-12718-8>
- Wang, Q., Zhang, Y., & Wu, C. (2022b). Alcohol consumption and associated factors among middle-aged and older adults: results from China Health and Retirement Longitudinal Study. *BMC Public Health*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12889-022-12718-8>
- Watanabe, E., & Akagi, H. (1995). Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord. *Neuroscience Research*, 23(4), 377–382. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00972-V](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00972-V)
- Watson, M. R., James, K., Mittleman, G., & Matthews, D. B. (2020). Impact of acute ethanol exposure on body temperatures in aged, adult and adolescent male rats. *Alcohol*, 82, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.08.001>

- White, A. M. (2003). What Happened? Alcohol, Memory Blackouts, and the Brain. *Alcohol Research & Health*, 27(2), 186.
- Wiessler, A. L., Hasenmüller, A. S., Fuhl, I., Mille, C., Campo, O. C., Reinhard, N., Schenk, J., Heinze, K. G., Schaefer, N., Specht, C. G., & Villmann, C. (2024). Role of the Glycine Receptor β Subunit in Synaptic Localization and Pathogenicity in Severe Startle Disease. *Journal of Neuroscience*, 44(2). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0837-23.2023>
- Wong, K. K., Müller, M. L. T. M., Kuwabara, H., Studenski, S. A., & Bohnen, N. I. (2012). Gender differences in nigrostriatal dopaminergic innervation are present at young-to-middle but not at older age in normal adults. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(1), 183–184. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2011.05.013>
- Woods, J. M., & Druse, M. J. (1996). Effects of Chronic Ethanol Consumption and Aging on Dopamine, Serotonin, and Metabolites. *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 2168–2178. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.66052168.X>
- World Health Organization. (2015). *World report on ageing and health*.
- Xu, L., Nan, J., & Lan, Y. (2020). The Nucleus Accumbens: A Common Target in the Comorbidity of Depression and Addiction. *Frontiers in Neural Circuits*, 14, 37. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00037>
- Xu, Y., Lin, Y., Yu, M., & Zhou, K. (2024). The nucleus accumbens in reward and aversion processing: insights and implications. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 18, 1420028. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2024.1420028>
- Yoshimoto, K., Yoshida, T., SoriMacHi, Y., Hirano, A., Takeuchi, Y., Ueda, S., & Yasuhara, M. (1998). Effects of age and ethanol on dopamine and serotonin release in the rat nucleus accumbens. *Physiology & Behavior*, 64(3), 347–351. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00067-5)
- Zonneveld, H. I., Roshchupkin, G. V., Adams, H. H. H., Gutman, B. A., Van Der Lugt, A., Niessen, W. J., Vernooij, M. W., & Ikram, M. A. (2019). High-Dimensional Mapping of Cognition to the Brain Using Voxel-Based Morphometry and Subcortical Shape Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 71(1), 141–152. <https://doi.org/10.3233/JAD-181297>
- Zou, L., Yang, R., Zhang, P., & Dai, Y. (2010). The enhancement of amyloid precursor protein and β -site amyloid cleavage enzyme 1 interaction: Amyloid- β production with aging. *International Journal of Molecular Medicine*, 25(3), 401–407. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000358

