



UNIVERSIDAD DE CHILE  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA  $\alpha 1$  EN EL CIRCUITO CEREBRAL DE  
RECOMPENSA COMO POSIBLE BLANCO TERAPÉUTICO CONTRA EL ALCOHOLISMO**

**DIRECTOR**

Prof. Luis Aguayo Hernández  
Laboratorio de Neurofisiología  
Departamento de Fisiología  
Universidad de Concepción

**CO-DIRECTOR**

Prof. Pablo Caviedes Fernández.  
Programa de Farmacología Molecular y Clínica,  
ICBM  
Facultad de Medicina  
y  
Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB)  
Depto. de Ingeniería Química, Biotecnología y  
Materiales  
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas  
Universidad de Chile

*Luis Aguayo*

AVANCE DE RESULTADOS TESIS  
**ANÍBAL IGNACIO ARAYA MARTÍNEZ**

*P. Caviedes*

Santiago de Chile  
2022

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

INFORME DE APROBACION

Tesis de Doctorado

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis presentada por el candidato:

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día:

Directores de tesis:

Dr. Luis Aguayo

\_\_\_\_\_

Dr. Pablo Caviedes

\_\_\_\_\_

Comisión Informante:

Dra. Jenny Fiedler

\_\_\_\_\_

Dra. Katia Gysling

\_\_\_\_\_

Dr. Mario Rivera

\_\_\_\_\_

Dr. Yedy Israel

\_\_\_\_\_

## **Agradecimientos Personales**

Me gustaría dedicarle esta tesis a mis padres, Elizabeth Martínez y Rafael Araya, que siempre me han apoyado muchísimo, y sin su ayuda y comprensión nunca lo hubiese logrado, por su tremendo cariño y haberme criado para ser la persona que soy hoy en día. A mi hermana que siempre ha estado ahí, ayudándome y de la que aprendí lo importante de ser proactivo y pulcro al trabajar. También a mis seres queridos, que estuvieron ahí a lo largo del desarrollo de esta aventura, dándome cariño y mostrando preocupación por mi bienestar. Me gustaría agradecer a la Naty, que me ha apoyado tremendamente en la lejanía y en los momentos más duros de esta tesis. A todas las maravillosas personas que he conocido a lo largo de este proceso, partiendo por mis compañeros del Programa de Doctorado, en quienes pude encontrar mucha fraternidad y un lugar donde había personas pasando por las mismas dudas e incertidumbres que yo, me ayudaron a no sentirme extraño en un proceso tan nuevo y desconocido para mí. A mis compañeros de laboratorio y particularmente a mis amigos de laboratorio, Ana, Cesar, Jess, Vicky y Scar, que al principio de este proceso me han ayudado a hacerlo mucho más llevadero y divertido, y su apoyo en este último periodo ha sido total. Particularmente a Scar, que me ha enseñado muchísimo, con grandes momentos y mucha diversión. Al The Real Team Etanol, un gran equipo lleno de personas que admiro y respeto mucho. Quisiera agradecer al Profesor Luis Aguayo por darme la oportunidad de demostrar mis capacidades, por su confianza y apoyo en momentos tan difíciles como un apocalipsis.

Finalmente me gustaría agradecer una vez más a todos quienes me dieron la oportunidad de conocer la investigación y darme cuenta que podía dedicarme a mi pasión, a todos los que me enseñaron mucho de lo que se y soy ahora como científico y como ser humano, muchas gracias.

## **Agradecimientos y financiamiento**

Agradecer al Allen Institute por el uso de sus imagines y a Servier Medical Art por sus plantillas de servier.com para la composición de algunas imagines usadas en esta tesis.

NIH grant National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; RO1 AA 025718.

Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico DPI 20140008.

Medical Research Council UK G0500833.

Beca ANID 21190807.

# Índice

<b>Agradecimientos Personales</b>	III
<b>Agradecimientos y financiamiento</b>	IV
<b>Índice</b>	V
<b>Resumen</b>	IX
<b>Summary</b>	XI
<b>Glosario</b>	XIII
<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Generalidades sobre el alcoholismo y circuito mesolímbico.....	1
Figura 1.1.1 Circuito de recompensa cerebral.	2
Figura 1.1.2. Esquema simplificado de las proyecciones neuronales del circuito de la recompensa cerebral.	4
Figura 1.2.1 Distintas subunidades de los receptores de glicina.	9
Figura 1.2.2. Sinapsis glicinérgica.	10
1.3. Receptores de glicina y etanol.....	12
Figura 1.3.1. Mecanismo propuesto de la potenciación por etanol de los receptores de glicina.	13
<b>2. Hipótesis</b>	15
<b>3. Objetivo general</b>	15
<b>Objetivos específicos</b> .....	15
3.1. Determinar las características electrofisiológicas y la configuración de subunidades del receptor de glicina presentes en el VTA y PFC de ratones WT y KI $\alpha 1$ .....	15
3.2. Determinar los efectos de sobreexpresión de la subunidad $\alpha 1$ WT del receptor de glicina en nAc de ratón KI $\alpha 1$ sobre las propiedades del receptor y el consumo y preferencia al alcohol.....	15
3.3. Caracterizar la sobreexpresión del receptor $\alpha 1$ KI en nAc MSNs de ratones D1-Cre, sobre las propiedades del receptor y su efecto sobre el consumo y preferencia al alcohol. ....	15
<b>4. Materiales y métodos</b>	16
4.1. Evaluación de la expresión de pAAV-mDlx-GlyR $\alpha 1$ WT-eGFP y pAAV-DIO-GlyR $\alpha 1$ KI-mCitrine en células PC-12.....	16
4.2. Generación del plásmido .....	16
4.3. Animales.....	17
4.4. Preparación de neuronas disociadas .....	18
4.5. Registros electrofisiológicos.....	19
	V

4.6. Inmunohistoquímica.....	21
4.7 Western blot .....	22
4.8. Comportamiento .....	22
4.8.1 <i>Drinking in the Dark</i> .....	22
4.9. Concentración de etanol en sangre .....	23
4.10. Cirugía estereotáxica .....	23
4.11. Análisis estadístico .....	24
<b>5. Resultados</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Determinar las características electrofisiológicas y la configuración de subunidades del receptor de glicina presentes en el VTA de ratones WT y KI <math>\alpha</math>1.</b>	<b>25</b>
.....	25
Figura 5.1.1. Curva concentración-respuesta de glicina en neuronas disociadas del circuito de la recompensa cerebral de ratones WT.	27
Figura 5.1.2. Curva concentración-respuesta en neuronas disociadas de PFC y VTA de ratón KO $\alpha$ 2.	28
Figura 5.1.3. Análisis de densidad de corrientes de las regiones del circuito de la recompensa de ratones WT y KO $\alpha$ 2.	30
Figura 5.1.4. Curva concentración-respuesta en neuronas disociadas de PFC y VTA de ratón KI $\alpha$ 1.	31
Figura 5.1.5. Ensayo de picrotoxina en distintas regiones del circuito de la recompensa en modelo WT.	33
Figura 5.1.6.1 Potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA y PFC de ratones WT y KI $\alpha$ 1.	35
Figura 5.1.6.2. Curva Concentración-Respuesta y Potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA de ratones KI $\alpha$ 2.	37
Figura 5.1.7. Potenciación de las corrientes evocadas por glicina mediada por GTP- $\gamma$ -S en VTA y PFC en ratones WT.	38
<b>5.2. Caracterizar los efectos de la sobreexpresión de la subunidad <math>\alpha</math>1 WT del receptor de glicina en nAc de ratón KI<math>\alpha</math>1, sobre las propiedades del receptor y su efecto sobre el consumo y preferencia al alcohol.</b>	<b>40</b>
.....	40
Figura 5.2.1. Transfección de distintos tipos celulares con pAAV-mDlx-eGFP.	42
Figura 5.2.2. Esquema de trabajo para subclonamiento	43
Figura 5.2.3. Digestión de los plásmidos pAAV-mDlx-eGFP y pTransporte-GlyR $\alpha$ 1.	44
Figura 5.2.4. Candidatos de la ligación.	45
Figura 5.2.5. Registros electrofisiológicos del clon pAAV-mDlx-GlyR $\alpha$ 1-eGFP en células PC12.	46

Figura 5.2.6.1 Inyección estereotáxica de los virus AAV- mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT- GFP y AAV-mDlx-GFP en nAc de ratones Kl $\alpha$ 1	48
Figura 5.2.6.2. Inmunohistoquímica para MAP-2 y GlyR en rebanadas post inyección estereotáxica de los virus AAV- mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT- GFP y AAV-mDlx-GFP en nAc de ratones Kl $\alpha$ 1.	49
Figura 5.2.7 Curva Concentración-Respuesta en neuronas disociadas de nAc de ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus AAV- mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT- GFP y AAV-mDlx-GFP.	51
Figura 5.2.8. Análisis de densidad de corriente de neuronas disociadas de nAc de ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus AAV-mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT-GFP y AAV-mDlx-GFP.	52
Figura 5.2.9. Efecto del etanol en neuronas disociadas de ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus AAV-mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT-GFP y AAV-mDlx-GFP.	53
Figura 5.2.10. Consumo de ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus que codifica para el receptor GlyR $\alpha$ 1WT.	55
Figura 5.2.11. Niveles plasmáticos de alcohol en ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus AAV-mDlx-GFP, AAV-GlyR $\alpha$ 1WT-mDlx-GFP y AAV-GlyR $\alpha$ 1KI-mDlx-GFP.	57
<b>5.3. Caracterizar sobre-expresión de la subunidad <math>\alpha</math>1 KI en nAc MSNs de ratones D1-Cre, las propiedades del receptor y su efecto sobre el consumo y preferencia al alcohol.</b>	<b>58</b>
Figura 5.3.1. Esquema del plásmido pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine.	59
Figura 5.3.2. Densidad de corriente en células transfectadas con plásmidos pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine, o pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1WT-mCitrine, o pAAV-DIO-mCitrine.	60
Figura 5.3.3. Ensayo de picrotoxina en células transfectadas con plásmidos pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1WT-mCitrine y pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine.	61
Figura 5.3.4. Potenciación inducida por etanol en PC-12 transfectadas con plásmidos pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1WT-mCitrine y pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine	62
Figura 5.3.5. Inyección estereotáxica de virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine en nAc de ratones D1-Cre	63
Figura 5.3.6. Consumo de etanol en ratones D1-Cre inyectados con virus que codifica para el receptor GlyR $\alpha$ 1KI y Control vacío	64
Figura 5.3.7. Niveles plasmáticos de alcohol en ratones D1-Cre inyectados con virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine.	64
Figura 5.3.8. Densidad de corriente de neuronas disociadas de nAc de ratones D1-Cre inyectados con virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine.	65
Figura 5.3.9. Efecto del etanol en neuronas disociadas de nAc de ratones D1-Cre inyectados con virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine.	66
<b>6. Resumen de los objetivos</b>	<b>67</b>
Objetivo específico 1	67

Objetivo específico 2	67
Objetivo específico 3	67
<b>7. Discusión</b>	<b>69</b>
7.1. Presencia de distintas subunidades de los receptores de glicina en el circuito mesolímbico.	69
7.2. Identificación de los receptores de glicina en el circuito de la recompensa	71
Figura 7.1. Esquema resumen primer objetivo.	76
7.3. Receptores de glicina expresados en el circuito de la recompensa frente al alcohol.	77
Figura 7.2. Esquema propuesto del rol de los receptores de glicina en el circuito mesolímbico.	78
7.4. Rescate de un fenotipo de alto consumo de alcohol con transducción de proteínas usando AAV.	81
7.5. Rescate de fenotipo silvestre con la expresión de $\alpha 1$ WT en el nAc del ratón Kl $\alpha 1$	83
Figura 7.3. Esquema homeostático propuesto para recuperación de la función del receptor de glicina en el ratón Kl $\alpha 1$ .	86
7.6. Estudios en ratones transgénicos D1-Cre.	88
<b>8. Conclusiones</b>	<b>90</b>
Conclusiones finales sobre el rol de los GlyRs en el sistema mesolímbico.	90
<b>9. Bibliografía</b>	<b>93</b>

## Resumen

A pesar de que se reconoce la importancia de la dependencia al alcohol sobre la salud humana, los mecanismos por los cuales el alcohol ejerce sus efectos en el sistema nervioso central y particularmente en el circuito de la recompensa cerebral (CRC) se conocen muy poco. Este circuito se ubica en la región mesocorticolímbica y se encuentra principalmente formado por los centros neuronales del Área Tegmental Ventral (VTA), Núcleo Accumbens (nAc) y la Corteza Prefrontal (PFC).

Las drogas de abuso, dentro de ellas el alcohol, actúan sobre el CRC aumentando los niveles de dopamina, el neurotransmisor asociado al placer. Recientemente se ha propuesto que **los receptores de glicina (GlyR) podrían participar en la regulación de este circuito**. Estudios recientes en nAc, PFC y VTA han reportado la presencia de GlyR en estas regiones. Sin embargo, la identidad de los GlyR y su sensibilidad a etanol es desconocida.

Actualmente es posible identificar los distintos GlyR gracias a la específica sensibilidad de cada configuración de subunidades frente a glicina, picrotoxina (PTX), anestésicos generales, GTP- $\gamma$ -S y etanol, entre otros moduladores ortoestéricos o alostéricos. Así, comprender las propiedades de los GlyR en el CRC es de interés científico ya que puede contribuir a explicar los efectos recompensantes del etanol. Los objetivos de este estudio fueron: 1) Caracterizar las propiedades de los GlyR presentes en dos regiones importantes del CRC, PFC y VTA, utilizando los modelos de animal ratones Wild Type (WT), Knock In alfa 1 (KI $\alpha$ 1), Knock Out alfa 2 (KO $\alpha$ 2) y Knock In alfa 2 (KI $\alpha$ 2); 2) Evaluar el rol de la sobreexpresión de la subunidad GlyR $\alpha$ 1WT en el nAc de ratones KI $\alpha$ 1, un modelo de ratón que presenta un fenotipo bebedor, sobre el comportamiento de consumo

de alcohol; finalmente 3) Evaluar el rol de la sobreexpresión de la subunidad GlyR $\alpha$ 1KI en las D1 MSNs (de sus siglas en ingles *Medium Spiny Neurons*; Neuronas espinosas medianas tipo D1) del nAc, en un modelo de ratón con receptores WT, sobre el consumo de alcohol.

Los resultados muestran que GlyR presentes en la PFC corresponden a  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 $\beta$ , insensibles a la potenciación por etanol o por GTP- $\gamma$ -S. Por otro lado, en VTA receptores homoméricos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 1 $\beta$  predominan, ambos muy sensibles a concentraciones bajas de etanol (10 mM). Estos resultados aportan información importante para identificar los GlyR en el CRC y el posible rol que ejercen sobre el comportamiento frente al consumo de alcohol. Sobreexpresión de la subunidad GlyR $\alpha$ 1WT en el nAc de ratones KI $\alpha$ 1, usando sobreexpresión con un AAV, produjo una disminución en el consumo de alcohol, en comparación con los ratones inyectados con el virus control vacío. No se encontraron diferencias en el consumo de alcohol en los ratones WT que sobreexpresaron la subunidad GlyR $\alpha$ 1KI en D1 MSNs del nAc. Estos hallazgos apoyan la existencia de un rol protector al consumo de alcohol que cumplen los receptores de glicina especialmente los expresados en el nAc.

## Summary

Despite its importance in human health, the mechanisms of action of alcohol in the central nervous system, particularly in the brain reward circuit (BRC) are not fully understood. This circuit is found in the mesocorticolimbic brain regions and is composed by the brain nuclei of the Ventral Tegmental Area (VTA), Accumbens Nucleus (nAc), and Prefrontal Cortex (PFC).

Several drugs of abuse, including ethanol, act in the BRC increasing the levels of dopamine, the neurotransmitter associated to reward and pleasure. It has recently been proposed that **glycine receptors** (GlyR) might also **participate in the regulation of this circuit**. However, the actual nature of these GlyR and whether they are sensitive to ethanol is unknown. Recent studies in mesolimbic regions, such as the PFC, VTA and nAc, have reported the presence of GlyRs of an undetermined subunit composition.

At the present, it is possible to identify GlyRs based on their sensitivity to glycine (Gly), picrotoxin (PTX), general anesthetics, GTP- $\gamma$ -S, and ethanol (EtOH), among others. Therefore, it is important to understand the properties of these GlyRs in the limbic network because their presence might contribute to the rewarding effects of EtOH. The aims of this study were: 1) to characterize GlyRs properties in two regions of the reward circuit: the PFC and VTA, and compare the results to those in nAc, using Wild Type (WT), Knock In alpha 1 (KI $\alpha$ 1), Knock Out alpha 2 (KO $\alpha$ 2) mice and Knock In alpha 2 (KI $\alpha$ 2); 2) Evaluate the role of the GlyR $\alpha$ 1WT subunit overexpression in the nAc of KI $\alpha$ 1 mice, a high drinking phenotype mice model, over its drinking behavior; and 3) Evaluate the role of the GlyR $\alpha$ 1KI subunit overexpression in the nAc D1 MSNs over its drinking behavior.

Based on these results, we postulate that GlyRs present in PFC are composed mainly of  $\alpha 2$  and  $\alpha 3\beta$  subunits that are not potentiated by EtOH or GTP- $\gamma$ -S. In VTA neurons, on the other hand, homomeric  $\alpha 1$  and  $\alpha 1\beta$ , which are highly sensitive to low EtOH concentrations (10mM), seem to predominate. These findings provide important data to identify GlyRs in the mesolimbic system and their possible role in alcohol behaviors. The overexpression of GlyR $\alpha 1$ WT subunit in the Kl $\alpha 1$  mice nAc using an AAV lead to a reduction of ethanol intake, in comparison with Kl $\alpha 1$  mice injected with the control empty vector. No differences were found in the overexpression GlyR $\alpha 1$ KI subunit in nAc D1 MSNs (*Medium Spiny Neurons*) of WT mice. These data support the idea that GlyR's expressed in nAc play an important role in controlling ethanol consumption.

## Glosario

$\alpha$  : Alfa.

**aca** : Comisura anterior.

$\beta$  : Beta.

**BRC** : Circuito de la recompensa cerebral por sus siglas en inglés Brain reward circuit.

**CRC** : Circuito de la recompensa cerebral.

**CRE** : Enzima recombinasa CRE, de sus siglas en inglés *Causes Recombination*.

**c.s.p.** : Cantidad suficiente para.

**D1** : Receptor de dopamina del tipo D1.

**D2** : Receptor de dopamina del tipo D2.

**dL** : decilitros.

$\gamma$  : Gamma.

**g** : gramos.

**GABAAR**: Receptor de ácido gamma-aminobutírico tipo A.

**GlyR** : Receptor de glicina.

**I max** : Corriente máxima.

**kg** : kilogramos.

**L** : litros.

**mg** : miligramos.

**mM** : miliMolar.

**MSN** : Neurona espinosa mediana de sus siglas en inglés *medium spiny neuron*.

$\mu$  : micro.

$\mu\text{m}$  : micrómetros o micras.

$\mu\text{M}$  : microMolar.

**nAc** : Nuclio accumbens.

**pA** : pico Amperes.

**pAAV-mDlx-GlyR-eGFP**: Virus adenoasociado que se expresa en neuronas gabaérgicas que tienen activo el enhancer *mDlx*, y el receptor de glicina asociado a un reportero fluorescente verde, de sus siglas en inglés *green fluorescent protein*.

**PFC** : Corteza prefrontal.

**PTX** : Picrotoxina.

**Ratón KI:** Ratón *Knock-In*, de sus siglas en inglés: Se define como un modelo animal en el cual una secuencia génica de interés es alterada mediante una sustitución de las bases una-por-una con una secuencia transgénica, o mediante la adición de una secuencia génica que no se encuentra en ese locus. Es decir, un ratón *Knock-In* presenta una secuencia mutante del gen en el locus específico en el que se encontraría el gen silvestre. Se diferencia de la nomenclatura “ratón transgénico” a secas ya que un ratón transgénico puede expresar el gen mutante en cualquier locus de cualquier cromosoma (Greg and Muse, 2009).

**Ratón KO:** Ratón *Knock Out*, de sus siglas en inglés, corresponde a un ratón que no expresa la secuencia génica de interés.

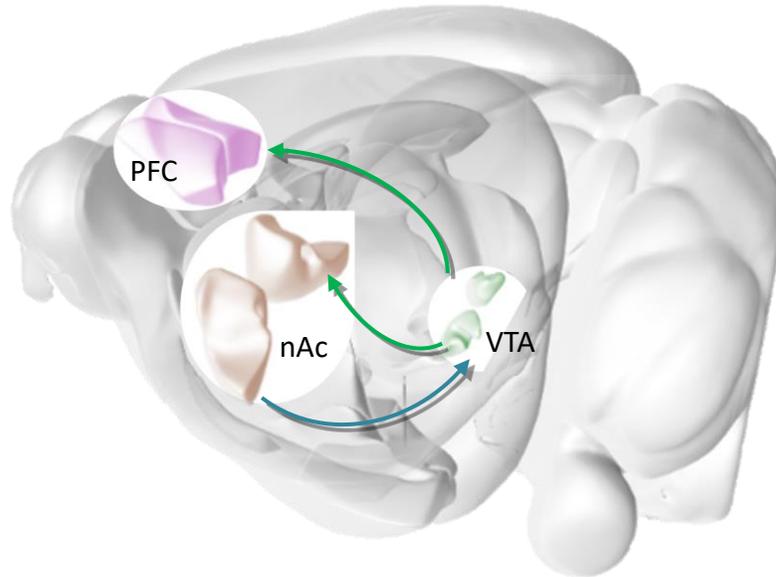
**Ratón WT:** Ratón *Wild Type*, de sus siglas en inglés, corresponde a un ratón silvestre de la cepa C57BL/6J.

**VTA** : Area tegmental ventral.

## 1. Introducción

### 1.1. Generalidades sobre el alcoholismo y circuito mesolímbico

El alcoholismo, es una enfermedad asociada con una necesidad incontrolable de consumir alcohol, que genera una dependencia física y psicológica. Además, es un factor de riesgo para varias enfermedades, lo que conlleva una carga para la sociedad en general (WHO, 2018). Existen variados tratamientos psicológicos, grupales (Alcohólicos Anónimos; AA) y farmacológicos para esta enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento farmacológico de esta enfermedad incluye a la naloxona, un antagonista de receptores opioides, el acamprosato, cuyo mecanismo de acción continúa siendo investigado, pero hay evidencia que indica que actúa estableciendo un balance entre receptores GABAérgicos y los receptores de glutamato, reduciendo los efectos del síndrome de privación (Kennedy et al., 2010; Witkiewitz and Hamreus, 2012). Por otro lado, también se utiliza el disulfiram, un inhibidor de la enzima aldehído deshidrogenasa, enzima que participa en el metabolismo del alcohol. Sin embargo, estos tratamientos tienen un alto nivel de recaídas al consumo de alcohol (Farokhnia et al., 2019; Kiefer et al., 2004). Por otro lado, aún se ignoran las bases neurobiológicas de los efectos del alcohol a nivel cerebral, especialmente en los circuitos relacionados a recompensa cerebral (Raistrick et al., 2006). En este contexto, es necesario indicar que el circuito mesolímbico está compuesto principalmente por la corteza prefrontal (PFC), el núcleo accumbens (nAc) y el área tegmental ventral (VTA) (Morales and Margolis, 2017; Nestler, 2001; Russo and Nestler, 2013; Simmons et al., 2019) (Figura 1.1.1). Estas regiones cerebrales se activan frente a estímulos placenteros o que permiten la supervivencia, como lo son la actividad sexual, la alimentación o la actividad física (Blum et al., 2012; Margolis et al., 2006).



**Figura 1.1.1 Circuito de recompensa cerebral.** Esquema simplificado del sistema de recompensa cerebral formado por los centros neuronales de la corteza pre-frontal (PFC), núcleo accumbens (nAc) y área tegmental ventral (VTA). Las flechas de color verde ejemplifican las proyecciones de neuronas dopaminérgicas desde el VTA hacia el nAc, y hacia la PFC. La flecha azul corresponde a las proyecciones de neuronas GABAérgicas desde el nAc hacia el VTA. Esquema modificado de (Dichter et al., 2012). Modelo cerebral 3D modificado de <https://connectivity.brain-map.org/3d-viewer>.

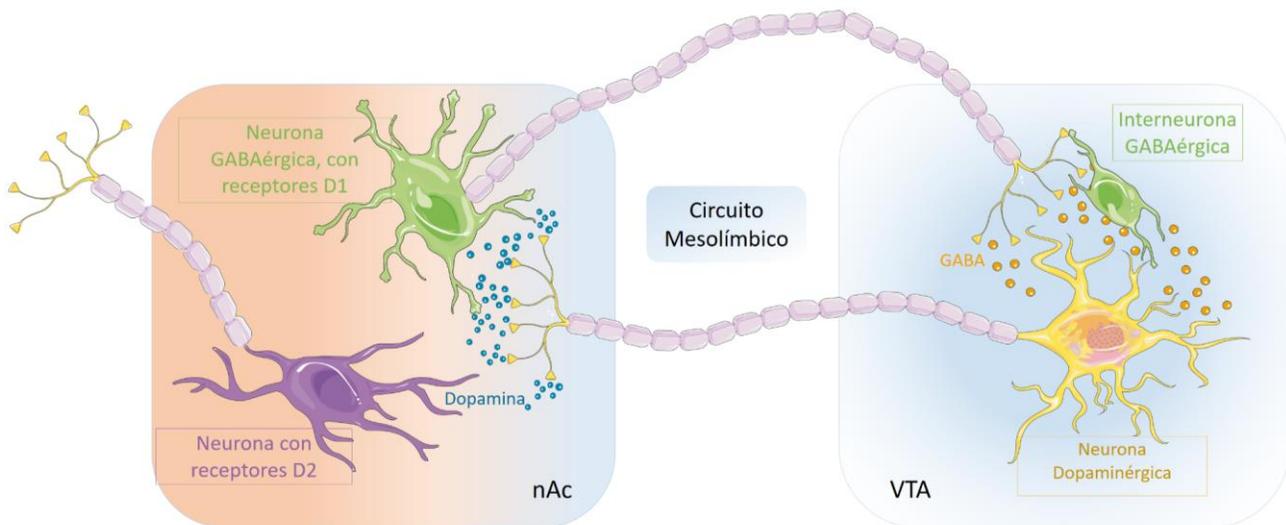
El circuito de la recompensa cerebral se encuentra compuesto principalmente por neuronas dopaminérgicas, que tienen sus cuerpos neuronales o somas en el VTA y proyectan sus axones hacia la PFC y el nAc, donde ocurre la liberación de dopamina (Dichter et al., 2012; Koob and Volkow, 2016), el neurotransmisor asociado al placer. Por otro lado, en el nAc se encuentran somas de neuronas GABAérgicas que proyectan sus axones hacia el VTA, donde ocurre la liberación de GABA, el cual modula la actividad de las neuronas dopaminérgicas, al ser uno de los principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso. (Figura 1.1.2). Se ha postulado que cuando esta vía se activa, ocurre liberación de dopamina, la que activa las neuronas inhibitorias del nAc, produciendo una liberación de GABA en el VTA, y esto generaría la inhibición de las interneuronas inhibitorias presentes en esta región, las cuales al ser inhibidas disminuirían su actividad sobre los somas de las neuronas dopaminérgicas y de esta

forma favorecer la liberación de dopamina en el nAc, un proceso de activación neuronal indirecto conocido como la inhibición de la inhibición neuronal (o desinhibición) (Molander and Söderpalm, 2005a; Zheng and Johnson, 2001).

Otro neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central es la glicina, la cual, al unirse a su receptor, que corresponden a canales iónicos permeables al ion cloruro, al igual que GABA<sub>A</sub>, permiten la hiperpolarización de las neuronas y su disminución en excitabilidad frente a estímulos que pueden generar potenciales de acción (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004). Se reconoce que los receptores de glicina (GlyRs) se expresan extensamente en la medula espinal y en el tronco cerebral (Betz, 1991; Burgos et al., 2015; Davies et al., 2003; Kandel et al., 2013). Sin embargo, estudios recientes han reportado que existen receptores de glicina en el circuito de la recompensa cerebral, particularmente en VTA y en PFC, pero aún se desconoce la identidad de las subunidades que los componen (Li et al., 2012; Lu and Ye, 2011; McCracken et al., 2017; Molander and Söderpalm, 2005b; Muñoz et al., 2018; Xu and Gong, 2010; Zhu and Ye, 2005), Figura 1.1.1.

Varios estudios en ratas realizados por otros grupos de investigación determinaron el efecto de la microdiálisis de glicina (Molander et al., 2005) o microinyección de un inhibidor de la recaptación de glicina (Molander et al., 2007) en el nAc sobre comportamientos adictivos al alcohol. En estos ensayos de microdiálisis de inhibidores de recaptación de glicina (ORG 25935) o glicina en nAc, aumentaron los niveles de dopamina en nAc y se observó que las ratas disminuyen el consumo de alcohol (Molander et al., 2007, 2005; Molander and Söderpalm, 2005a) los investigadores concluyeron que ocurriría una inhibición de las neuronas en el nAc, que ejercen un *feedback* negativo sobre inter neuronas inhibitorias en el VTA y de esta forma permiten un aumento de la

liberación de dopamina en nAc, finalmente inhibiendo la conducta asociada a la búsqueda y consumo de etanol. Mediante ensayos electrofisiológicos y RT-PCR en nAc se pudo determinar que la identidad de las subunidades que conforman los receptores presentes en nAc corresponde a  $\alpha 1\beta$  y  $\alpha 2\beta$ , con diferencias según las poblaciones neuronales estudiadas (Förster et al., 2017; Muñoz et al., 2018). Por otro lado, al microinyectar glicina en el VTA de ratas se observó una disminución en el consumo de etanol, lo que se revirtió al microinyectar en esta misma región cerebral estricnina, el principal antagonista de los receptores de glicina (Li et al., 2012). Sin embargo, aún no se conoce la identidad de los receptores de glicina presentes en PFC y VTA.



**Figura 1.1.2. Esquema simplificado de las proyecciones neuronales del circuito de la recompensa cerebral.** El cuadro de la derecha corresponde a VTA, donde se encuentran los somas de neuronas dopaminérgicas e interneuronas GABAérgicas, donde mediante microdiálisis de glicina, se observó que las ratas aumentaban el consumo de etanol en diversos ensayos de comportamiento. El cuadro de la izquierda corresponde al nAc, donde ocurre la liberación de dopamina, también se encuentran los somas de neuronas GABAérgicas los que proyectan hacia el VTA, donde ocurre la descarga de GABA y modulan la actividad de las interneuronas y neuronas dopaminérgicas.

Comprender la heterogeneidad de subpoblaciones celulares que componen los diversos grupos neuronales que forman el circuito de la recompensa resulta fundamental para entender la función de estas neuronas en los diversos circuitos. Por ejemplo, en estudios recientes se ha determinado que las neuronas del VTA además de las tradicionalmente conocidas como GABAérgicas, dopaminérgicas o glutamatérgicas, además existen poblaciones que liberan GABA o glutamato además de dopamina (Morales and Margolis, 2017). En el caso de las neuronas del núcleo Accumbens, estas corresponden principalmente a las denominadas MSN, de sus siglas en inglés *Medium Spiny Neurons*, las cuales son neuronas GABAérgicas de proyección, que son tradicionalmente agrupadas en dos grandes grupos, las D1 MSN, debido a que expresan los receptores de dopamina de tipo D1, asociados a la vía directa de la recompensa; por otro lado tenemos a las D2 MSN, que expresan los receptores de dopamina de tipo D2 y son tradicionalmente asociadas a la vía indirecta de la recompensa (Nakanishi et al., 2014). Sin embargo, evidencia reciente ha determinado que existen grupos que expresan ambos tipos de receptores en ambas vías (Soares-Cunha et al., 2020). Brevemente, las neuronas GABAérgicas de la vía directa expresan los receptores de dopamina D1, los cuales tienen una sensibilidad menor a dopamina que los receptores D2. Debido a esto, cuando las drogas de abuso aumentan los niveles de dopamina en el nAc, al igual que en sujetos ya adictos al anticiparse al consumo, ocurre un aumento en los niveles de dopamina en esta región cerebral, lo que activa la vía directa, asociada a la motivación por repetir una conducta placentera, favoreciendo el comportamiento de motivación por trabajar por conseguir la droga. Por otro lado, se inhibe la vía indirecta, asociada a aprender a evadir los estímulos peligrosos o dañinos, lo que en última instancia permite reforzar el comportamiento de consumo y la motivación por obtener la droga a pesar de las consecuencias negativas asociadas a ellas.

Una diferencia interesante entre las MSN D1 positivas y las MSN D1 negativas es la expresión diferenciada de receptores de glicina. En estudios previos (Förster et al., 2017) se determinó la identidad de los receptores de glicina presentes en las neuronas D1 positivas y D1 negativas, donde se reportó que la aplicación de concentraciones saturantes de glicina indujo respuestas con densidad de corrientes significativamente distintas, siendo mayor la de las D1 positivas, al igual que presentan diferencias en la cinética y una tendencia a distintos  $EC_{50}$ , lo que sugiere una expresión del receptor de glicina diferenciada entre las dos poblaciones neuronales. En este mismo estudio no se observaron diferencias en cuanto a la potenciación por etanol 100 mM, la cual es una concentración elevada de alcohol y corresponde a un estado de intoxicación severo, en otras palabras, coma o muerte (Marin and Morais-Silva, 2017). Sin embargo, en estudios de Gallegos y colaboradores del año 2019 se observó que las neuronas D1 positivas presentan mayor potenciación a bajas concentraciones de etanol que las neuronas D1 negativas, a concentraciones de 1, 5, 10 y 50 mM, lo que sugiere una participación, aun no definida, de la proteína Gs presente en este grupo neuronal. Para continuar con el estudio que permite diferenciar de estas dos vías en nuestro laboratorio disponemos de animales D1 Cre, los cuales son ratones que presentan la enzima recombinasa Cre bajo el control del promotor del receptor de dopamina D1. Este sistema Cre/*loxP* ha sido altamente utilizado como método de sobreexpresión o silenciamiento de genes, caracterizándose por poseer un alto grado de especificidad (Havekes and Abel, 2009). Este sistema fue descubierto gracias a los estudios del sistema de recombinación sitio específica del fago P1, el cual se basa en que la enzima recombinasa Cre (de sus siglas *cyclization recombinase*) reconoce fragmentos específicos de ADN y posteriormente induce la recombinación de secuencias de reconocimiento de 34 pb, denominadas *loxP* (de sus siglas *locus of x-over, P1*). Predominantemente este sistema se ha utilizado para

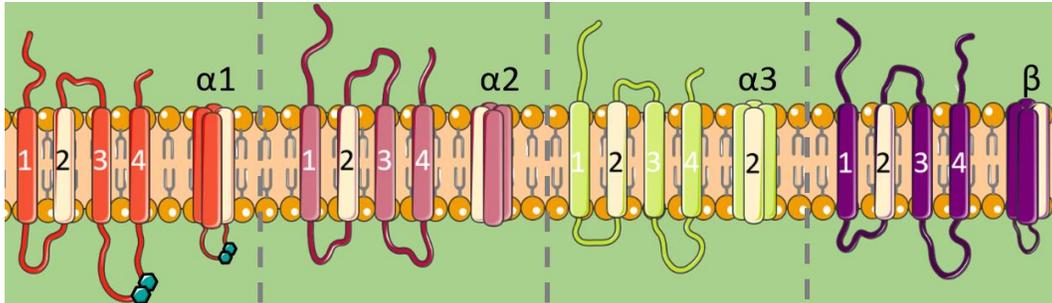
remover las secuencias de ADN flanqueadas por los sitios *loxP*. Sin embargo, dependiendo del marco de lectura de los sitios *loxP* estos permiten la inversión y la translocación de ADN entre dos sitios *loxP*. (Kim et al., 2018). En el estudio de Cui y colaboradores realizado en el año 2013 se utilizó este sistema para evaluar la activación en neuronas de las vías estriatales directas e indirectas. Para ello se utilizaron los modelos de animales D1-Cre y D2-Cre, a los que se les inyectó en el estriado un sensor de calcio GCaMP3, como un indicador de activación neuronal, el cual se encontraba flanqueado por los sitios *loxP* y de esta forma pudieron evaluar la actividad concomitante entre la vía estriatal directa e indirecta durante los estados de actividad y una menor activación durante los estados de inactividad (Cui et al., 2013). Este modelo nos permite diseccionar con mayor precisión los grupos neuronales a estudiar y determinar cuál es el rol que cumplen en este grupo neuronal los receptores de glicina.

## 1.2. Generalidades de los receptores de glicina

Los receptores de glicina pertenecen a la familia de receptores canales iónicos activados por ligando, son de carácter inhibitorio, ya que, al interactuar con sus agonistas, glicina, taurina, entre otros (Breitinger and Breitinger, 2020), permite el cambio conformacional que lleva a cabo la apertura del canal y la entrada de iones cloruro a la neurona, lo que la lleva a un estado de hiperpolarización de la membrana (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004). El potencial de membrana se hace aún más negativo y la neurona se vuelve menos reactiva a potenciales de acción.

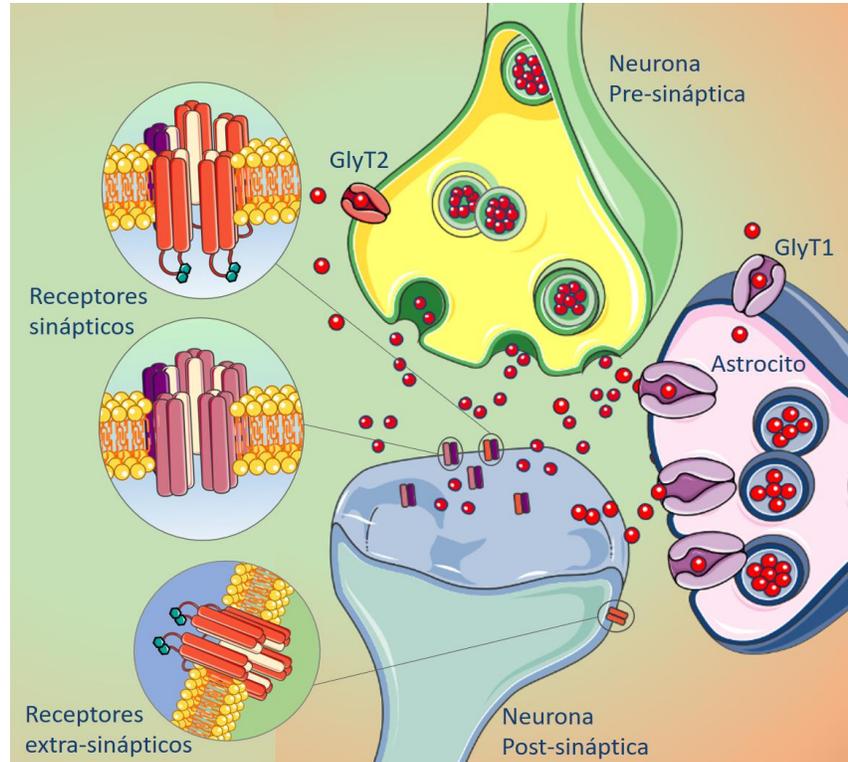
Se han descrito en humanos 4 subunidades del receptor de glicina ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta$ ) (Figura 1.2.1). Cada una de las subunidades esta compuestas por 4 dominios transmembrana, de los cuales el segundo dominio transmembrana se dispone hacia el centro del canal y

es por donde ocurre el paso de iones cloruro (Burgos et al., 2015; Kandel et al., 2013; Lynch, 2009; Purves et al., 2004). La subunidad  $\alpha 1$  posee un *loop* intracelular largo entre los dominios transmembrana 3 y 4, el cual tiene residuos básicos, las lisinas 385 y 386, responsables del mecanismo de la potenciación por etanol (Figura 1.3.1) (Yevenes et al., 2010, 2008, 2003). Los receptores que están formados por 5 subunidades  $\alpha$  son denominados homéricos, mientras que los receptores conformados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son conocidos como heteroméricos (Zhang et al., 2015). Se ha descrito que la presencia de la subunidad  $\beta$  es relevante para la formación de receptores sinápticos, ya que esta subunidad interactúa con la proteína de andamiaje gefirina, lo que favorece la localización de estos receptores en la post-sinapsis (Kandel et al., 2013; Maas et al., 2006). Sin embargo, la subunidad  $\beta$  no es capaz de formar un canal homomérico funcional por sí sola.



**Figura 1.2.1 Distintas subunidades de los receptores de glicina.** De izquierda a derecha se esquematizan cada una de las 4 subunidades de los receptores de glicina descritas en humanos, con sus dominios transmembrana enumerados, y luego ensamblados como subunidad, separados por líneas punteadas grises. De izquierda a derecha, en rojo se esquematiza la subunidad  $\alpha 1$ , la que es sensible a la potenciación por etanol gracias a su *loop* intracelular entre los dominios transmembrana 3 y 4, particularmente las lisinas 385 y 386, representadas por los rombos color verde petróleo (🔑). En rosado la subunidad  $\alpha 2$ , en verde la subunidad  $\alpha 3$  y en morado la subunidad  $\beta$ , responsable de la distribución subcelular de los receptores. En blanco se resalta el segundo dominio transmembrana en cada subunidad, el que se dispone al centro del canal y permite el paso de iones cloruro.

En la sinapsis glicinérgica los astrocitos cumplen un rol importante en el *clearance* de glicina del espacio sináptico, a través de los transportadores GlyT1, los que son inhibidos por el compuesto ORG 25935. Este compuesto ha sido utilizado en estudios de comportamiento para aumentar los niveles de glicina en el espacio sináptico (Lidö et al., 2011; Molander et al., 2007) (Figura 1.2.2).



**Figura 1.2.2. Sinapsis glicinérgica.** Los receptores de glicina están compuestos por 5 subunidades, los cuales pueden corresponder a 5 subunidades  $\alpha$ , homoméricos, o heteroméricos, compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Los receptores heteroméricos son considerados sinápticos, ya que a través de la subunidad  $\beta$  son capaces de interactuar con la proteína gefirina, la que permite el anclaje en la sinapsis. La glicina es transportada dentro de los astrocitos a través de los transportadores GlyT1, y es reingresada dentro de las neuronas pre-sinápticas por los GlyT2 (Bowery and Smart, 2006; Kandel et al., 2013; Söderpalm et al., 2017; Xu, 2007).

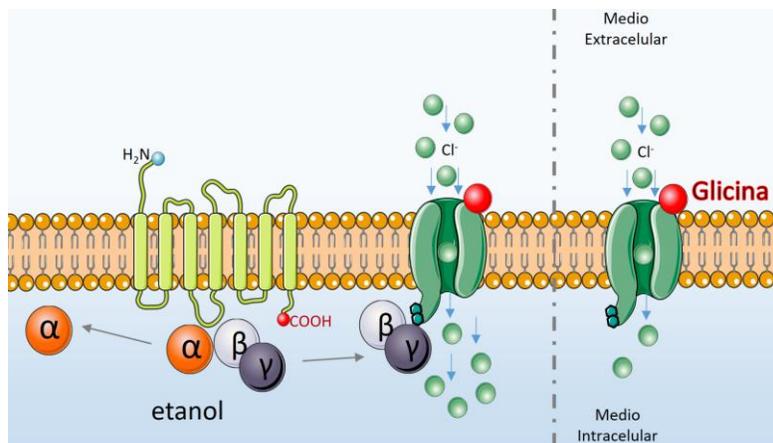
Actualmente es posible conocer la identidad de los receptores de glicina mediante sus propiedades electrofisiológicas, ya que conforme a las diferentes configuraciones que pueden adoptar entre las distintas subunidades ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta$ , formando receptores heteroméricos u homoméricos en diversas combinaciones), estos receptores presentan distintas propiedades, como lo son la sensibilidad a glicina, a picrotoxina, a GTP- $\gamma$ -S y a etanol, entre otras. Por ejemplo, los receptores homoméricos  $\alpha 1$  tienen un  $EC_{50}$  menor al

EC<sub>50</sub> de los receptores  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (Miller et al., 2004; Sánchez et al., 2015), además son sensibles a la potenciación por etanol y por GTP- $\gamma$ -S, mientras que los receptores homoméricos  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  no se potencian por GTP- $\gamma$ -S (Burgos et al., 2015; Yevenes et al., 2010).

Adicionalmente, los receptores de glicina pueden ser homoméricos, compuestos exclusivamente por subunidades  $\alpha$ 's, tradicionalmente considerados como receptores extra-sinápticos. También pueden ser receptores heteroméricos, compuestos por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , son considerados como receptores sinápticos, ya que la subunidad  $\beta$  interacciona con la proteína gefirina, la cual se asocia a los microtúbulos en la sinapsis (Figura 1.2.2). Los principales agonistas de los GlyR son glicina,  $\beta$ -alanina y taurina, los que activan con mayor o menor potencia los receptores en sus distintas conformaciones. En la actualidad no existen agonistas selectivos que permitan activar única y exclusivamente una conformación en particular del receptor de glicina. El antagonista clásico de los receptores de glicina es el alcaloide estriquina, el cual ejerce su acción de antagonista competitivo en el rango de concentración de los  $\mu$ M. Picrotoxina es un antagonista que inhibe con mayor potencia a los receptores homoméricos (Breitinger and Breitinger, 2020; Burgos et al., 2015). En estudios publicados de nuestro laboratorio, realizados en células HEK-293 transfectadas con las distintas subunidades del receptor, se determinó que los receptores homoméricos  $\alpha 1$ , pero no  $\alpha 2$ , en presencia de etanol, se potencian de manera significativa (Yevenes et al., 2010).

### 1.3. Receptores de glicina y etanol

Con respecto a la sensibilidad a etanol, datos de nuestro y otros laboratorios han indicado que los receptores en configuración  $\alpha 1$  homoméricos y  $\alpha 2\beta$  presentan una potenciación significativa del efecto de glicina en presencia de bajas concentraciones de etanol. En otros estudios no publicados se encontró que  $\alpha 2\beta$ , pero no  $\alpha 2$  homoméricos son potenciados por etanol. Por otro lado,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  no son potenciados por etanol (Miller et al., 2004; Sánchez et al., 2015). Estudios previos han mostrado que etanol, similar a benzodiazepinas en  $GABA_A$ R, aumenta la afinidad aparente del GlyR, desplazando el  $EC_{50}$  hacia la izquierda (Aguayo et al., 1996). Por lo tanto, el alcohol es un modulador alostérico positivo (PAM) del receptor (Yevenes and Zeilhofer, 2011a). El mecanismo propuesto para la potenciación de los receptores homoméricos  $\alpha 1$  se encuentra descrito en la figura 1.3.1. Estudios reportados por el grupo de Yevenes y colaboradores en el año 2010, mediante mutaciones sitio dirigidas de las secuencias de los receptores  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , identificaron regiones aminoacídicas básicas que interaccionan con la subunidad  $G\beta\gamma$  proveniente de la disociación de una proteína G trimérica, con el *loop* intracelular TM 3-4, la cual es una región prácticamente conservada en ambas subunidades, ya que si bien no corresponde exactamente a la misma secuencia de aminoácidos, estos comparten la ubicación y el carácter básico, los cuales al interaccionar con la subunidad  $G\beta\gamma$  permiten una mayor conductancia de ion cloruro por parte del receptor de glicina (Yevenes et al., 2010).



**Figura 1.3.1. Mecanismo propuesto de la potenciación por etanol de los receptores de glicina.** Etanol es capaz de aumentar la disociación de las subunidades  $G\beta\gamma$  de la proteína  $G_s$ , la subunidad  $G\beta\gamma$  interacciona con los dominios básicos, lisinas 385 y 386 de la subunidad  $\alpha_1$  del receptor, destacadas por los rombos color verde petróleo, aumentando la probabilidad de apertura del canal una vez que es activado por glicina, y de esta forma aumentando la cantidad de iones cloruro que entran a la neurona, produciendo una inhibición de las neuronas aún mayor en presencia de alcohol (San Martín et al., 2012; Söderpalm et al., 2017; Zhu and Ye, 2005).

En estudios realizados por nuestro laboratorio, en animales genéticamente modificados, denominados ratones *Knock In*  $\alpha_1$ , los que presentan una mutación en el receptor de glicina  $\alpha_1$ , en los sitios de interacción con las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_s$  ( $G_s\beta\gamma$ ), como fue mencionado anteriormente, cambiando las lisinas 385 y 386 por alaninas, lo que hace a estos receptores insensibles a la potenciación por etanol, se observó un cambio en el fenotipo de estos ratones, a uno más bebedor (Aguayo et al., 2014).

Por lo expuesto anteriormente, conocer la conformación molecular de los receptores de glicina presentes en el circuito de la recompensa cerebral, particularmente VTA y PFC, así como entender el rol del receptor de glicina  $\alpha_1$  en este circuito, en modelos de consumo de alcohol resulta de importancia para aportar al entendimiento de la patología del alcoholismo y en un futuro convertirse en un posible blanco terapéutico para tratar el

alcoholismo. A la fecha, se ha estudiado la identidad de los receptores de glicina presentes en nAc (Förster et al., 2017), y su función mediante el uso de experimentos de comportamiento en diversos modelos de animales genéticamente modificados, como el ya mencionado  $Kl\alpha1$ , pero también  $Kl\alpha2$  y  $KO\alpha2$ , los cuales presentan comportamientos alterados con respecto al consumo y preferencia por alcohol (Gallegos et al., 2020; Muñoz et al., 2019; San Martín et al., 2020). Sin embargo, aún se desconoce la identidad de las subunidades que conforman los receptores de glicina existentes en otras regiones del sistema mesolímbico (SML), como por ejemplo PFC y VTA. A su vez, resulta de gran interés profundizar en los estudios relacionados a la potenciación del receptor  $\alpha1$  por etanol y su impacto en el comportamiento. Por un lado, estudiar el impacto de la recuperación de la función de manera región específica en los ratones genéticamente modificados  $Kl\alpha1$ , que presentan un fenotipo de consumo elevado de alcohol, mediante la sobre-expresión del receptor de glicina  $\alpha1$  WT en regiones discretas del sistema de recompensa, como por ejemplo en nAc, de este modelo murino. Por otro lado, estudiar cómo afectaría la pérdida de sensibilidad del receptor de glicina  $\alpha1$  a la potenciación de etanol, sobre-expresando esta vez receptor mutante  $\alpha1KI$  en neuronas específicas del nAc de ratones WT y observar cómo estas alteraciones afectan el consumo y preferencia de alcohol en estos ratones.

En resumen, los receptores de glicina en el SML parecen ser importantes controlando la excitabilidad de las MSNs, son sensibles a concentraciones farmacológicamente relevantes de etanol y participan en la conducta de consumo de alcohol en modelos de ratones silvestres,  $Kl\alpha1$  y  $KO\alpha2$ . Sin embargo, es necesario estudiar su contribución de manera región específica utilizando técnicas de inyección estereotáxica y de expresión con virus adeno-asociados (AAVs).

## **2. Hipótesis**

Receptores de glicina conformados por subunidades  $\alpha 1$  presentes en el CRC, y especialmente en el nAc, participan en la conducta de preferencia al consumo de alcohol en el ratón.

## **3. Objetivo general**

Evaluar el efecto sobre el consumo de alcohol de la sobreexpresión del receptor de glicina conteniendo las subunidades  $\alpha 1$  en nAc de ratones.

### **Objetivos específicos**

3.1. Determinar las características electrofisiológicas y la configuración de subunidades del receptor de glicina presentes en el VTA y PFC de ratones WT y KI  $\alpha 1$ .

3.2. Determinar los efectos de sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 1$  WT del receptor de glicina en nAc de ratón KI $\alpha 1$  sobre las propiedades del receptor y el consumo y preferencia al alcohol.

3.3. Caracterizar la sobreexpresión del receptor  $\alpha 1$ KI en nAc MSNs de ratones D1-Cre, sobre las propiedades del receptor y su efecto sobre el consumo y preferencia al alcohol.

## 4. Materiales y métodos

4.1. Evaluación de la expresión de pAAV-mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT-eGFP y pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine en células PC-12.

Células PC12 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) a una concentración final del 5%, suero de caballo (HS) suplementado a una concentración final del 5% y penicilina/estreptomicina a una concentración final del 1%. Las células se mantuvieron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y fueron utilizadas a una confluencia de ~80%. Para la transfección, en primer lugar, las células son cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 1 cm de diámetro, pre tratado con polilisina para favorecer la adherencia de las células al vidrio. Las células fueron transfectadas con lipofectamina 2000 a una concentración de 0.5  $\mu$ L por cada  $\mu$ g de plásmido, incubada por separado en 100  $\mu$ L Optimem y polilisina y por otro lado 100  $\mu$ L de Optimem y plásmidos durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó la solución con plásmidos, se mezcló por pipeteo cuidadosamente y se incubó durante 10 minutos, para finalmente ser utilizadas 48 h post transfección. La cantidad de plásmido total fue de 2  $\mu$ g por cada pocillo de transfección, sin embargo, en el caso de co-transfecciones la proporción utilizada fue de 1.5  $\mu$ g de pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y 5  $\mu$ g de pAAV-CMV-Cre-eGFP.

4.2. Generación del plásmido

Bacterias quimiocompetentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas con los plásmidos pAAV-mDlx-GFP, adquirido de forma comercial de Addgene (#83900), la secuencia del plásmido inserto fue diseñado según los requerimientos para conseguir la ligación de la secuencia del receptor de glicina dentro del plásmido pAAV-mDlx-GFP, y posteriormente fue adquirido de manera comercial. Los plásmidos fueron extraídos mediante un Kit comercial

(E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II). Los plásmidos fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción BglIII y BstXI, utilizando el buffer NEBuffer 3.1, utilizando el protocolo estipulado por la empresa. Posteriormente los plásmidos digeridos fueron cargados en un gel de agarosa al 0.8% y corridos a 90 mV durante 40 minutos. Las bandas de interés fueron aisladas y purificadas con un kit comercial de extracción de DNA de gel de agarosa, para la eventual ligación. La ligación se realizó utilizando una enzima ligasa T4 (Merck) y el medio correspondiente a 16°C durante 16 horas. Los candidatos de ligación fueron redigeridos y cargados en un gel de agarosa, y posteriormente purificados y transfectados en células PC-12, para evaluar su actividad mediante electrofisiología.

#### 4.3. Animales

El cuidado de los animales y los protocolos experimentales de este estudio fueron aprobados por los Comités Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Concepción, de Pittsburgh y del NIH, y siguen las guías para los cuidados y protocolos éticos de animales de experimentación establecidos por el NIH (*National Institute of Health, Maryland, USA*). Los ratones *Wild Type* (WT), *Knock In* del receptor de glicina  $\alpha 1$  (KI $\alpha 1$ ), *Knock In* del receptor de glicina  $\alpha 2$  (KI $\alpha 2$ ) y *Knock Out* del receptor  $\alpha 2$  (KO  $\alpha 2$ ), de 45-90 días post natales. Los ratones fueron alojados en grupos de 2-4 ratones, en ciclos de luz/oscuridad de 12 h, y se les otorgó agua y comida *ad libitum*. Se utilizaron ratones machos y hembras de las cepas C57BL/6J (WT), GlyR $\alpha 2$ -deficient ( $\alpha 2$  KO) y GlyR $\alpha 1$ -point-mutated ( $\alpha 1$  KI) (Aguayo et al., 2014; Avila et al., 2013b; Zeilhofer et al., 2005) para la experimentación de más de 60 días postnatales. La cruce WT inicial se obtuvo a partir de un macho y una hembra de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) (IMSR Cat# JAX:000664, RRID:IMSR\_JAX:000664). Los ratones KI $\alpha 1$  y KO $\alpha 2$  tienen una base de C57BL/6J descrita en los trabajos de Avila et al., 2013 a,b; Aguayo et al., 2014; Muñoz et

al., 2018. El ratón knock-in  $\alpha 1$  KK385-386AA ( $KI\alpha 1$ ) fue generado inicialmente por el laboratorio del Dr. Gregg E Homanics (Aguayo et al., 2014), utilizando la estrategia descrita en (Skvorak et al., 2006) (IMSR Cat# JAX:023516, RRID:IMSR\_JAX:023516). Las cruces se trajeron del laboratorio del Dr. Homanics en Estados Unidos a Chile, donde han sido reproducidas y mantenidas en ciclos de 12-h luz/oscuridad. El modelo de ratón que carece de la subunidad  $\alpha 2$  de los GlyRs ( $KO\alpha 2$ ) se generó inicialmente en el laboratorio de del Dr. Harvey y el Dr. Dear mediante la eliminación del exón 7 en el gen *Gira2* (Avila et al., 2013b). Las cruces se transfirieron desde el laboratorio del Dr. Rigo en Bélgica a Chile, donde han sido reproducidas y mantenidas en ciclos de 12-h luz/oscuridad (IMSR Cat# JAX:000664, RRID:IMSR\_JAX:000664). La genotipificación de esta cepa  $KO\alpha 2$  se encuentra descrita en el trabajo de Avila et al., 2013a. Todos los animales utilizados en este trabajo se obtuvieron cruzando machos hemicigotos (*Gira2*- $\gamma$ ) y hembras homocigotas (*Gira2*-/+).

#### 4.4. Preparación de neuronas disociadas

Para la preparación de neuronas disociadas los ratones fueron decapitados como está descrito en el estudio de Jun y colaboradores en el año 2011 (Jun et al., 2011). Brevemente, los ratones fueron inducidos en anestesia con una cámara saturada por isofluorano, inmediatamente después el cerebro fue extraído rápidamente, y sumergido en una solución de corte (compuesta por sacarosa 194 mM, NaCl 30 mM, KCl 4.5 mM,  $MgCl_2$  1 mM,  $NaHCO_3$  26 mM,  $NaH_2PO_4$  1.2 mM, and glucosa 10 mM (pH 7.4), saturada con 95%  $O_2$  y 5%  $CO_2$ ) durante 30 minutos. El cerebro fue adherido a la placa fría del vibratomo (Leica VT1200S, Alemania) utilizando pegamento de cianoacrilato y cortado en rebanadas de 300  $\mu$ M. A continuación, las rebanadas se transfirieron a solución de líquido

cefalorraquídeo artificial, aCSF (compuesto por NaCl 124 mM, KCl 4.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucosa 10 mM, y CaCl<sub>2</sub> 2 mM (pH 7.4 y 310–320 mOsm) saturado con 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> a 30°C por 1 h. Transcurrida 1 hora se incubaron las rebanadas, que contienen la región de interés de estudio (PFC, nAc o VTA), en una solución de aCSF y pronasa (una proteasa débil) a una concentración de 0.4 mg/ml durante 30 minutos a 37°C para la disociación enzimática. La región de interés, ya sea PFC, nAc o VTA, de las rebanadas se disecó y se transfirió a una solución de trituración (compuesta por NaCl 20 mM, N-methyl-D-glucamine (NMG) 130 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM, pH 7.4 y 340 mOsm), luego fueron trituradas al pasar por distintas pipetas, p1000, p200 y por una pipeta Pasteur de vidrio pulida con mechero durante 10 veces por cada pipeta, para finalmente dejar asentar las neuronas disociadas en un pocillo de 35 mm de diámetro (Nunc ThermoFisher Scientific) por 20 minutos. Transcurrido ese periodo de tiempo las neuronas están listas para realizar los registros electrofisiológicos.

#### 4.5. Registros electrofisiológicos

Para los registros de las neuronas disociadas de PFC, nAc y VTA se utilizó la modalidad de *whole cell en voltage-clamp*, con un *holding potential* de -60 mV y a temperatura ambiente. La solución interna estaba compuesta por 120 mM KCl, 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM BAPTA, 0.5 mM NaGTP, 2.0 mM MgATP y pH 7.4, 290–310 mOsmol y la solución externa estaba compuesta por 150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosa, 10 mM HEPES y pH 7.4, 315–320 mOsm. Para la realización de las curvas concentración-respuesta, las neuronas fueron perfundidas con concentraciones crecientes de glicina (0,5-1000 μM dependiendo de la región de estudio). Para graficar las curvas concentración-respuesta, las distintas concentraciones de glicina fueron

ajustadas a la curva sigmoidea del programa Origin 6.0 (Origin Labs, USA) con la ecuación de Hill:  $I_{gly} = I_{max} (gly)^{nh} / [(gly)^{nh} + (EC_{50})^{nh}]$  (Wittekindt et al., 2001).

$$I_{gly} = \frac{I_{(gly)}^{nh}}{[gly]^{nh} + (EC_{50})^{nh}}$$

En esta ecuación  $I_{gly}$  corresponde a la amplitud de corriente inducida por la concentración de glicina  $[gly]$ ,  $I_{max}$ , corresponde a la corriente máxima de cada célula,  $nh$  es el factor de Hill y  $EC_{50}$  son las concentraciones a las cuales se produce la mitad de la respuesta máxima.

En el caso de la potenciación por etanol se utilizó el  $EC_{10-20}$  de glicina, lo que correspondió a 15  $\mu$ M para nAc, 30  $\mu$ M para PFC y 7  $\mu$ M para VTA. Se evocó la corriente en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de etanol (10, 50, 100 mM). En el caso de los registros con el análogo no hidrolizable de GTP, a la solución interna se le agregó una concentración de 2 mM de GTP- $\gamma$ -S y se realizaron mediciones activando corrientes de  $Cl^-$  con el  $EC_{10}$  de glicina en intervalos de 3 minutos, durante 15 minutos. Para los ensayos de picrotoxina, compuesto antagonista del receptor de glicina que presenta mayor afinidad por los receptores homoméricos, se utilizó el protocolo descrito en Maleeva y colaboradores en el año 2017 donde, brevemente, se evocaba con 30  $\mu$ M de glicina y luego con 30  $\mu$ M de glicina más 20  $\mu$ M de picrotoxina y a continuación 30  $\mu$ M nuevamente, y así se determinó el porcentaje de inhibición de picrotoxina en presencia de glicina, calculando la corriente evocada en presencia y ausencia de glicina. En los casos de los ensayos en neuronas dissociadas de nAc de ratones inyectados con AAVs, los registros se llevaron a cabo exclusivamente en las neuronas que presentaban la fluorescencia correspondiente a los reporteros GFP o mCitrine, en los objetivos 2 y 3 respectivamente.

#### 4.6. Inmunohistoquímica

Las rebanadas se obtuvieron como se describió anteriormente. Rebanadas coronales de 100 µm que contenían la región del nAc fueron fijadas durante 50 minutos con una solución de PFA 4% (Bioworld, USA). Transcurrido ese periodo de tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X, para a continuación ser bloquear y permeabilizar las rebanadas con una solución que contiene 10% suero de caballo y 0.3% tween 20 durante 40 minutos. A continuación se incubaron los anticuerpos durante la noche en una cámara húmeda. Los anticuerpos utilizados correspondieron a: Pan α GlyR (1:200, guinea pig; Cat No 146 308; Synaptic Systems, Alemania), MAP-2 (1:200, mouse; Cat No. 188 011, Synaptic System, Alemania), Cre (1:200 rabbit; Cat No 257 003; Synaptic Systems, Alemania), y GFP (1:200 chicken; Cat No 132 006; Synaptic Systems, Alemania). Luego las rebanadas cerebrales se lavaron con PBS 1X, para a continuación ser incubadas con los anticuerpos secundarios, los que correspondieron a: anti-guinea pig Alexa Fluor 647 Cat. No. 706-605-148, anti-chicken Alexa Fluor 488 Cat. No. 703-545-155, Cy3 anti-rabbit Cat. No. 711-166-152 o Cy3 anti-mouse Cat No. 715-165-150, Jackson ImmunoResearch, USA, diluidos 1:200 durante 2 horas en cámara húmeda en frío. Transcurrido ese periodo de tiempo se lavaron 3 veces con PBS 1X, y las rebanas se montaron en Dako (DakoCytomation, USA). Las imágenes se obtuvieron en el Centro de Microscopia Avanzada CMA de la Universidad de Concepción, y posteriormente fueron analizadas en el programa ImageJ (NIH).

## 4.7 Western blot

Se disectó el tejido de correspondiente al nAc y se homogenizó en una solución de 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M sacarosa, 10 mM NEM, cocktail inhibidor de proteasas 1X. Las muestras fueron sometidas a una electroforesis en un gel de acrilamida SDS-PAGE 10%. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y posteriormente bloqueada con una solución de TBS-0.1% Tween 20 y 5% leche descremada, durante 1 hora en agitación. A continuación se incubó con los anticuerpos primarios: anti-GlyR pan  $\alpha$  (1:500; rabbit monoclonal IgG; Cat No 146008; Synaptic Systems, Alemania), y anti-G $\beta$  (1:600; rabbit polyclonal IgG; Cat No Sc-378; Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-0.1% Tween 20, y luego se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas, anti-rabbit anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa del rabanito (HRP) en una concentración de 1:3000; goat polyclonal anti-rabbit IgG-HRP, Cat# sc-2004, Santa Cruz Biotechnology. La inmunoreactividad de las proteínas fue detectada con el ECL Plus Western Blotting Detection System (PerkinElmer, MA, USA). Los niveles de G $\beta$  se utilizaron como control de carga. Los Western blots se cuantificaron usando el programa Image J (NIH). Los datos fueron expresados en unidades relative (R.U.) al normalizar la señal de GlyR Pan  $\alpha$  dividida por la señal de G $\beta$  (GlyR Pan  $\alpha$  /G $\beta$  (RU)).

## 4.8. Comportamiento

### 4.8.1 *Drinking in the Dark*

Se utilizó el protocolo descrito en (Thiele and Navarro, 2014) para medir el consumo voluntario de etanol. Brevemente, el estudio se realizó 2 horas después de que iniciara el ciclo oscuro. Los ratones tuvieron acceso a soluciones de etanol al 15 % (v/v), durante 2

horas en los primeros 3 días del estudio, y durante 4 horas el cuarto día. Las botellas contenían una boquilla con bola de acero para evitar derrames involuntarios, las que fueron pesadas antes y después del ensayo cada día, el consumo de etanol se registró como gramos de etanol por kilogramo de peso corporal (g/kg/ 2 - 4 h)

#### 4.9. Concentración de etanol en sangre

Las muestras de sangre (20 – 50 µL) fueron recogidas de la vena facial de los ratones, 10 minutos después de terminado el test de *drinking in the dark*, el cuarto día. Las muestras frescas fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min, para separar el plasma, y la concentración de etanol en sangre o BEC, por sus siglas en inglés, se determinó utilizando un Analizador de Alcohol Analox AM1 (Analox Instruments Limited, UK).

#### 4.10. Cirugía estereotáxica

Los animales fueron inducidos en anestesia con una cámara saturada al 4% de isofluorano, posteriormente los animales se depilan y se colocan en sistema de estereotaxia Kopf, donde mediante mascarilla se administra isofluorano al 3% en oxígeno a una velocidad de 0,5L/min. El sistema de estereotaxia contiene una placa calefactora para regular la temperatura del animal. Previo a la incisión se comprobó que los animales no tuviesen reflejos y se les administró una solución de hidratación con medicamentos analgésicos (tramadol clorhidrato 5 mg/kg) y antiinflamatorios (ketoprofeno 5 mg/Kg), y esta solución se administró en los 3 días del post operatorio. Luego de comprobar que no tenía reflejos y ya administrada la medicación, se procedió a esterilizar con etanol al 70%, luego con povidona y posteriormente se realizó la incisión, se separó el tejido, dejando expuesto el cráneo, se identifica el bregma y se coloca la aguja de la jeringa para

determinar el punto de origen, luego se ajustan las coordenadas de núcleo accumbens, AP: +0.13 cm, ML:  $\pm 0.11$  cm y DV: -0.4 cm. Luego se realizó el agujero con Dremel y posteriormente se inyectó 200 nL de virus/hemisferio. Finalmente se suturó mediante el uso de histoacryl y se esperó 3 semanas antes de realizar los experimentos de comportamiento. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética institucional.

#### 4.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el test de t de Student con dos colas, pareado y no pareado. En el caso de datos con más de dos grupos o factores se utilizó el test ANOVA unifactorial o bifactorial, seguido de un test post hoc Bonferroni, utilizando los softwares Origin 6 (Microcal, Inc., Massachusetts, USA) o GraphPad Prism 6. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SEM. n.s. no significativo, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

## 5. Resultados

### 5.1. Determinar las características electrofisiológicas y la configuración de subunidades del receptor de glicina presentes en el VTA de ratones WT y KI $\alpha 1$ .

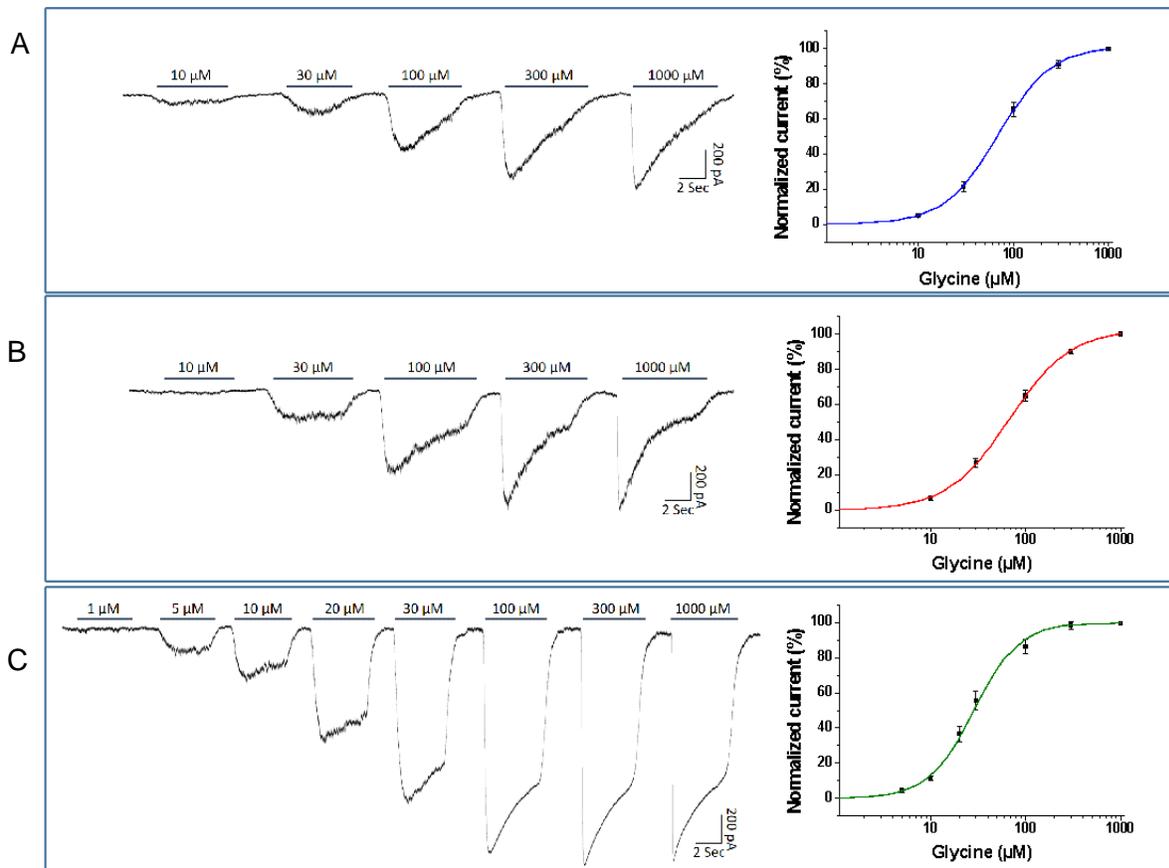
#### Justificaciones del objetivo

Para determinar la identidad de los GlyR presentes en el circuito de la recompensa cerebral se realizaron distintos estudios electrofisiológicos en neuronas disociadas de PFC, nAc y VTA, de distintos modelos murinos disponibles en el laboratorio. Estudios previos se han concentrado en caracterizar las propiedades del GlyR en el nAc. En el ratón WT se ha concluido que la configuración del GlyR corresponde a  $\alpha 1/\beta \alpha 2/\beta$ . Esto es apoyado por las propiedades electrofisiológicas y ribo tag PCR (Förster et al., 2017). En esta región, el etanol potencia la corriente en aproximadamente el 80% de las neuronas estudiadas, con especial sensibilidad en las MSN D1+ (Gallegos et al., 2019). Estudios en el animal KI  $\alpha 1$  indicó que la población de neuronas sensibles a glicina era cercana al 88% en nAc, y de este total, solo un 19% fueron sensibles a la potenciación por etanol (Muñoz et al., 2018), lo que sugiere la contribución de otras subunidades, como lo es la  $\alpha 2\beta$ . Al comparar el consumo entre el ratón KI $\alpha 1$  y el del ratón WT, se observó un mayor nivel de consumo de alcohol en los ratones KI $\alpha 1$ . En un nuevo estudio recientemente publicado utilizando otro modelo de ratón *Knock In* para la subunidad  $\alpha 2$  del receptor de glicina, ratón KI $\alpha 2$ , se confirmó que las neuronas del nAc expresan subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (Gallegos et al., 2020). Por otro lado, actualmente no se conoce que subunidades se expresan en el VTA y que pudiesen ser de importancia a los efectos del etanol. Por lo tanto, las preguntas globales de investigación son: **¿En qué configuración se encuentran los receptores de glicina en VTA?, ¿Son sensibles a la potenciación por**

**etanol estos receptores del VTA?** Como regiones comparativas se utilizarán otros centros neuronales del circuito mesolímbico como el nAc y la PFC, que también expresan receptores de glicina.

**Resultados del objetivo específico 3.1:**

En primer lugar, se realizaron curvas concentración-respuesta (Figura 5.1.1). Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de glicina, las que fueron en un comienzo 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, al encontrar que en VTA se registraba una población importante (44%, 7/16) de neuronas que presentaban una corriente de amplitud sobre los 100 pA con 10  $\mu\text{M}$  de glicina, es que se agregaron concentraciones bajas a la curva de VTA, siendo 1, 5, 10, 20, 30, 60, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$ .

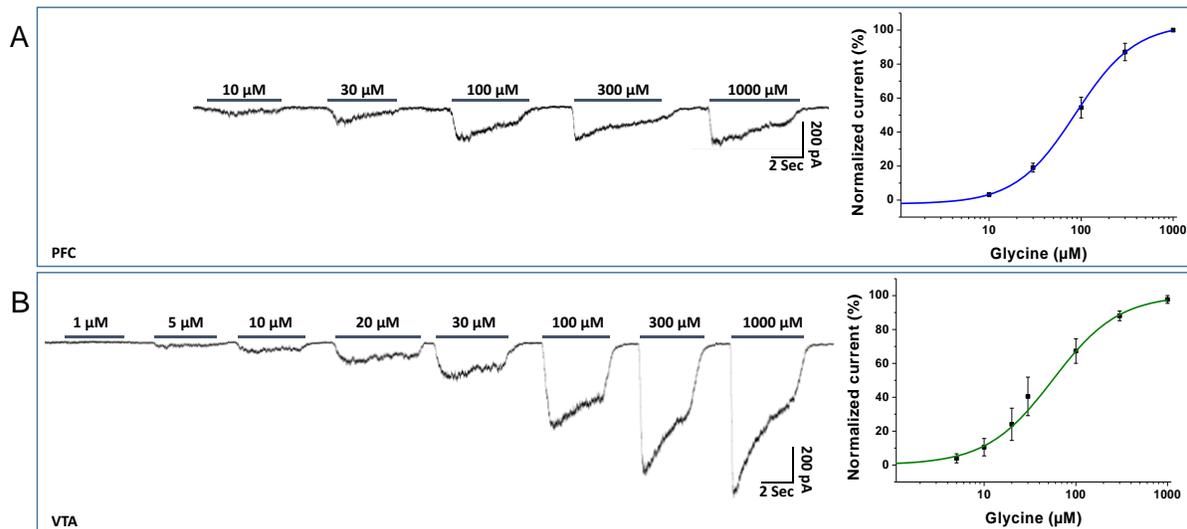


**Figura 5.1.1. Curva concentración-respuesta de glicina en neuronas disociadas del circuito de la recompensa cerebral de ratones WT.** En el panel **A)** se observa, a la izquierda, los trazos representativos de la curva de 10, 30, 100, 300 y 1000 μM de glicina en neuronas disociadas de PFC, a la derecha, se observa el gráfico de la curva, donde el EC<sub>50</sub> corresponde a 70 ± 7 μM (11 neuronas de 6 ratones). En el panel **B)** se muestran los trazos representativos de nAc, donde el EC<sub>50</sub> corresponde a 72 ± 8 (28 neuronas de 7 ratones) μM. En el panel **C)** se encuentran los trazos representativos y el grafico de la curva de VTA, donde el EC<sub>50</sub> corresponde a 30 ± 2 μM (16 neuronas de 4 ratones). Cada punto es  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ .

A partir de este ensayo podemos concluir que la sensibilidad a glicina en PFC y nAc es bastante similar, presentando un EC<sub>50</sub> de aproximadamente 70 μM, mientras que la curva de VTA se encuentra desplazada hacia la izquierda, con un EC<sub>50</sub> de 30 μM. Interesantemente, se evidenció la presencia de neuronas en VTA altamente sensibles a

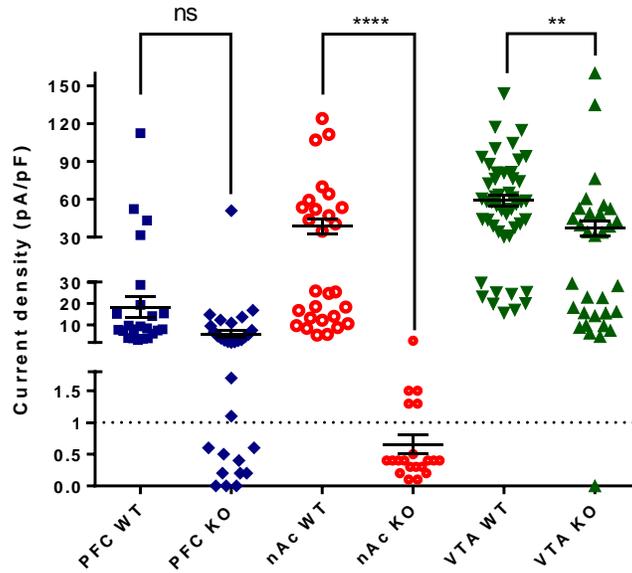
glicina, presentando corrientes a concentraciones de 5  $\mu\text{M}$ , la cual es una concentración fisiológica que se encuentra en el líquido cefalorraquídeo (Stover et al., 1997). Estos datos, por un lado, corroboran la presencia de los GlyR en el circuito de la recompensa y, por otro lado, nos indican que la expresión de los GlyR en el circuito de la recompensa no es homogénea.

Para continuar con la determinación de la identidad de los GlyR en el circuito de la recompensa, se estudió la contribución de la subunidad  $\alpha 2$ , mediante curva concentración respuesta en los distintos centros neuronales del circuito de la recompensa en un modelo de ratones KO  $\alpha 2$  (figura 5.1.2).



**Figura 5.1.2. Curva concentración-respuesta en neuronas disociadas de PFC y VTA de ratón KO $\alpha 2$ .** En el panel superior **A)** se observan, a la izquierda, los trazos representativos de la curva de 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$  de glicina en neuronas disociadas de PFC, a la derecha, se observa el gráfico de la curva concentración respuesta, de porcentaje de corriente contra las distintas concentraciones de glicina,  $n = 4$  neuronas de 2 ratones. En el panel inferior **B)** se encuentran los trazos representativos y el gráfico de la curva de VTA, con puntos de 5, 10, 20, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$ ,  $n = 9$  neuronas de 2 ratones.

Como se observa en la figura 5.1.2. las curvas concentración respuesta en el modelo de ratón KO $\alpha$ 2, similar a lo observado en el modelo WT, evidencian las diferencias entre las regiones de PFC y VTA frente a glicina, con un EC<sub>50</sub> de 87  $\pm$  15  $\mu$ M para PFC y 56  $\pm$  11  $\mu$ M para VTA. Este considerable cambio entre el EC<sub>50</sub> registrado en el VTA del ratón KO $\alpha$ 2 en comparación al registrado en el modelo WT, puede explicarse debido a las compensaciones a nivel neuronal, induciendo la expresión de otras subunidades en el VTA de este modelo KO $\alpha$ 2. Adicionalmente se observó que el EC<sub>50</sub> en PFC y VTA se desplazaba a la derecha con respecto al del ratón WT, lo que puede deberse a mecanismos compensatorios de este modelo genéticamente modificado. Alternativamente, se puede sugerir que los cambios representan modificaciones de la conformación, por ausencia de  $\alpha$ 2. Sin embargo, en nAc en ninguna de las neuronas registradas fue posible realizar una curva concentración respuesta, debido a que frente a concentraciones saturantes de 1000  $\mu$ M de glicina las corrientes evocadas fueron de muy baja amplitud o habitualmente no había expresión. Estos resultados se expresaron con un análisis de densidad de corriente que muestra que en PFC, y especialmente en el nAc, la respuesta fue reducida (Figura 5.1.3). En el VTA, por otro lado, no hubo efectos de la eliminación de la subunidad.



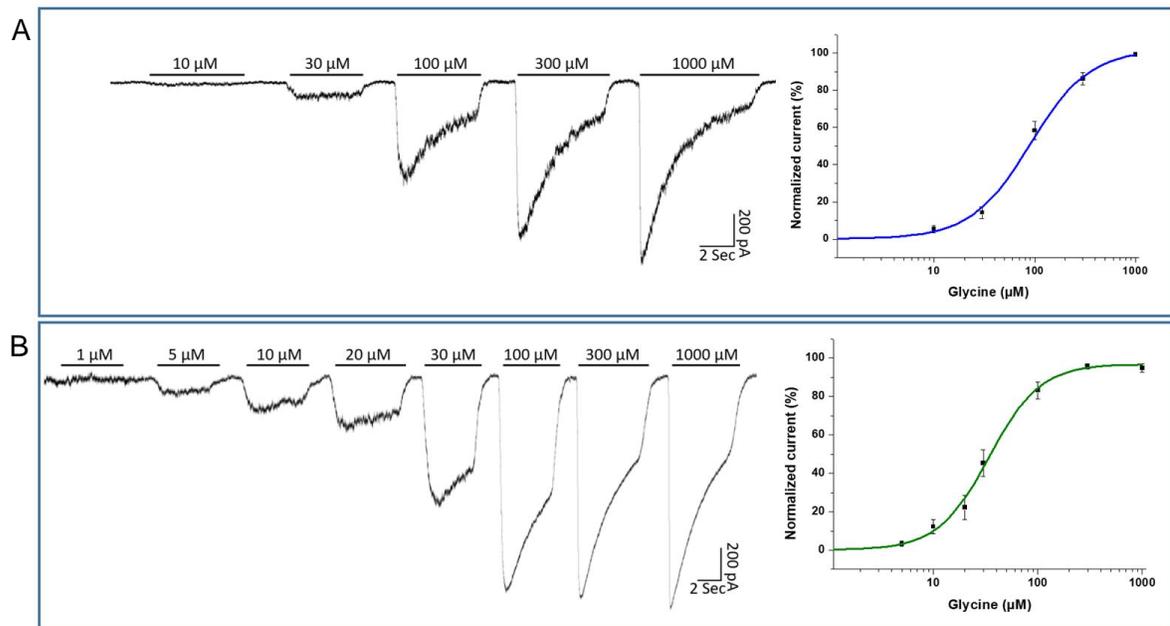
**Figura 5.1.3. Análisis de densidad de corrientes de las regiones del circuito de la recompensa de ratones WT y KO $\alpha$ 2.** De derecha a izquierda se observa la comparación de las densidades de corrientes de cada centro neuronal de ratones WT vs KO. El análisis de densidad de corriente permite determinar la corriente máxima y normalizar por el tamaño y densidad de receptores presentes en las neuronas. (\*\*) $P < 0.01$ , (\*\*\*) $P < 0.001$ , (\*\*\*\*) $P < 0.0001$ , ANOVA unifactorial con test post hoc de comparación múltiple de Bonferroni. Cada uno de los símbolos corresponden a: cuadrado azul PFC WT ■, rombo azul PFC KO ◆, Círculo rojo vacío nAc WT ○, círculo rojo completo nAc KO ●, triángulo verde hacia abajo VTA WT ▼y hacia arriba VTA KO ▲.

Más específicamente, en el caso de PFC es posible ver que, si bien el  $EC_{50}$  se mantiene al comparar WT y KO  $\alpha$ 2, existen dos poblaciones, unas neuronas que responden a glicina y otras que no, similar a lo observado en las neuronas de nAc.

Estos resultados indican que existen diferencias en las subunidades de los receptores de glicina presentes en el circuito de la recompensa. Interesantemente, a pesar que en este modelo de ratón no está expresada la subunidad  $\alpha$ 2, en el VTA prácticamente no se

observaron poblaciones de neuronas que no respondieron a glicina, como si las hubo en PFC y nAc, sugiriendo una mayor proporción de  $\alpha 1$  en VTA.

Para tener otro modelo de comparación, se analizaron las corrientes evocadas por las neuronas dissociadas de PFC y VTA del modelo de ratón  $Kl\alpha 1$ , el modelo insensible a la potenciación por etanol y que presenta un fenotipo bebedor. La curva concentración respuesta se muestra en la figura 5.1.4.



**Figura 5.1.4. Curva concentración-respuesta en neuronas dissociadas de PFC y VTA de ratón  $Kl\alpha 1$ .** A) Se observan, a la izquierda, los trazos representativos de la curva de 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$  de glicina en neuronas dissociadas de PFC, a la derecha, se observa el gráfico de la curva concentración respuesta, con  $n = 11$  neuronas de 2 ratones. B) En el panel inferior se encuentran los trazos representativos y el gráfico de la curva de VTA, con puntos de 5, 10, 20, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$ , con un  $n = 14$  células de 6 ratones.

De acuerdo a los resultados obtenidos por la curva concentración respuesta en el modelo de ratón  $Kl\alpha 1$ , donde el  $\text{EC}_{50}$  de PFC correspondió a  $90 \pm 9 \mu\text{M}$  y para VTA  $34 \pm 4 \mu\text{M}$  de glicina. Estos resultados están en línea con los observados en WT ( $70 \pm 7 \mu\text{M}$  y  $30 \pm$

2  $\mu$ M respectivamente) y muestran que no existe diferencias de expresión de subunidades en este modelo transgénico. Estos y otros resultados fueron resumidos en la tabla 1, donde se analizaron los valores obtenidos de las curvas de los distintos modelos de ratón en las regiones de PFC y VTA.

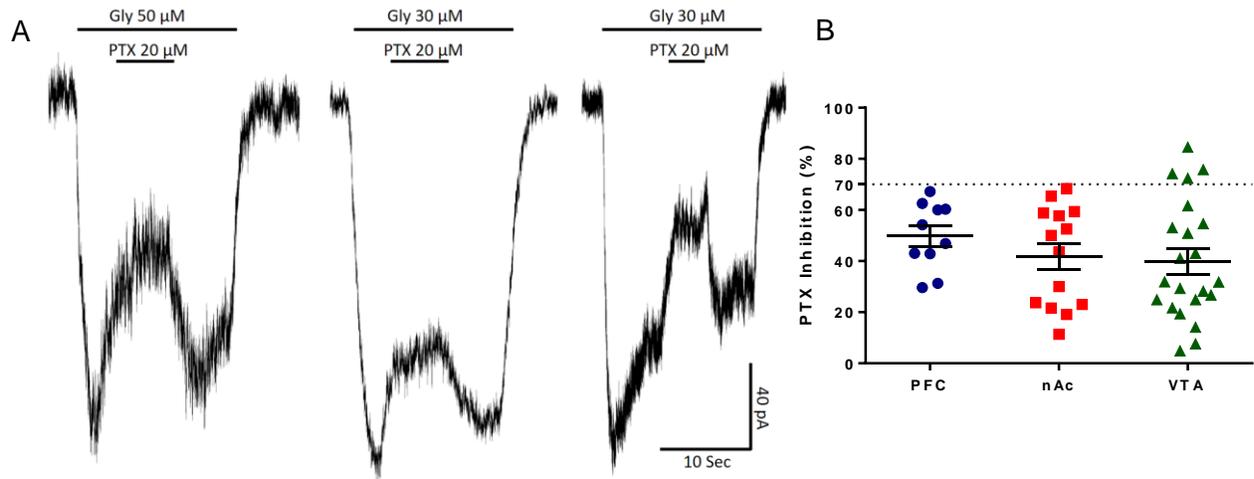
	VTA			PFC		
Mouse	WT	KI $\alpha$ 1	KO $\alpha$ 2	WT	KI $\alpha$ 1	KO $\alpha$ 2
Glycine EC <sub>50</sub>	30 $\pm$ 2 (n=16)	34 $\pm$ 4 (ns) (n=14)	56 $\pm$ 11 (**) (n=9)	70 $\pm$ 7 (n=11)	90 $\pm$ 9 (ns) (n=11)	87 $\pm$ 15 (ns) (n=4)

**Tabla 1. Comparación de las Curvas Concentración-Respuesta de los distintos modelos murinos en VTA y PFC.**

Al comparar las curvas concentración-respuesta en VTA solo en el modelo del ratón KO $\alpha$ 2, pero no el modelo KI $\alpha$ 1, fue estadísticamente distinto del modelo WT (P value = 0.0058 y 0.3606, respectivamente). En el caso de la comparación con PFC, tanto en el modelo KO $\alpha$ 2 como el KI $\alpha$ 1, no fueron estadísticamente distintos al modelo WT (P value = 0.2641 y 0.0947, respectivamente). Sin embargo, cabe mencionar que en el caso de PFC del ratón KO $\alpha$ 2, el número de neuronas que era posible registrar fue menor al número de neuronas registrables en VTA del mismo ratón, es por esto que la estadística no es lo suficientemente robusta como para asegurar que el EC<sub>50</sub> de PFC del ratón KO $\alpha$ 2 es similar, o no, al EC<sub>50</sub> del ratón WT.

Para determinar si los GlyR son homoméricos o heteroméricos, se realizó un ensayo con picrotoxina (figura 5.1.5). Los receptores de glicina homoméricos presentan mayor afinidad por la picrotoxina que los receptores heteroméricos (Maleeva et al., 2017; Pribillal et al., 1992), por lo que al co-aplicar picrotoxina y glicina es posible observar una disminución en la corriente evocada por glicina, y si los receptores son homoméricos esta

disminución en la corriente evocada por glicina es aún mayor. En el caso de los GlyR heteroméricos, la corriente se ve disminuida, pero menos que en los homoméricos (80 vs 40%).

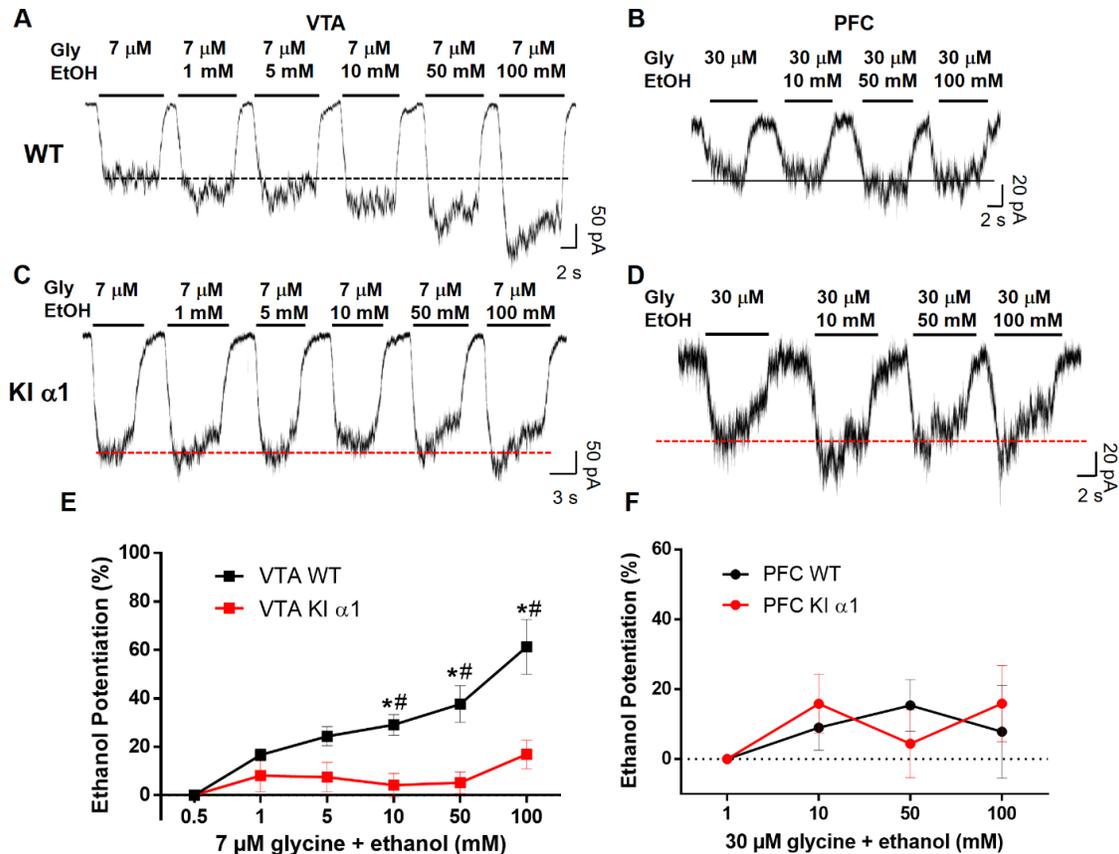


**Figura 5.1.5. Ensayo de picrotoxina en distintas regiones del circuito de la recompensa en modelo WT. A)** trazos de corriente representativos de PFC, nAc y VTA. **B)** gráfico representa el porcentaje de inhibición de la corriente evocada por glicina en presencia de la picrotoxina, en PFC en círculos azules, nAc en cuadrados rojos y VTA en triángulos verdes.

Los resultados obtenidos del ensayo de picrotoxina fueron para PFC  $50 \pm 4\%$  de inhibición ( $n=10$ ), en nAc la inhibición fue de  $42 \pm 5\%$  ( $n=14$ ) y en VTA la inhibición fue de  $40 \pm 5\%$  ( $n=22$ ). De acuerdo a la literatura, una inhibición mayor a 70% corresponde a receptores homoméricos y con una inhibición de la corriente menor a 55% son considerados heteroméricos (Maleeva et al., 2017). De acuerdo a estos resultados podemos concluir que los receptores de glicina presentes en las tres regiones del circuito mesolímbico son básicamente de carácter heteroméricos. En PFC con una tendencia a ser de carácter homoméricos al presentar en su mayoría una inhibición de la corriente mayor al 50%, en nAc una mezcla de homoméricos y heteroméricos, con poblaciones de receptores

altamente sensibles a la inhibición y otros menos afines a PTX, y en VTA también se observó una mezcla, con contribución de receptores homoméricos y heteroméricos, más disperso que las poblaciones observadas en nAc. Ninguna de las diferencias de los datos es estadísticamente significativa.

A continuación, determinamos si los GlyR presentes en el VTA de ratones WT y ratones Kl $\alpha$ 1 se potenciaban por distintas concentraciones de etanol (Figura 5.1.6.1). Las concentraciones utilizadas fueron 10, 50 y 100 mM, las cuales corresponden a 0,5, 2,3 y 4,6 g/L de alcohol en sangre, y de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país una concentración de 10 mM se considera bajo la influencia del alcohol, y se caracteriza por alegría, relajación y desinhibición social, mientras que con concentraciones superiores se considera en estado de ebriedad, como con 50 mM donde se presenta confusión mental, náusea y vómitos, o 100 mM la que corresponde a una intoxicación severa que puede llevar a coma o muerte (Ley 20580, 2012; Marin and Morais-Silva, 2017).



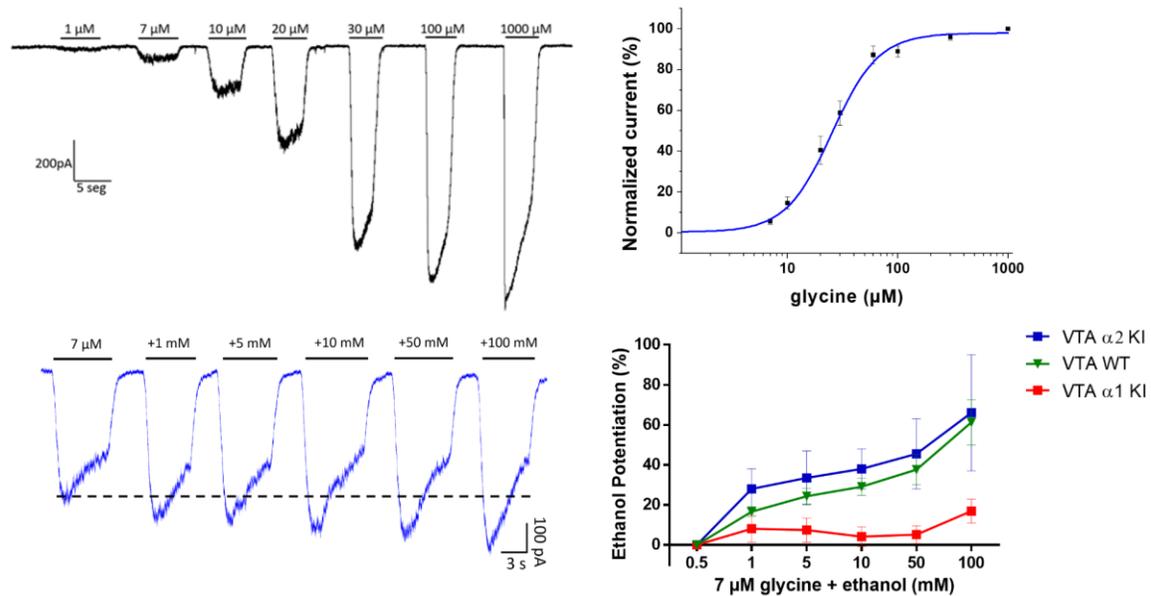
**Figura 5.1.6.1 Potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA y PFC de ratones WT y Kl $\alpha$ 1.**

**A,C)** Trazos representativos de potenciación de etanol en neuronas disociadas de VTA de ratón WT, panel superior A, y de ratón Kl $\alpha$ 1 en el panel inferior C. **B,D)** Trazos representativos de potenciación de etanol en neuronas disociadas de PFC de ratón WT, panel superior B, y de ratón Kl $\alpha$ 1 en el panel inferior D. **E)** Grafico de potenciación con distintas concentraciones de etanol frente a 7  $\mu$ M de glicina en neuronas disociadas de VTA, de ratones WT en negro y ratones Kl $\alpha$ 1 en rojo. **F)** Grafico de potenciación con distintas concentraciones de etanol frente a 30  $\mu$ M de glicina en neuronas disociadas de PFC, de ratones WT en negro y ratones Kl $\alpha$ 1 en rojo. Los datos están expresados en promedio  $\pm$  SEM. Se realizaron test post hoc Bonferroni y Two-way ANOVA, \* $p$  < 0.05 para comparar las curvas de distintos ratones. # representa el análisis de One-way ANOVA que se realizó para comparar los efectos de etanol dentro de la misma curva del mismo ratón,  $p$  < 0.05.

Los resultados obtenidos en la potenciación de etanol en ratones WT, en el caso de las neuronas de VTA fueron altamente sensibles a bajas concentraciones de etanol (1 y 5 mM). El porcentaje promedio de potenciación para 1, 5, 10, 50, y 100 mM de etanol fue:  $24 \pm 8\%$ ,  $34 \pm 10\%$ ,  $36 \pm 8\%$ ,  $47 \pm 12\%$  y  $78 \pm 19\%$  (Figura 5.1.6.1 A,E). Por otra parte, la potenciación de los receptores de glicina presentes en PFC fue muy baja, con 10, 50 and 100 mM etanol. De esta forma el efecto de potenciación promedio fue de  $9 \pm 6\%$  para 10 mM,  $15 \pm 7\%$  para 50 mM, y  $7 \pm 11\%$  con 100 mM (Fig. 5.1.6.1 B,F). Para evaluar desde otra perspectiva la contribución de la subunidad  $\alpha 1$  en los GlyRs de estas regiones, se utilizó el modelo de ratón genéticamente modificado, el ratón  $KI\alpha 1$  (Fig. 5.1.6.1 C), el cual como se mencionó anteriormente posee una mutación que atenúa el efecto de la potenciación por etanol (Aguayo et al., 2014; Muñoz et al., 2019). Los resultados en el modelo  $KI\alpha 1$  mostraron que el efecto de etanol fue significativamente atenuado en las neuronas del VTA; donde los valores de potenciación de la corriente fueron de:  $8 \pm 7\%$  con 1 mM,  $7 \pm 6\%$  con 5 mM,  $4 \pm 5\%$  para 10 mM,  $5 \pm 4\%$  para 50 mM y  $17 \pm 6\%$  para 100 mM etanol, confirmando que la subunidad  $\alpha 1$  está presente y con una alta contribución en VTA. En el caso de PFC, los resultados similares a los obtenidos en WT, las neuronas de esta región no se potenciaron de manera significativa. Los valores de potenciación obtenidos para PFC fueron de  $16 \pm 8\%$ ,  $4 \pm 10\%$  y  $16 \pm 11\%$ , respectivamente (Fig. 5.1.6.1 F).

Para corroborar la contribución de la subunidad  $\alpha 1$  en VTA se utilizó un modelo adicional el cual permitió estudiar el efecto de la mutación en la subunidad  $\alpha 2$  del receptor de glicina frente a la potenciación por etanol, para lo cual se realizó curva concentración-respuesta y registros de potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA del ratón  $KI\alpha 2$ ,

graficados en la figura 5.1.6.2.



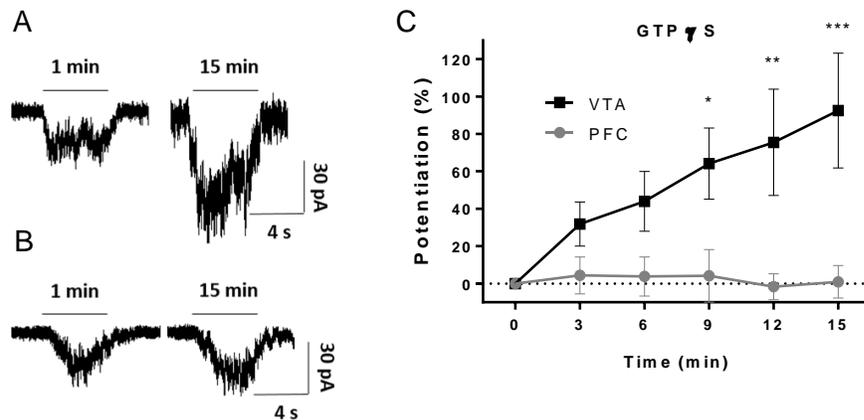
**Figura 5.1.6.2. Curva Concentración-Respuesta y Potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA de ratones Kl $\alpha$ 2.**

**A)** Trazo representativo de la curva concentración-respuesta en células disociadas de VTA de ratón Kl $\alpha$ 2. **B)** Gráfico de la curva realizada con concentraciones de glicina de 1, 7, 10, 20, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$ .  $n = 17$  células de 4 ratones distintos. **C)** Trazo representativo de la potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA de ratón Kl $\alpha$ 2. **D)** Gráfico comparativo de la potenciación por etanol en VTA de ratones Kl $\alpha$ 2 en azul, WT en verde y Kl $\alpha$ 1 en rojo.

Un antecedente adicional que refuerza la idea de la importante contribución de la subunidad  $\alpha_1$  en el VTA, corresponde a los resultados del modelo de ratón Kl $\alpha$ 2, donde  $EC_{50}$  fue de  $25 \pm 2 \mu\text{M}$ , similar a lo observado en otros modelos de estudio. De igual manera, los resultados preliminares mostraron que no hay diferencias entre la potenciación de este modelo Kl $\alpha$ 2 y WT. Los valores preliminares corresponden a  $28 \pm 10\%$  de potenciación con 1 mM de etanol,  $34 \pm 14\%$  con 5mM,  $38 \pm 10\%$  con 10 mM,  $46 \pm 18\%$  con 50 mM y  $66 \pm 29\%$  con 100 mM. La potenciación por etanol en VTA en el caso

del modelo WT presentó un efecto concentración dependiente, llegando a un 60% de potenciación en presencia de 100 mM de etanol. Similar a lo observado en el modelo de ratón  $Kl\alpha 2$ , donde se mantuvo el  $EC_{50}$  y los niveles de potenciación en esta región al compararlos con el ratón WT. Mientras que en el caso del modelo  $Kl\alpha 1$ , etanol a bajas concentraciones no causó potenciación sugiriendo la posible contribución de otras subunidades.

Para determinar que el mecanismo por el cual los receptores de glicina se ven potenciados es el mismo que el propuesto por la disociación de  $G\beta\gamma$ , se realizó el ensayo de GTP- $\gamma$ -S (figura 5.1.7). Este ensayo consiste en agregar GTP- $\gamma$ -S, un análogo no hidrolizable de GTP, en la solución interna, el que se une irreversiblemente a la proteína  $G\alpha$ , y de esta forma aumenta la disponibilidad de proteína  $G\beta\gamma$  para interactuar con el GlyR y generar la potenciación, descrito en la figura 1.3.1.



**Figura 5.1.7. Potenciación de las corrientes evocadas por glicina mediada por GTP- $\gamma$ -S en VTA y PFC en ratones WT. A)** corresponde a trazos representativos de las corrientes evocadas por 7  $\mu$ M de glicina en VTA al tiempo 1 minuto y a los 15 minutos de la formación del sello. **B)** corresponde a los trazos representativos de PFC a tiempo 1 minuto y 15 minutos evocados con 30  $\mu$ M. **C)** El gráfico muestra la potenciación de GTP- $\gamma$ -S comparando las regiones de VTA vs PFC del ratón WT.

La diálisis de GTP- $\gamma$ -S potenció las corrientes activadas por glicina a una concentración de 15  $\mu$ M en neuronas disociadas de VTA (Fig. 5A). Bajo esta condición, la amplitud de la corriente evocada con 15  $\mu$ M de glicina aumentó un  $93 \pm 31\%$  (cuadros negros) luego de 15 minutos de diálisis de GTP- $\gamma$ -S. Utilizando una concentración equipotente de glicina para las células disociadas de PFC, no se observó diferencias significativas, con una potenciación del  $1 \pm 9\%$  (círculos grises) luego de 15 minutos de diálisis de glicina a una concentración de 30  $\mu$ M (Fig. 5B). Las curvas de la figura 5C muestran que la potenciación de las corrientes activadas por glicina solo ocurre en VTA, manteniéndose estables en el caso de PFC. Esta potenciación observada en VTA es similar a los valores observados en reportes previos utilizando GlyRs  $\alpha 1$  recombinantes (Yevenes et al., 2003). Por otro lado, la ausencia del efecto potenciador en PFC sugiere que las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  se expresan en mayor medida que la subunidad  $\alpha 1$  de los GlyRs en las neuronas de la PFC.

En resumen, mediante este ensayo determinamos que la potenciación de los GlyR producida por GTP- $\gamma$ -S es similar a la producida por etanol, lo que indica que el mecanismo propuesto puede contribuir a la potenciación de los receptores de glicina, al ser en VTA concentración dependiente y en PFC insensible, similar a lo observado en la potenciación por etanol en la figura 5.1.6.1.

**5.2. Caracterizar los efectos de la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 1$  WT del receptor de glicina en nAc de ratón  $KI\alpha 1$ , sobre las propiedades del receptor y su efecto sobre el consumo y preferencia al alcohol.**

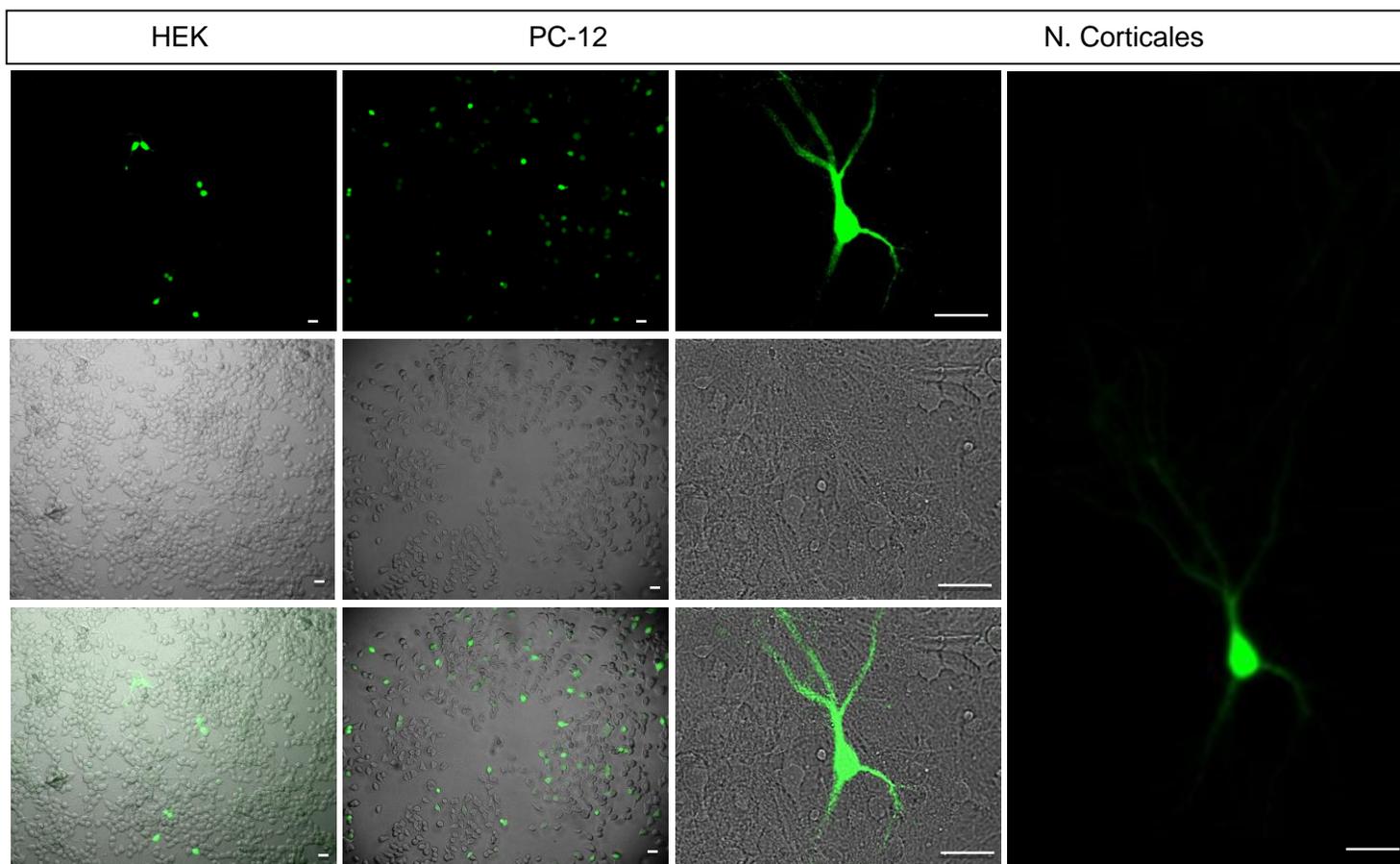
**Justificación del objetivo 3.2.**

Los resultados previos muestran que el nAc, y principalmente el VTA, expresan la subunidad GlyR  $\alpha 1$ . Por otro lado, datos recientes muestran que ratones KI globales para subunidades del receptor de glicina  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  presentan un consumo de alcohol mayor que los ratones WT. Esto sugiere que el receptor WT tendría un efecto protector sobre el consumo excesivo de etanol. Por lo tanto, **postulamos que la sobreexpresión de GlyRs WT en animales  $KI\alpha 1$ , debería recuperar la función inhibitoria del GlyR y estos ratones deberían consumir niveles menores de alcohol**, en comparación a ratones  $KI\alpha 1$  controles, inyectados con el vector vacío. Esto se puede evaluar con experimentos electrofisiológicos, bioquímicos y de comportamiento (aumento en amplitud de la corriente, expresión de GlyR a través de nivel de la señal de WB y menor consumo).

### **Diseño de vector viral para posterior inyección estereotáxica.**

Para desarrollar este objetivo fue necesario diseñar un vector viral que pudiese expresarse de manera específica en neuronas del circuito de recompensa cerebral, estas neuronas serían las MSN, las cuales tienen naturaleza GABAérgica, donde el *enhancer* mDlx es activo (Dimidschstein et al., 2016). Este enhancer se ha utilizado recientemente en estudios de corteza cerebral (Mehta et al., 2019; Wilson et al., 2017). Primero, el plásmido pAAV-mDlx-eGFP se obtuvo de forma comercial mediante Addgene (#83900). Además, el plásmido que contenía la secuencia del GlyR $\alpha$ 1WT, con los sitios de restricción correctos fue diseñado especialmente para ser sub-clonado en el vector, también se obtuvo comercialmente.

En primer lugar, se transfectaron utilizando el método de lipofectamina, ya sea células de las líneas PC12, HEK-293T, como también cultivos primarios de células corticales. En la figura 5.2.1 se evidenció que el plásmido se expresó en todas las células. En el caso de las neuronas corticales, la transfección fue la menos eficiente, pero en los casos de transfección efectiva, la señal del reportero resultaba intensa y claramente distinguible. Esto indica que el plásmido es funcional y permite la expresión del reportero.

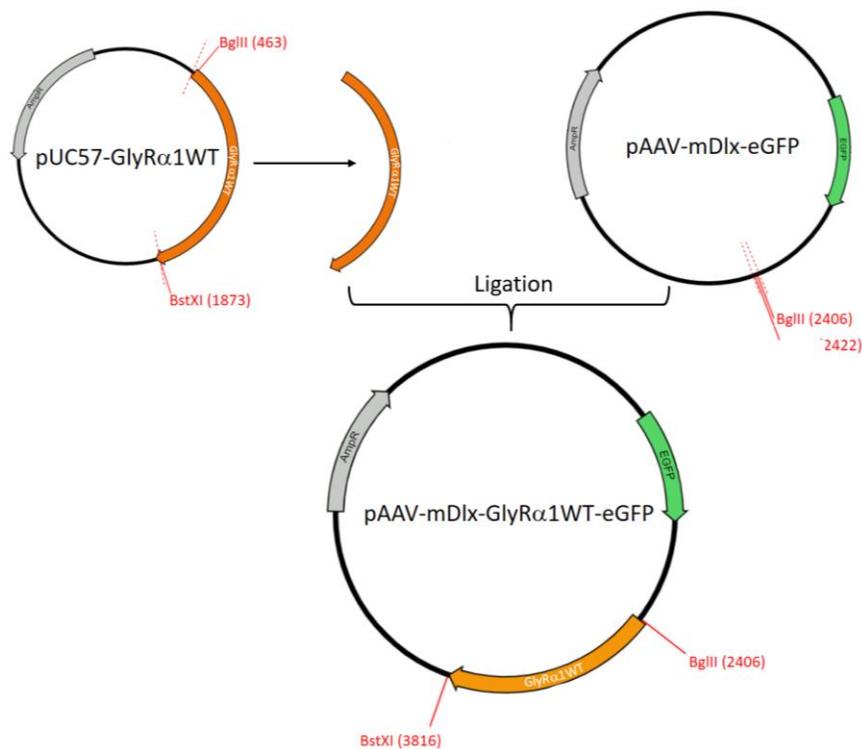


**Figura 5.2.1. Transfección de distintos tipos celulares con pAAV-mDlx-eGFP.**

De izquierda a derecha se muestran células HEK-293T, PC-12 y cultivo primario de neuronas corticales de ratón WT. La barra de calibración corresponde a 25  $\mu$ m.

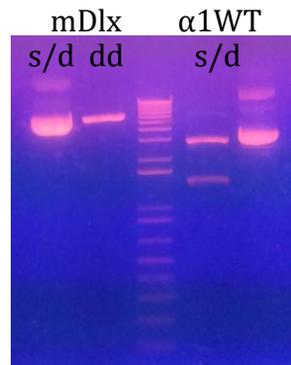
En relación a estos resultados, no podemos descartar que las líneas celulares, no diferenciadas, pudiesen presentar patrones de expresión de mDlx, similares a neuronas, como es el caso de reportes de expresión en células PC-12 de enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato descarboxilasa (GAD) (Kobayashi and Millhorn, 2001), y por otro lado están los estudios que reportaron la expresión endógena de mRNA de la subunidad  $\beta$ 3 de los receptores GABAérgicos en células HEK-293 (Davies et al., 2000)

y mRNA de las subunidades  $\beta 3$ ,  $\delta$  y  $\gamma 2$  en células PC-12 (Tyndale et al., 1994). Debido a esto será necesario realizar inmunocitoquímica en cultivos neuronales para determinar si la transfección ocurre efectivamente en neuronas GABAérgicas, utilizando anticuerpos que identifican esta población neuronal. En el estudio de Wilson et al., 2017 comprobaron que el *backbone* de este plásmido se expresa de manera preferencial en neuronas con marcadores GABAérgicos. Es debido a esto que avanzamos con el subclonamiento del receptor de glicina en este vector. El subclonamiento se realizó mediante el uso de las enzimas de restricción BgIII y BstXI como se observa en la figura 5.2.2.



**Figura 5.2.2. Esquema de trabajo para subclonamiento.** En el panel superior se observa, a la derecha el Vector pAAV-mDlx-eGFP, y a la izquierda el plásmido de transporte que contiene la secuencia del GlyRα1WT en naranja (inserto), con los sitios de restricción destacados en rojo, y en el panel inferior el clon de interés, pAAV-GlyRα1WT-mDlx-eGFP.

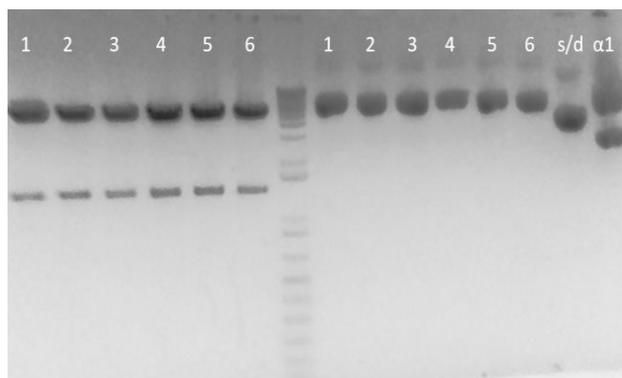
Para la obtención del clon en primer lugar se realizaron doble digestiones de los plásmidos pAAV-mDlx-eGFP (mDlx) y el plásmido transporte pUC57-GlyR $\alpha$ 1WT ( $\alpha$ 1WT), donde el plásmido pUC57 es un derivado del plásmido pUC19, desarrollado por la *University of California*, por eso las siglas UC, diseñado para el subclonamiento de genes de interés debido a su sitio de multiclonamiento, donde se encuentran los sitios de digestión que reconocen las enzimas de restricción BglIII y BstXI, como se observa en la Figura 5.2.3. Donde los fragmentos de interés son el de 1.406 pb, que corresponde a la secuencia del inserto GlyR  $\alpha$ 1WT y la banda del vector mDlx de 5.425 pb.



**Figura 5.2.3. Digestión de los plásmidos pAAV-mDlx-eGFP y pTransporte-GlyR $\alpha$ 1.**

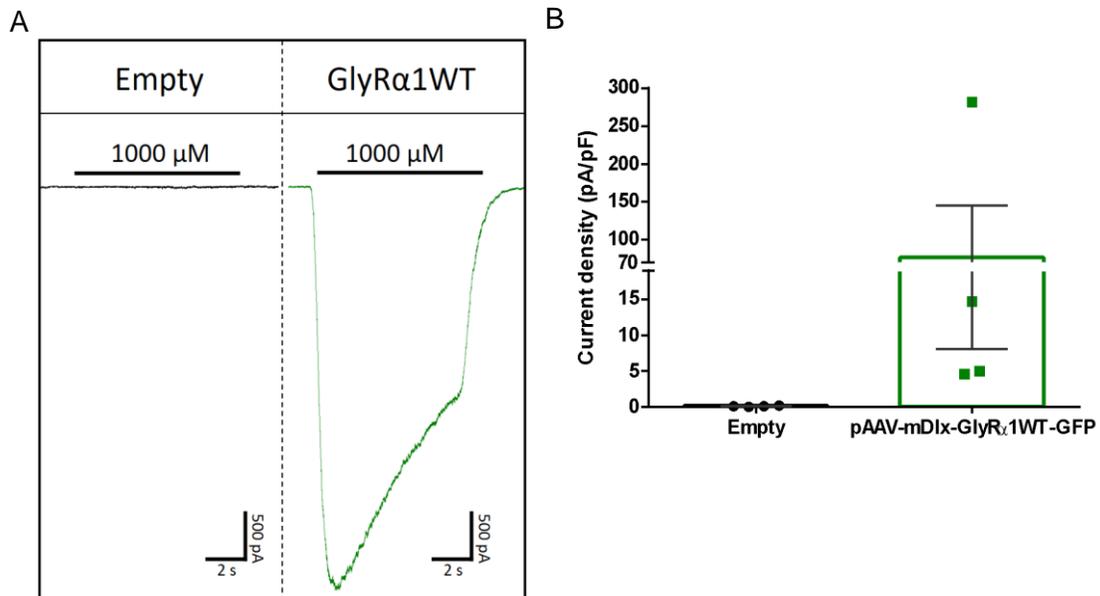
El gel de agarosa 0.8%, cargado de izquierda a derecha con el plásmido pAAV-mDlx-eGFP, sin digestión (s/d), doble digerido, *ladder* 1Kb, plásmido de transporte GlyR $\alpha$ 1WT doble digerido y sin digerir. Gel corrido por 40 minutos a 90 mV.

A continuación, se realizó la extracción y purificación de los fragmentos de DNA de interés, para luego proceder con la ligación, como se detalla en metodología, para posteriormente realizar la transformación de bacterias químicamente competentes con el resultado de la ligación, y fueron cultivadas en medio LB-agar-agar con ampicilina. Las colonias que lograron crecer en presencia del antibiótico fueron amplificadas y se realizó extracción de ADN y se cargó en un gel de agarosa al 0,8%, como se muestra en la Figura 5.2.4.



**Figura 5.2.4. Candidatos de la ligación.** Gel de agarosa 0.8% corrido por 40 minutos a 90 mVolts. Los carriles a la izquierda 1, 2, 3, 4, 5, y 6 corresponden a 6 candidatos digeridos con ambas enzimas de restricción, BglIII y BstXI, luego el *ladder* de 1Kb, y de 1, 2, 3, 4, 5, y 6 sin digestión, luego el plásmido del vector y del inserto sin digerir (s/d). Al comparar el vector sin digerir corre a valores menores que los otros 6 candidatos.

Una vez obtenidos los clones con los pesos moleculares esperados se procedió a la evaluación de su funcionalidad mediante electrofisiología, esperando ver que la aplicación de glicina a una célula produciría una corriente de Cl<sup>-</sup>. Para ello se transfectaron células PC12 con un clon denominado pAAV-mDlx -GlyR $\alpha$ 1WT -GFP (Fig. 5.2.5). La figura muestra que la aplicación de 1000  $\mu$ M produjo una respuesta con alta amplitud y densidad de corriente, mientras que el control no mostró ninguna respuesta.



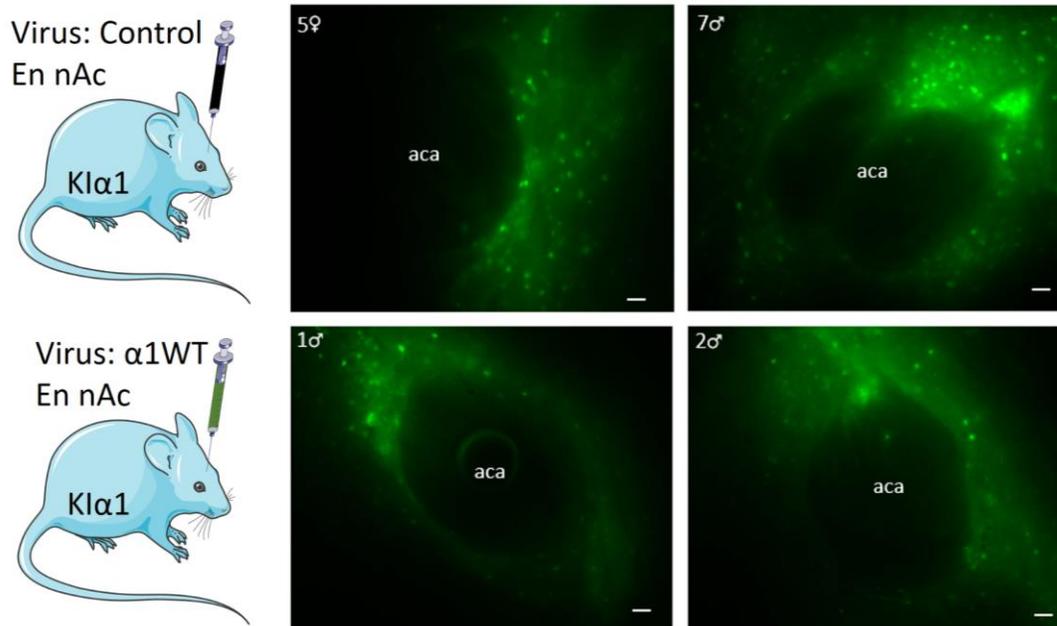
**Figura 5.2.5. Registros electrofisiológicos del clon pAAV-mDlx-GlyRα1-eGFP en células PC12.** Células transfectadas con el plásmido pAAV-GlyRα1WT-mDlx-GFP fueron registradas en la modalidad de whole cell con un holding potential de -60 mV. A) De derecha a izquierda se observan los trazos representativos de corrientes máximas de células activadas con 1000 μM glicina, A) trazos representativos de corrientes máximas de las células PC12, a la derecha células positivas a la transfección, discriminadas por el reportero fluorescente verde GFP, las células transfectadas con virus control vacío con plásmido pAAV-mDlx-GFP en negro y con el virus pAAV-mDlx-GlyRα1WT-GFP a la derecha en verde. B) El gráfico muestra el análisis de la densidad de corriente en pA/pF de las células transfectadas con pAAV-mDlx-GFP control y AAV-GlyRα1wt-mDlx-GFP, respectivamente.

Una vez que se determinó que el clon era funcional, es decir podía expresar un receptor de GlyR activo, el siguiente paso fue empaquetar los virus, para lo cual realicé una pasantía de 10 semanas en el laboratorio de la Dra. Mary Kay Lobo, en Baltimore,

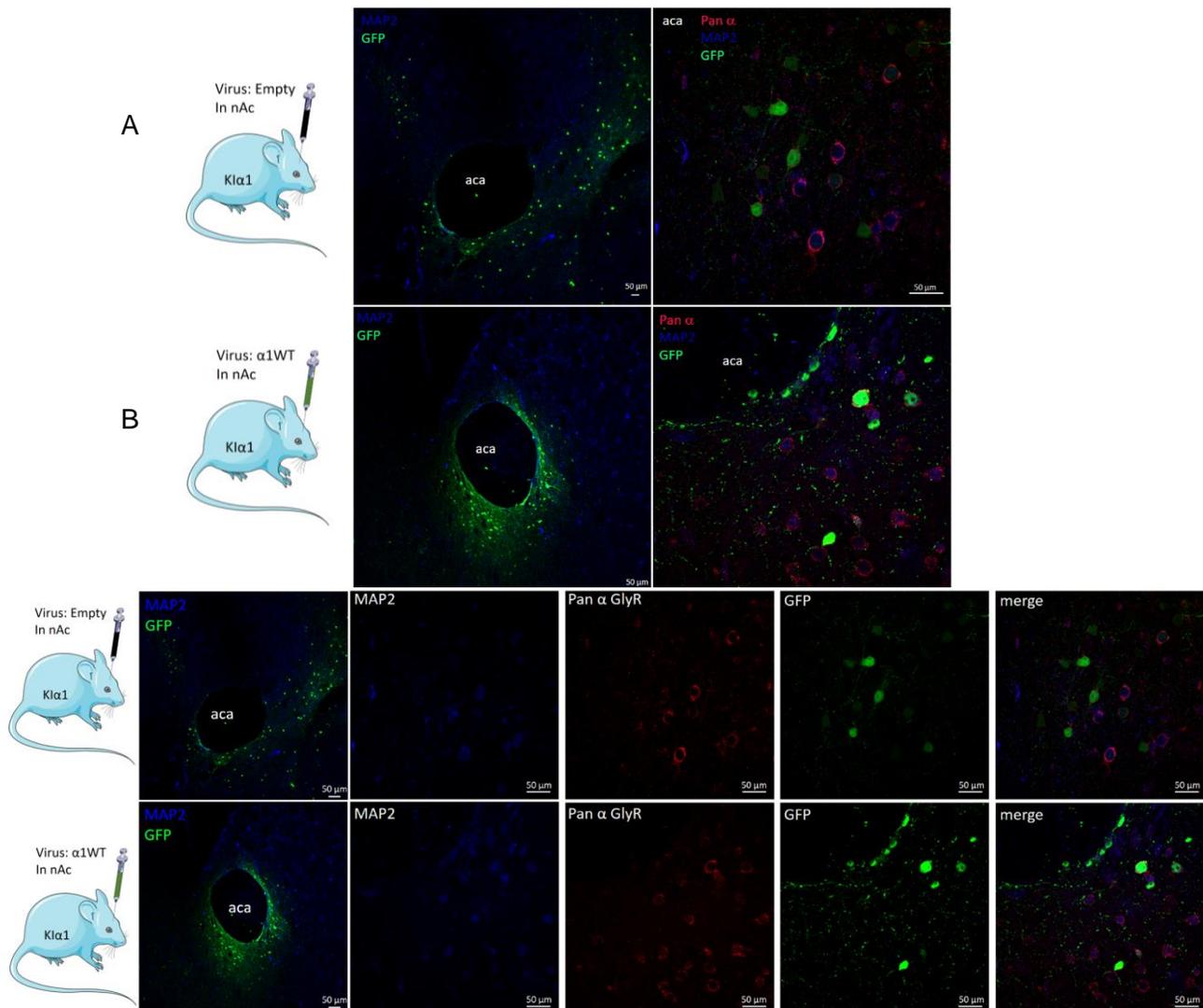
Maryland. Los virus fueron empaquetados utilizando el serotipo 9 y su título viral fue para AAV-mDlx-GFP de  $2.6 \times 10^{13}$  partículas virales/mL y en el caso del virus AAV-GlyR $\alpha$ 1WT-GFP el título fue  $1.7 \times 10^{13}$  partículas virales/mL. Una vez que las partículas virales fueron obtenidas, el siguiente paso fue realizar la inyección estereotáxica en nAc de ratones Kl $\alpha$ 1.

#### **Inyección estereotáxica de AAV-GlyR $\alpha$ 1WT -GFP en el nAc de ratones Kl $\alpha$ 1.**

A continuación, se realizaron las cirugías para la inyección estereotáxica del virus AAV-GlyR $\alpha$ 1WT-mDlx-GFP en el nAc de ratones mutantes globales Kl $\alpha$ 1, para posteriormente realizar los ensayos de comportamiento. Se comprobó que el sitio de inyección estuviese en el sitio correcto mediante micrografías y mediante inmunohistoquímica, como se observa en las figuras 5.2.6.1 y 5.2.6.2.



**Figura 5.2.6.1 Inyección estereotáxica de los virus AAV- mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT- GFP y AAV-mDlx-GFP en nAc de ratones Kl $\alpha$ 1.** **A)** En el panel superior se muestran micrografías fluorescentes del resultado de la inyección del virus control vacío AAV-mDlx-GFP en el nAc de ratones Kl $\alpha$ 1, los ratones fueron identificados por los números 5, 6, 7 y 8. **B)** En el panel inferior se observa la señal de los ratones inyectados con el virus que contiene el receptor WT, GlyR $\alpha$ 1WT, en nAc de ratones Kl $\alpha$ 1, identificados con los números 1, 2 y 9. En ambos casos se observa señal fluorescente verde indicando inyección exitosa en el nAc, por su cercanía a la comisura anterior (aca). La barra de calibración corresponde a 50  $\mu$ m.



**Figura 5.2.6.2. Inmunohistoquímica para MAP-2 y GlyR en rebanadas post inyección estereotáxica de los virus AAV- mDlx-GlyRα1WT- GFP y AAV-mDlx-GFP en nAc de ratones Klα1.** La primera composición de figuras son las más grandes y en la composición de abajo: De izquierda a derecha se ve en 10x la comisura anterior (aca), y la marca de MAP2 en azul y en verde la señal de GFP. En el panel superior se muestran inmunohistoquímica del resultado de la inyección del virus control vacío AAV-mDlx-GFP en el nAc de ratones Klα1, con marca de anticuerpo Anti-MAP2 en azul, el receptor de glicina con un anticuerpo que marca todas las subunidades α en rojo con el anticuerpo Anti-GlyR Pan α, y en verde la señal de GFP en verde, con un anticuerpo Anti-GFP. **B)** En el panel inferior se observa la señal de los ratones inyectados con el virus que contiene el receptor WT, GlyRα1WT, en nAc de ratones Klα1. En ambos casos se observa señal

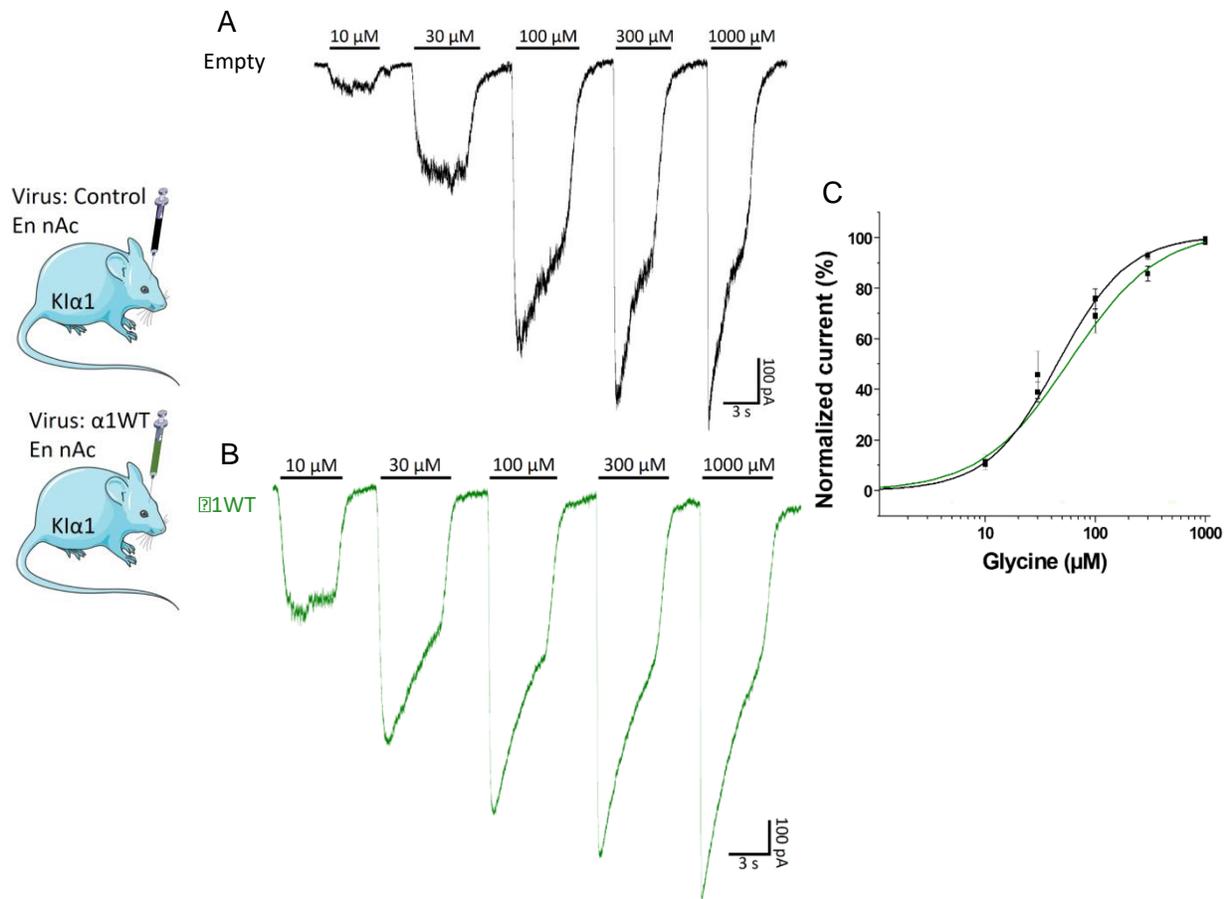
fluorescente verde indicando inyección exitosa en el nAc, por su cercanía a la comisura anterior (aca). La barra de calibración corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

En resumen, fue posible inyectar y expresar la secuencia que codifica para el receptor de glicina o el control vacío en el nAc de ratones Kl $\alpha$ 1.

### **Registros electrofisiológicos de neuronas disociadas de ratón Kl $\alpha$ 1 expresando el GlyR $\alpha$ 1WT**

A continuación, se procedió a realizar registros electrofisiológicos para determinar que las neuronas infectadas con el AAV tenían corrientes de Cl<sup>-</sup> correspondientes a lo esperado de la sobre-expresión del GlyR $\alpha$ 1WT. En general se esperaba que las células infectadas con el vector vacío expresen el GlyR KI nativo, es decir con un receptor insensible a la potenciación por etanol (Aguayo et al., 2014; Muñoz et al., 2019). Para realizar estos registros se realizó la disociación de neuronas de nAc de estos ratones inyectados, como se describe en materiales y métodos 4.4. y posteriormente se realizaron registros electrofisiológicos de curva concentración-respuesta, Figura 5.2.7, y potenciación por etanol, Figura 5.2.9, exclusivamente en las neuronas con fluorescencia verde positiva, ya que tanto el virus que codifica para el receptor GlyR $\alpha$ 1WT, como el virus control vacío, presentan el reportero fluorescente verde.

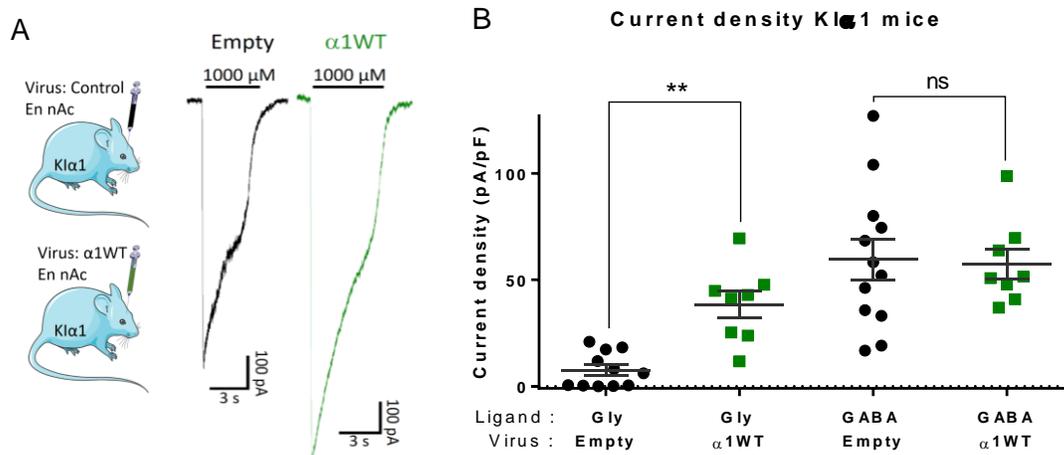
Como se observa en las figuras 5.2.7. las corrientes obtenidas en ambos casos generaron una curva concentración respuesta similar, con valores de EC<sub>50</sub> de  $45 \pm 4 \mu\text{M}$  con el virus control vacío (en negro) y con un EC<sub>50</sub> de  $58 \pm 10 \mu\text{M}$  con el virus que codifica para GlyR $\alpha$ 1WT (en verde).



**Figura 5.2.7 Curva Concentracion-Respuesta en neuronas disociadas de nAc de ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus AAV- mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT- GFP y AAV-mDlx-GFP. **A)** Trazos representativos en panel superior, en negro, se observan de izquierda a derecha el gráfico correspondiente a la curva concentración-respuesta, con las concentraciones 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu$ M, de ratones inyectados con virus control vacío (empty), cuyo EC<sub>50</sub> correspondió a  $45 \pm 4 \mu$ M (n=13). **B)** Trazo representativo, inferior verde, de la curva concentración-respuesta de células disociadas de nAc de ratón Kl $\alpha$ 1 inyectados con el virus que codifica para el receptor  $\alpha$ 1WT, cuyo EC<sub>50</sub> correspondió a  $58 \pm 10 \mu$ M (n=11). **C)** Grafico de las curvas concentración-respuesta de las células de nAc de ratón Kl $\alpha$ 1 inyectado con virus control vacío (verde) y virus GlyR $\alpha$ 1WT en negro.**

También se determinó si la amplitud de la corriente en neuronas  $\alpha$ 1KI transducidas con el vector vacío, y las que sobre-expresaban la subunidad  $\alpha$ 1WT del GlyR, eran modificadas. Para la amplitud normalizada al tamaño de la neurona, se utilizó el valor de

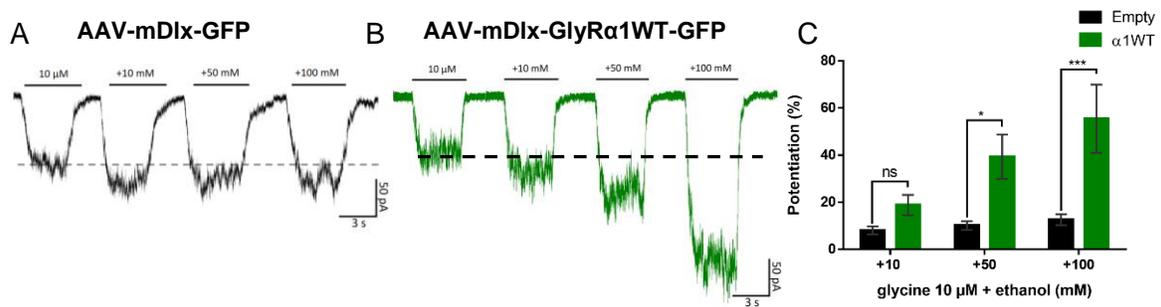
capacitancia (pF). Se observó que efectivamente la respuesta fue considerablemente aumentada. Como control se determinó medir la densidad de corriente asociada a los receptores GABA<sub>A</sub>, no encontrando diferencias entre los dos grupos y mostrando especificidad para glicina.



**Figura 5.2.8. Análisis de densidad de corriente de neuronas disociadas de nAc de ratones Klα1 inyectados con virus AAV-mDlx-GlyRα1WT-GFP y AAV-mDlx-GFP. A)** trazos representativos de corrientes saturantes de glicina (1000 μM) de neuronas disociadas de nAc de ratones Klα1 inyectados con virus control vacío, en negro, y con virus que codifica para el receptor α1WT, en verde. **B)** El grafico muestra la comparación de la densidad de corriente de glicina y GABA<sub>A</sub> entre los ratones inyectados con virus control, en negro (n=12) y virus que codifica para el receptor α1WT, en verde (n=8). Estos datos indican una sobreexpresión funcional del receptor. Los ratones fueron analizados luego de 4 semanas post inyección, y tenían una edad de entre 3 a 4 meses.

Como se muestra en la figura 5.2.8. la densidad de corriente de las neuronas disociadas de nAc de los ratones inyectados con el control vacío, versus la densidad de corriente de las neuronas inyectadas con el GlyRα1WT fue de  $7 \pm 3$  pA/pF y  $38 \pm 6$  pA/pF respectivamente, mientras que la densidad de corriente de GABA fue de  $60 \pm 10$  pA/pF y  $58 \pm 7$  pA/pF respectivamente.

A continuación, se estudió el efecto de etanol en neuronas dissociadas nAc de ratón Kl $\alpha$ 1 expresando el receptor  $\alpha$ 1 WT. Y como muestra la figura 5.2.9, los ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados presentaron corrientes de glicina que se potenciaban con las distintas concentraciones de etanol. Con 10  $\mu$ M de glicina, frente a 10 mM de etanol la corriente evocada fue de  $8 \pm 2$  % para el control y de  $19 \pm 4$ % para el GlyR $\alpha$ 1WT, frente a 50 mM la potenciación de la corriente fue de  $10 \pm 2$  % y de  $39 \pm 9$  % respectivamente y frente a 100 mM de etanol, la potenciación fue de  $13 \pm 2$  % y  $56 \pm 14$  % respectivamente.

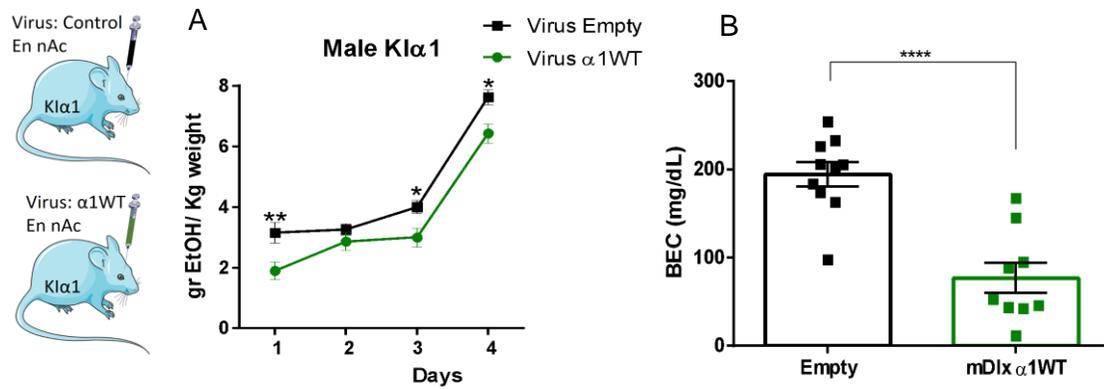


**Figura 5.2.9. Efecto del etanol en neuronas dissociadas de ratones Kl $\alpha$ 1 inyectados con virus AAV-mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT-GFP y AAV-mDlx-GFP.** **A)** muestra trazos representativos registrados en neuronas de ratones inyectados con control vacío (n=12). **B)** trazo de corriente registrado en una neurona infectada con el AAV que codifica para el receptor  $\alpha$ 1WT (n=14). **C)** el gráfico muestra el porcentaje de potenciación de 10, 50 y 100 mM de etanol utilizando 10  $\mu$ M de glicina como control para ambas condiciones.

Como ya evaluamos las diferencias que se producían a nivel celular del nAc con la inyección de los ratones de ambos grupos, luego procedimos a determinar el efecto en el comportamiento de la sobreexpresión del receptor  $\alpha$ 1WT de glicina en el nAc de ratones Kl $\alpha$ 1, el cual corresponde a un fenotipo bebedor, por lo que se realizó el ensayo de *Drinking in the Dark* (DID).

### **Estudio de Drinking in the Dark en animales inyectados.**

El ensayo de *Drinking in the Dark* se llevó a cabo según lo descrito en la metodología, modificando el ciclo de 12 horas de luz/oscuridad para tomar ventaja de la actividad nocturna de los ratones. Brevemente, a los ratones Kl $\alpha$ 1, inyectados en nAc con el virus AAV-mDlx-GlyR $\alpha$ 1WT-GFP (inyección  $\alpha$ 1WT) o con el virus AAV-mDlx-GFP (control vacío), se les cambia la hora, paulatinamente 2 horas diarias, durante 5 días y se les permite acostumbrarse 2 días al nuevo horario para hacer coincidir su vigilia en horas diurnas. Posteriormente se preparan soluciones de etanol al 15% y se agrega a las botellas del estudio. El primer día se determinó el peso inicial de los ratones y se registró el consumo de agua, para determinar la ingesta basal de líquidos, durante 2 horas. Luego, durante 3 días se llenan las botellas con la solución 15% etanol y se registra el consumo luego de 2 horas, el cuarto día se registra el consumo de 4 horas, como se observa en la Figura 5.2.10, y se extrae sangre, para determinar los niveles plasmáticos de alcohol (BEC, por sus siglas en inglés, *Blood Ethanol Concentration*), como se observa en la Figura 5.2.11.



**Figura 5.2.10. Consumo de ratones Klα1 inyectados con virus que codifica para el receptor GlyRα1WT. A)** El gráfico muestra el consumo de los machos Klα1, inyectados con el virus control vacío, en cuadrados negros, el cual debería mantener un fenotipo bebedor, y el consumo de los machos Klα1 inyectados con el virus que codifica para la subunidad α1WT del receptor de glicina, en verde, el cual debería recuperar la función del ratón WT en el nAc. comparando los gramos de consumo de etanol por Kg de peso de los ratones inyectados con virus α1WT vs el control vacío. **B)** El gráfico muestra la concentración de etanol en sangre, (BEC de sus siglas en inglés *Blood ethanol concentration*) en mg/dL de etanol.

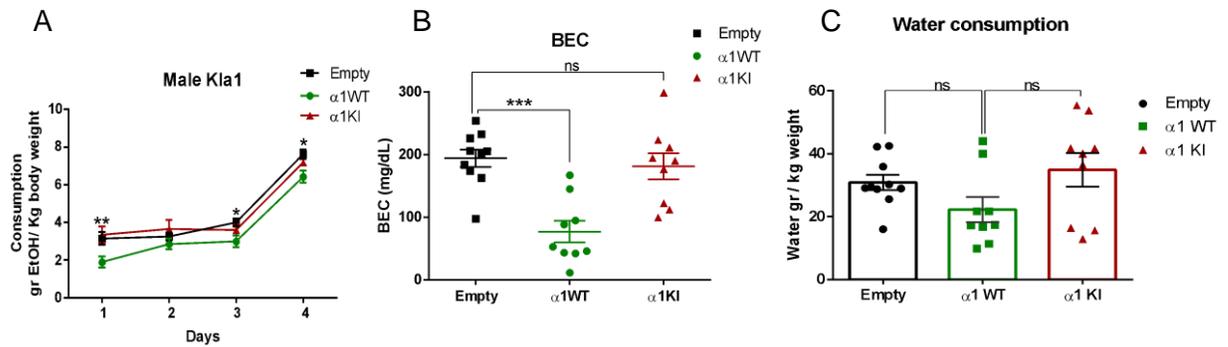
Como se observa en la figura 5.2.10. hubo diferencias significativas en el consumo de etanol. Durante los días 1, 3 y 4 los ratones del fenotipo bebedor que recuperaron la función mediante la inyección del receptor GlyRα1WT bebieron menos alcohol que los ratones de fenotipo bebedor inyectados con el virus control. Los valores de consumo del DID, utilizados para la realización de la figura 5.2.10 se encuentran resumidos y detallados en la tabla 2.

Consumo promedio gr etanol /Kg de peso							
	Tiempo	Inyección $\alpha$ 1WT			Inyección control		
		Promedio	SEM	n	Promedio	SEM	n
Machos Kl $\alpha$ 1	Día 1	1,9 (**)	0,3	9	3,2	0,3	10
	Día 2	2,9	0,3	9	3,3	0,2	10
	Día 3	3,0 (*)	0,3	9	4,0	0,2	10
	Día 4	6,4 (*)	0,3	9	7,6	0,2	10

**Tabla 2. Consumo promedio en grs. de etanol /Kg peso de los ratones Kl $\alpha$ 1 machos inyectados con virus AAV-GlyR $\alpha$ 1WT-mDlx-GFP y AAV-mDlx-GFP.**

Los valores de la tabla 2 corresponden a los consumos utilizados para la construcción del gráfico de la figura 5.2.10. Los días 1, 3 y 4 mostraron diferencias significativas de acuerdo al análisis *TWO-WAY ANOVA* con un alfa value (\*) de 0.05, con un intervalo de confianza (CI) del 95% ( $\alpha = 0.05$ , power = 0.95), que correspondiente al día 1 CI = -2,261 a -0,2537, día 2 CI = -1,399 a 0,6084, día 3 CI = -2,013 a -0,005949 y día 4 CI = -2,203 a -0,1954.

Una de las posibles explicaciones para esta disminución en el consumo de etanol, puede atribuirse al aumento del tono inhibitorio en la región del nAc al sobre-expresar un receptor inhibitorio, es por esto que como un control adicional se sobre-expresaron receptores insensibles a la potenciación por etanol en el nAc de estos mismos ratones mutantes, como se ver en la figura 5.2.11. con el objetivo de asegurar que el efecto observado es debido a la potenciación de la corriente de los GlyR $\alpha$ 1WT, y no solo que haya una mayor densidad de receptores inhibitorios en la región, y se comprobó inyectando el virus que codifica para el receptor GlyR $\alpha$ 1KI (Figura 5.2.11).



**Figura 5.2.11. Niveles plasmáticos de alcohol en ratones Klα1 inyectados con virus AAV-mDlx-GFP, AAV-GlyRα1WT-mDlx-GFP y AAV-GlyRα1KI-mDlx-GFP. A)** Gráfico del consumo de los 4 días del DID de animales Klα1 inyectados en nAc con los virus *empty* (negro), α1WT (verde) y α1KI (granate). **B)** Gráfico de la concentración en sangre de los 3 grupos de animales. **C)** Gráfico de consumo de agua de los 3 grupos. El gráfico muestra mismos datos de figura 5.2.10, y se adicionó el tercer grupo control en color granate, con el fin de poder comparar los datos de animales Klα1 inyectados con virus α1KI.

Los datos muestran que no se observaron diferencias en el consumo de etanol, ni de concentración de etanol en sangre, ni con respecto al consumo de agua entre los controles inyectados con control vacío y la cohorte inyectada con el virus que codifica para el receptor α1KI, lo que indica que el efecto protector es debido a la potenciación en este caso de los receptores de glicina α1WT.

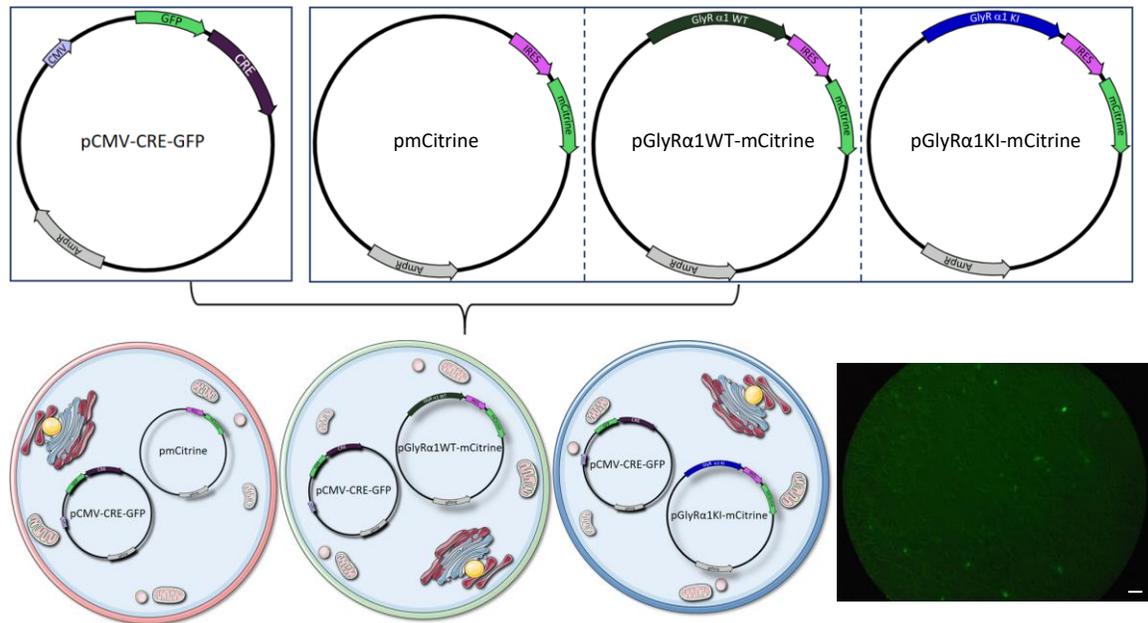
### **5.3. Caracterizar sobre-expresión de la subunidad $\alpha 1$ KI en nAc MSNs de ratones D1-Cre, las propiedades del receptor y su efecto sobre el consumo y preferencia al alcohol.**

#### **Justificaciones del objetivo III.**

Estudios previos mostraron que el ratón KI  $\alpha 1$  presenta receptores de glicina insensibles a la potenciación inducida por alcohol, además, estos animales consumen y tienen preferencia por etanol en estudios de comportamientos de DID y *conditioned place preference* (CPP) (Muñoz et al., 2019). Si el receptor de glicina presente en regiones límbicas es importante para estos caracteres fenotípicos, el comportamiento encontrado en el mutante global debería ser reproducido por expresión del receptor de glicina  $\alpha 1$ KI en el nAc de un animal WT. Como se mencionó en la introducción, la vía directa del nAc, mediada principalmente por las neuronas D1-MSN eran las responsables de los fenómenos de recompensa, es por esto que en este objetivo se pretendió inyectar un AAV-Dio-GlyR $\alpha 1$ KI-mCitrine en ratones D1-Cre para selectivamente transducir el receptor de glicina  $\alpha 1$ KI en neuronas que expresan los receptores de dopamina D1 del nAc. Y evaluar los cambios a nivel celular y de comportamiento de los ratones. Las tareas para desarrollar este objetivo están definidas de la siguiente manera:

En primer lugar, fue necesario determinar que el plásmido codifica para la correcta expresión de receptores funcionales tanto  $\alpha 1$ KI, como  $\alpha 1$ WT, en células en cultivo, para lo que se utilizaron células PC12, debido a que esta línea celular permite la expresión del plásmido, el cual presenta un promotor neuronal de sinapsina, ausente en otros modelos de líneas celulares. Para determinar la expresión se realizó una co-transfección, descrita

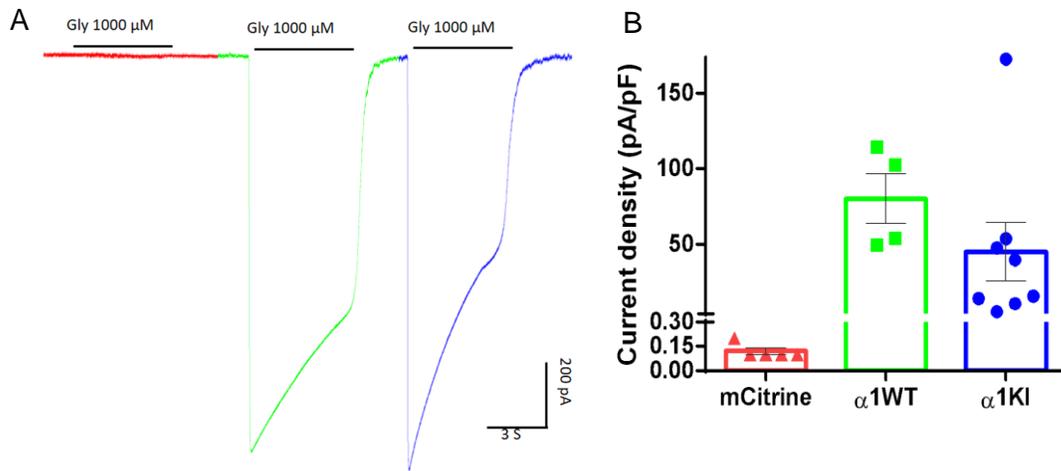
en materiales y métodos 4.1. y el esquema de la co-transfección se encuentra en la figura 5.3.1.



**Figura 5.3.1. Esquema del plásmido pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine.** Esquema muestra el protocolo experimental para la caracterización electrofisiológica del plásmido que expresa en forma selectiva del receptor GlyR $\alpha$ 1KI, bajo la actividad de la recombinasa Cre. Para esto se realizó co-transfección de células PC12 con los plásmidos que codifican para la recombinasa Cre y con los plásmidos pmCitrine control vacío, ejemplificado por una célula PC12 con membrana roja, o pGlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine, ejemplificado con una célula PC12 con membrana de color verde, o con el plásmido pGlyR $\alpha$ 1WT-mCitrine, ejemplificado con una célula PC12 con membrana color azul. En la microfotografía se observa la fluorescencia de algunas células HEK 293. La barra de calibración corresponde a 50  $\mu$ m.

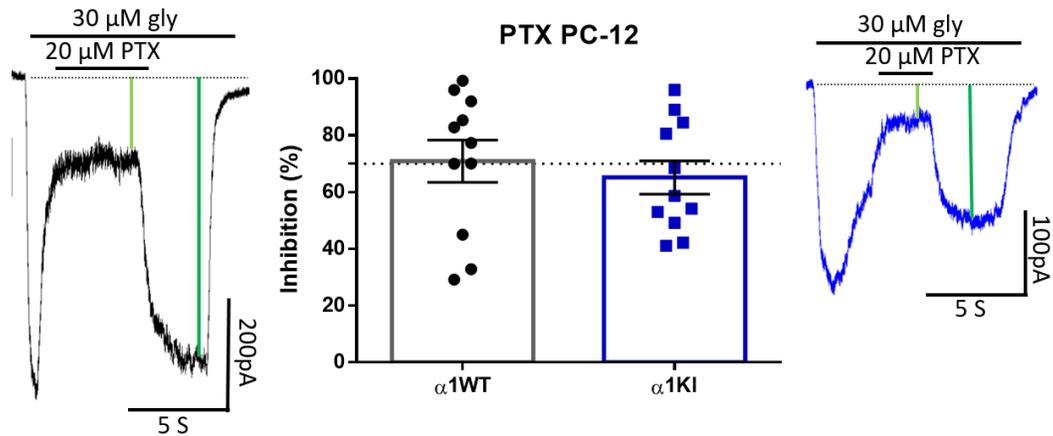
Para determinar que las células co-transfectadas que expresaban la fluorescencia verde correspondían a células que a su vez expresaban el receptor de glicina, se realizaron ensayos electrofisiológicos, registrando las neuronas que expresaban fluorescencia verde, como se muestra en la figura 5.3.2, donde se analizó la densidad de corriente de estas células. Los valores de densidad de corriente de las células PC-12 transfectadas

con los plásmidos mCitrine (control, en anaranjado), GlyR $\alpha$ 1WT (verde) y GlyR $\alpha$ 1KI (azul), corresponde a  $0.12 \pm 0.02$  pA/pF,  $80 \pm 17$  pA/pF y  $45 \pm 19$  pA/pF respectivamente.



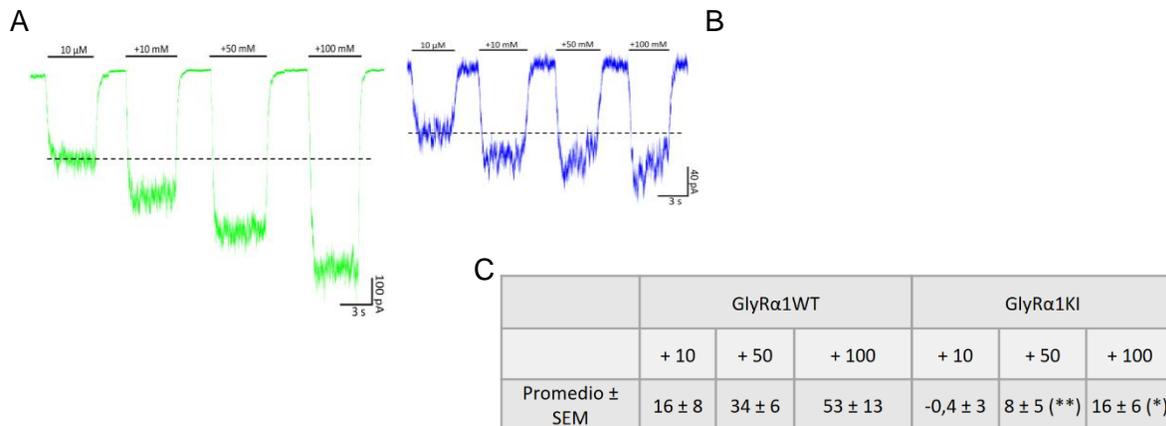
**Figura 5.3.2. Densidad de corriente en células transfectadas con plásmidos pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine, o pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1WT-mCitrine, o pAAV-DIO-mCitrine. A)** trazos representativos de las corrientes saturante de 1000  $\mu$ M de glicina en células transfectadas con virus que codifican para los receptores de glicina  $\alpha$ 1WT,  $\alpha$ 1KI y mCitrine (control vacío), de izquierda a derecha, respectivamente. **B)** Gráfico de densidad de corriente en pA/pF bajo las 3 condiciones de co-transfección.

Una vez determinado que los plásmidos expresaban corrientes de glicina, no así el control vacío, se estudió la composición de los receptores, si eran heteroméricos u homoméricos, utilizando el ensayo de picrotoxina, para lo cual se realizaron registros con 30  $\mu$ M de glicina y 20  $\mu$ M de picrotoxina, como se muestra en la figura 5.3.3. Los resultados que se obtuvieron en este ensayo arrojaron que efectivamente eran receptores homoméricos, ya que la inhibición promedio fue de  $71 \pm 8$  % para el plásmido  $\alpha$ 1WT y  $65 \pm 6$  para el  $\alpha$ 1KI, lo que se encuentra en concordancia con lo publicado por Maleeva y cols 2017.



**Figura 5.3.3. Ensayo de picrotoxina en células transfectadas con plásmidos pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1WT-mCitrine y pAAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine. A,C) trazos de corriente activada por 30  $\mu$ M de glicina y el efecto inhibitor de 20  $\mu$ M de PTX, en negro corresponden a  $\alpha$ 1WT y azul a  $\alpha$ 1KI. B) El gráfico muestra el porcentaje de inhibición frente a la picrotoxina ( $I_{\text{control}}-I_{\text{ptx}}$ ). Para  $\alpha$ 1WT el porcentaje de inhibición fue de  $71 \pm 8$  % y para  $\alpha$ 1KI fue de  $65 \pm 6$  %, ambos corresponden a conformaciones homoméricas.**

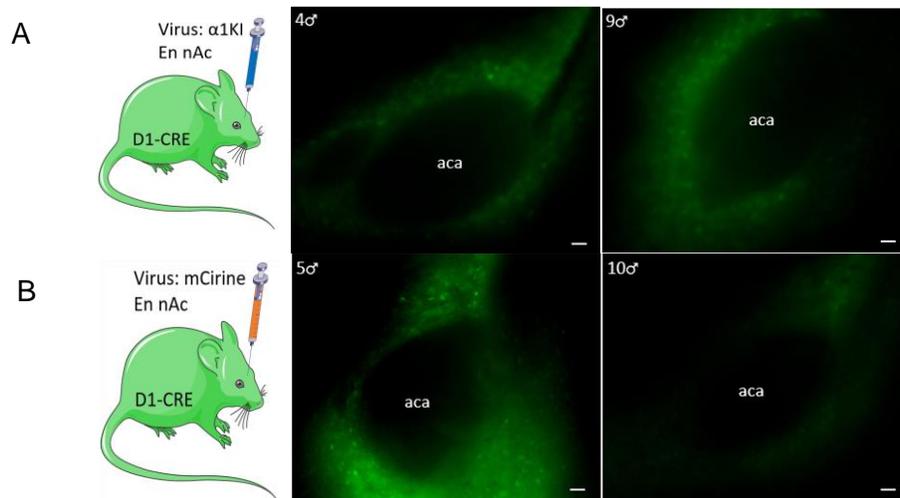
A continuación, se determinó mediante electrofisiología la sensibilidad de estos receptores a la potenciación producida por etanol, los resultados se muestran en la figura 5.3.4. Los resultados obtenidos en este ensayo de potenciación frente a células PC-12 transfectadas con los plásmidos GlyR $\alpha$ 1WT y GlyR $\alpha$ 1KI fueron de  $16 \pm 4$  % y  $-0.4 \pm 3$  % para 10 mM,  $34 \pm 6$  % y  $8 \pm 5$  % para 50 mM y  $53 \pm 13$  % y  $16 \pm 6$  % para 100 mM respectivamente. Con diferencias significativas en 50 y 100 mM.



**Figura 5.3.4. Potenciación inducida por etanol en PC-12 transfectadas con plásmidos pAAV-DIO-GlyRα1WT-mCitrine y pAAV-DIO-GlyRα1KI-mCitrine. A)** Trazos representativos de la potenciación por etanol en células PC-12 co-transfectadas con el plásmido pGlyRα1WT-mCitrine en verde, y con el plásmido pGlyRα1KI-mCitrine en azul. **B)** Gráfico muestra potenciación de células transfectadas con virus que codifica para el receptor de glicina α1WT en verde, y para el receptor α1KI en azul. La corriente se activó con 15 μM glicina sola, como el 100 % y a continuación en presencia de 15 μM más 10, 50 o 100 mM de etanol. **C)** Tabla contiene los valores de los promedios de potenciación obtenidos. De acuerdo al análisis *t-Student* hubo diferencias significativas en 50 y 100 mM con p value correspondiente a 10 mM p = 0,1312, para 50 mM p = 0,0043 y para 100mM p = 0,0159.

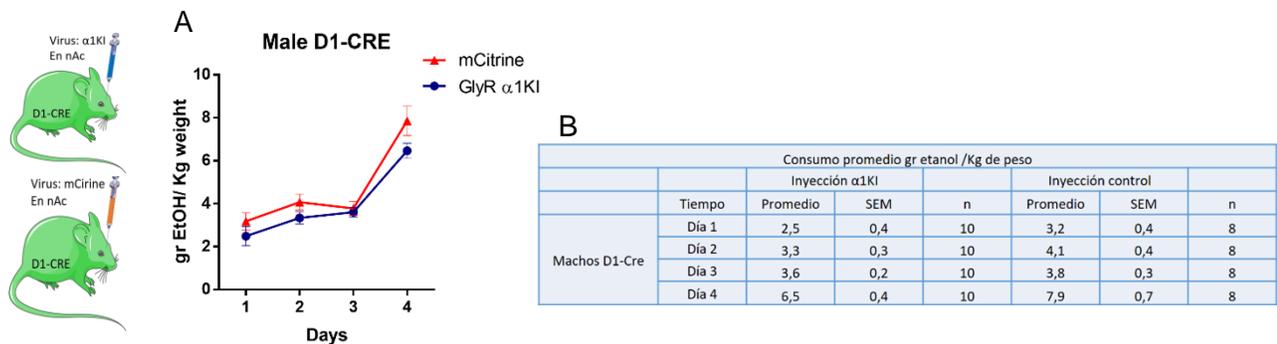
De acuerdo con los resultados obtenidos mediante electrofisiología se confirmó que los plásmidos codifican para las subunidades α1WT y α1KI del receptor de glicina.

Luego de determinar que los virus efectivamente expresan el receptor mutado, este fue empaquetado, con un título viral de  $1.02 \times 10^{13}$  partículas virales/mL. A continuación, se realizó la inyección estereotáxica en el nAc de los ratones D1-Cre, como muestra la figura 5.3.5.

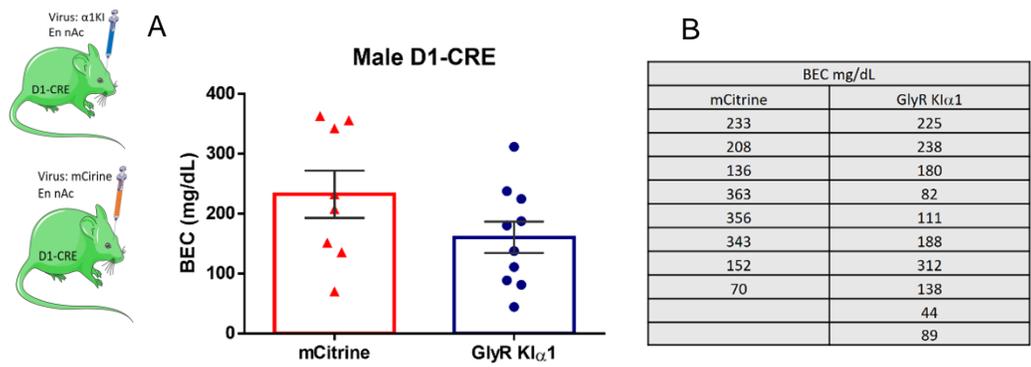


**Figura 5.3.5. Inyección estereotáxica de virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine en nAc de ratones D1-Cre. A)** El panel superior muestra nAc de 2 ratones, denominados con los números 4 y 9, inyectados con el virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine, los que presentan la marca del reportero en el sitio del nAc. **B)** El panel inferior los ratones inyectados con el virus control vacío, identificados por los números 5 y 10. La barra de calibración corresponde a 50  $\mu$ m, la comisura anterior como referencia del núcleo accumbens se denomina con las siglas “aca”.

Para determinar el efecto sobre el comportamiento de consumo de alcohol, se realizó un ensayo de *Drinking in the Dark*, con los ratones D1-Cre inyectados en nAc con el virus que codifica para el receptor de glicina  $\alpha$ 1KI, como se evidencia el consumo en gr de etanol/Kg de peso, en la figura 5.3.6, durante los 4 días del experimento, y posteriormente los niveles plasmáticos de etanol, el cuarto día de experimento, como se muestra en la figura 5.3.7. Los resultados obtenidos en este ensayo no arrojaron diferencias entre el consumo a ninguno de los días del experimento. Los datos están agrupados y detallados en la figura 5.3.6 B. Esta similitud en los dos grupos de estudio se mantuvo al analizar el etanol en sangre, mostrando que efectivamente ambos grupos beben de forma similar (Figura 5.3.7).

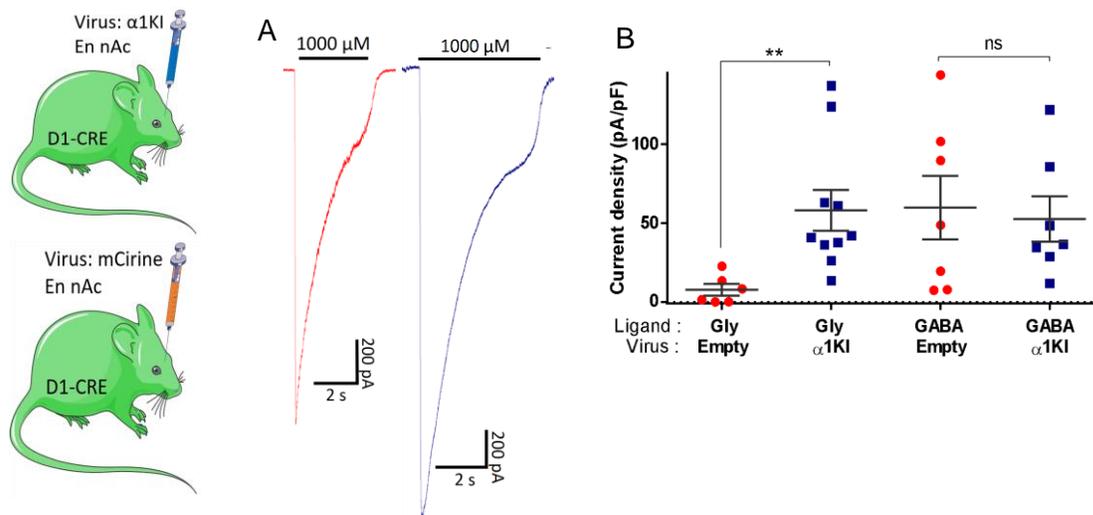


**Figura 5.3.6. Consumo de etanol en ratones D1-Cre inyectados con virus que codifica para el receptor GlyR $\alpha$ 1KI y Control vacío. A)** El gráfico muestra el consumo de los machos D1-Cre, comparando los gramos de consumo de etanol por Kg de peso de los ratones inyectados con virus  $\alpha$ 1KI (en azul) vs Control vacío (en anaranjado). **B)** Tabla con los consumos promedios para cada día del experimento.



**Figura 5.3.7. Niveles plasmáticos de alcohol en ratones D1-Cre inyectados con virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine. A)** El gráfico de niveles plasmáticos de machos inyectados con virus que codifica para el receptor  $\alpha$ 1KI (en azul) y con el virus control vacío (anaranjado). **B)** Tabla con los niveles plasmáticos en mg/dL de etanol obtenidos el 4to día del experimento.

Para determinar que efectivamente había expresión diferencial entre las neuronas del nAc de ratones inyectados con el virus que codifica para los receptores GlyR $\alpha$ 1KI y las neuronas inyectadas con el virus control, es que se realizaron ensayos de electrofisiología, de densidad de corriente (Figura 5.3.8) y de potenciación por etanol (Figura 5.3.9).

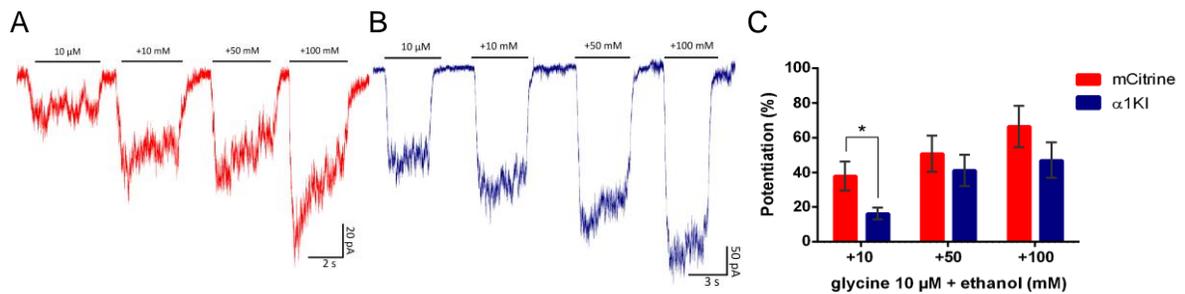


**Figura 5.3.8. Densidad de corriente de neuronas disociadas de nAc de ratones D1-Cre inyectados con virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine. A)** Trazos representativos en rojo de corriente saturante de glicina en MSN D1 positivas que expresan el reportero mCitrine del vector viral vacío y en azul corresponde al trazo de la MSN D1 positiva que expresa el GlyR $\alpha$ 1KI. **B)** corresponde al gráfico de la densidad de corriente donde se compara la densidad frente a corrientes saturantes de glicina y de GABA.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de densidad de corriente para las neuronas disociadas de nAc de ratones D1-Cre inyectados con el virus mCitrine control vacío y el virus GlyR $\alpha$ 1KI, frente a glicina fue de  $7 \pm 4$  pA/pF y  $58 \pm 13$  pA/pF, respectivamente, mientras que para GABA la densidad de corriente fue de  $60 \pm 20$  pA/pF y

53 ± 14 pA/pF, respectivamente. Por lo que hay una expresión diferencial y mayor del receptor de glicina en las neuronas que expresan el reportero verde inyectadas con el virus GlyR $\alpha$ 1KI con respecto a las inyectadas con el virus control mCitrine.

A continuación, evaluamos el efecto de la potenciación por etanol en estas neuronas. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron diferencias significativas a bajas concentraciones de etanol, pero no hubo diferencias a 50 mM o 100 mM. Los valores de



porcentaje de potenciación del efecto de glicina de las neuronas disociadas de nAc que expresan el reportero fluorescente verde mCitrine inyectadas con el virus control versus el virus GlyR $\alpha$ 1KI fue 38 ± 8 % y 16 ± 3 % para 10 mM, 51 ± 10 % y 41 ± 9 % para 50 mM y para 100 mM fue de 67 ± 12 % y 47 ± 10 % respectivamente.

**Figura 5.3.9. Efecto del etanol en neuronas disociadas de nAc de ratones D1-Cre inyectados con virus AAV-DIO-GlyR $\alpha$ 1KI-mCitrine y AAV-DIO-mCitrine. A)** muestra trazos representativos registrados en neuronas de ratones inyectados con control vacío mCitrine. **B)** trazo de corriente registrado en una neurona infectada con el AAV que codifica para el receptor  $\alpha$ 1KI. **C)** el gráfico muestra el porcentaje de potenciación de 10, 50 y 100 mM de etanol utilizando 10 μM de glicina como control para ambas condiciones.

## **6. Resumen de los objetivos**

### **Objetivo específico 1**

La caracterización de los receptores de glicina presentes en VTA mediante electrofisiología mostró que corresponden a receptores predominantemente heteroméricos, donde la expresión de  $\alpha 1$  es prominente y siendo sensible a glicina y a la potenciación por etanol. PFC, por otro lado, no presentó receptores sensibles a etanol, los cuales estarían conformados por  $\alpha 2$  y/o  $\alpha 3$ .

### **Objetivo específico 2**

El diseño y subclonamiento del plásmido para la expresión en neuronas GABAérgicas pAAV-mDlx-GlyR $\alpha 1$ WT-GFP fue exitoso. Las células transfectadas presentaban corrientes activadas por glicina. El empaquetamiento de este virus y el control vacío también fue exitoso, con títulos cercanos a  $10^{13}$  partículas virales/mL.

La inyección estereotáxica en nAc permitió sobreexpresar el  $\alpha 1$ WT en neuronas del nAc con eficiencia de transducción del receptor. Más importante, los experimentos de comportamiento indicaron que es posible recuperar la función del GlyR en el nAc los animales KI $\alpha 1$  y revertir el fenotipo bebedor de estos ratones. Este resultado contribuyó con el entendimiento de la relevancia de los receptores de glicina presentes en el nAc, y a la importancia del balance de estos receptores nativos en el circuito de la recompensa cerebral.

### **Objetivo específico 3**

Mediante la co-transfección de un plásmido que codifica para la recombinasa Cre y a los plásmidos que exclusivamente se expresan en estas neuronas Cre positivas, se expresó

el receptor de glicina  $\alpha$ 1WT y  $\alpha$ 1KI en células PC12. Las células que expresan el reportero fluorescente verde producen corrientes activadas por glicina. Estos plásmidos fueron empaquetados en adenovirus con títulos virales de alrededor de  $10^{13}$  partículas virales/mL.

Las inyecciones estereotáxicas lograron alto nivel de expresión en D1 Cre MSNs en el núcleo accumbens. Los experimentos de comportamiento indican que sobreexpresión de receptores de glicina específicamente en D1 Cre MSNs no era suficiente para alterar el consumo de etanol.

## 7. Discusión

El trabajo realizado en esta tesis entregó importantes resultados en dos aspectos importantes de la farmacología de etanol en sus blancos moleculares en el sistema mesolímbico, el cual juega un rol crítico en comportamientos de adicción al etanol. Primero, se aportó información que ayuda a entender la composición molecular de los receptores de glicina en VTA y PFC (Araya et al., 2021), dos regiones importantes de este circuito. Segundo, utilizando técnica de inyección estereotáxica de AAVs que codifica para la subunidad  $\alpha 1$ WT del receptor, se logró revertir el comportamiento de consumo elevado de etanol en el modelo de ratón  $Kl\alpha 1$ . A continuación, se discutirán los resultados centrales en relación con el estado del arte y sus implicancias en esta área de la farmacología de adicción al alcohol.

### 7.1. Presencia de distintas subunidades de los receptores de glicina en el circuito mesolímbico.

Los receptores de glicina tradicionalmente se han asociado al control de la inhibición en regiones caudales del sistema nerviosos central, como por ejemplo en la médula espinal (Kandel et al., 2013; Purves et al., 2004; Rang et al., 2016). Actualmente se ha generalizado el reconocimiento de la presencia de receptores de glicina en áreas superiores del SNC (Maguire et al., 2014; Molchanova et al., 2018; Richardson and Rossi, 2017; Xu and Gong, 2010; Zhang et al., 2008). Dentro de estas regiones también estaría el sistema de la recompensa (Delaney et al., 2010; Jonsson et al., 2012; Li et al., 2012; Molander et al., 2005; Muñoz et al., 2018; Ye, 2000). Sin embargo, aún se desconoce acerca de las subunidades que lo conforman en el cerebro y por ende en el circuito mesolímbico, lo que fue estudiado en esta tesis.

Varios estudios realizados en el cerebro de ratas han descrito la presencia de receptores de glicina en la PFC, en nAc y en VTA (Jonsson et al., 2012; McCracken et al., 2017; Molander et al., 2005; Ye, 2000). Sin embargo, solo en el estudio de Förster y cols 2017, en el cual se profundizará más adelante, se realizó una caracterización de las subunidades del receptor de glicina presentes en nAc de ratón. Utilizando técnicas de RT PCR, electrofisiología e inmunocitoquímica se pudo determinar, no solo la presencia de subunidad  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$ , sino que también se caracterizaron las dos mayores subpoblaciones de neuronas presentes en nAc. Por ejemplo, las neuronas D1 y D2 expresan las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\beta$  del receptor de glicina, pero a distintas proporciones, permitiendo concluir que la corriente de  $\text{Cl}^-$  activado en estas poblaciones son producidas por básicamente las mismas subunidades, solo que en combinaciones distintas. Los resultados presentados en este trabajo de tesis están en línea con otros publicados, al indicar que todas las neuronas de PFC de ratones WT presentaron corrientes activadas por glicina (figura 5.1.1 y 5.1.2), similar a lo reportado en ratas (Lu and Ye, 2011), mientras que una población considerable de neuronas de la misma región cerebral del modelo de ratón  $\text{KO}\alpha 2$  no presentó corrientes activadas por glicina (figura 5.1.3). Este efecto de ablación del efecto de glicina se observó en otra área cerebral, en el nAc del modelo de ratón  $\text{KO}\alpha 2$  (San Martin et al., 2020), donde el efecto fue una reducción significativa de las corrientes activadas por glicina al comparar nAc de ratones WT con el nAc de ratones  $\text{KO}\alpha 2$ . En el caso de PFC, sin embargo, se observó un efecto de dos poblaciones neuronales, una en la que el efecto de glicina fue abolido completamente, y otra población que continuó respondiendo a glicina. Gracias a estos resultados se concluyó que PFC posee, aunque no exclusivamente, receptores de glicina compuestos por la subunidad  $\alpha 2$ .

Por otro lado, la heterogeneidad de las diversas poblaciones de neuronas presentes en VTA ha sido bastante estudiada (Margolis et al., 2006; Morales and Margolis, 2017), al igual que la presencia de receptores de glicina en esta área (Li et al., 2012; Ye, 2000; Zhu and Ye, 2005). La información derivada del presente estudio se encuentra en línea con los datos obtenidos en ratas (Zhu and Ye, 2005), ya que se determinó que los receptores de glicina que predominan en esta área los receptores  $\alpha 1$  y  $\alpha 1\beta$ , con características electrofisiológicas que serán discutidas a continuación.

## **7.2. Identificación de los receptores de glicina en el circuito de la recompensa**

Previos estudios han utilizado distintas estrategias para identificar la presencia de diferentes subunidades de receptores de glicina, entre ellas destacan las técnicas de inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, PCR, Western blot y propiedades electrofisiológicas. Como fue anteriormente mencionado, en estudios previos del grupo de investigación se pudo identificar la presencia de mRNA que codifican algunas de las subunidades presentes en el nAc, lo que mostró importante contribución de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta$ . Un hallazgo interesante fue que estas subunidades se encuentran en distintas configuraciones distribuidas en las subpoblaciones de neuronas que expresan los receptores de dopamina de forma diferencial. Por ejemplo, las MSN que expresan receptores D1, las que son parte de la vía directa (Koob and Volkow, 2016; Nakanishi et al., 2014), fueron más sensibles a glicina, las que presentaron un  $EC_{50}$  de  $38 \pm 4 \mu M$ , más bajo que el  $EC_{50}$  de las D1-, el cual fue cercano a  $61 \pm 22 \mu M$ , y además, las MSN D1+ presentaron mayor sensibilidad a concentraciones bajas de etanol (Förstera et al., 2017; Gallegos et al., 2019).

Con respecto a la sensibilidad a glicina de las corrientes de  $Cl^-$  en VTA y en PFC, encontradas en esta tesis, los valores fueron significativamente distintos, con valores de

EC<sub>50</sub> de 30 ± 2 μM para VTA y 70 ± 7 μM para PFC (figura 5.1.1). En este punto es muy relevante mencionar que los niveles de glicina en el líquido cefalorraquídeo alcanzan alrededor de 13-20 μM en condiciones control (Stover et al., 1997), lo que indica que en ambas regiones, y en particular en el VTA, existe un efecto de inhibición tónico por parte de este neurotransmisor, cuyo origen puede estar mediado por la liberación por astrocitos, los encargados del metabolismo de la glicina (Kandel et al., 2013). A su vez existen pequeños grupos neuronales glicinérgicos que se encuentran en el *midbrain* que proyectan sus axones al nAc. Su localización es asunto de estudios que se encuentran en marcha mediante marcadores retrógrados. Conocer el origen de la glicina en regiones del circuito de la recompensa resulta también de gran interés ya que como hemos visto en esta tesis cumplen un rol frente al consumo de alcohol. De manera interesante, estos resultados están en concordancia con los reportados por Ye 2000, donde se observó que las neuronas de VTA en ratas tienen valores de EC<sub>50</sub> alrededor de 37 μM (Ye, 2000). De estudios con receptores recombinantes, es ampliamente aceptado que los receptores de glicina conformados por la subunidad α1 presentan una mayor sensibilidad a glicina con respecto a la de los receptores conformados por las subunidades α2 y α3 (Sánchez et al., 2015; Yevenes and Zeilhofer, 2011b). En línea con este antecedente es que podemos concluir que el VTA expresa receptores de glicina α1. Como evidencia adicional que apoya esta idea, encontramos que los GlyR en VTA fueron potenciados por GTP-γ-S y por etanol (figura 5.1.6.1, 5.1.6.2 y 5.1.7), dos moduladores alostéricos de la subunidad α1, pero no α2, que comparten el mecanismo de acción. Se ha reportado que los GlyR conformados por las subunidades α1, pero no los GlyR conformados por las subunidades α2 o α3, son modulados positivamente por el dímero Gβγ (Burgos et al., 2015; Yevenes et al., 2010) de una proteína G trimétrica. Por lo tanto, se puede concluir que las corrientes de cloruro activadas por glicina en VTA contenían las subunidades α1, ya que se

potenciaron de manera significativa por el análogo no hidrolizable del GTP, es decir por GTP- $\gamma$ -S. Por ejemplo, a los 15 minutos post-diálisis el porcentaje de potenciación de las corrientes glicinérgicas fue de un  $93 \pm 30\%$ . Estos resultados de potenciación por GTP- $\gamma$ -S concuerdan con los datos obtenidos en ratas (Zhu and Ye, 2005).

Las neuronas del VTA de ratones WT mostraron un alto grado de sensibilidad a etanol, con un porcentaje de potenciación significativo a 10, 50 y 100 mM. Por otro lado, las neuronas VTA en el ratón  $KI\alpha1$  fueron resistentes a aplicaciones de etanol (figura 5.1.7.1), resultado similar a lo reportado en neuronas disociadas de médula espinal de ratones  $KI\alpha1$  (Aguayo et al., 2014). En apoyo a esta idea, los resultados obtenidos en el modelo de ratón  $KO\alpha2$  confirman la existencia de esta subunidad expresada en VTA (figura 5.1.2). De igual forma, los resultados obtenidos en la potenciación por etanol en neuronas disociadas de VTA de modelo de ratos  $KI\alpha2$  presentó un efecto similar al observado en ratones WT (figura 5.1.7.2), por lo que perder la sensibilidad a la potenciación por etanol en la subunidad  $\alpha2$  no afecta el comportamiento de los GlyRs presentes en VTA. Los datos publicados de esta investigación indican que la sensibilidad al etanol de los receptores de glicina en estas neuronas fue afectada en este ratón que no expresa la subunidad  $\alpha2$  (Araya et al., 2021). A pesar que todas las neuronas registradas en el  $KO\alpha2$  presentaron corrientes glicinérgicas, la sensibilidad del receptor estaba desplazada hacia la derecha comparado con el ratón WT, con un  $EC_{50}$  de  $30 \pm 2 \mu\text{M}$  para el ratón WT y  $56 \pm 11 \mu\text{M}$  para el ratón  $KO\alpha2$ , así como una reducción en la densidad de corriente (figura 5.1.2), quizás reflejando una respuesta de tipo compensatoria, con pérdida de  $\alpha1$ , como visto en el nAc (Gallegos et al., 2020; San Martin et al., 2020). Este resultado sugiere que la subunidad  $\alpha2$  es importante para mantener las propiedades de los receptores presentes en esta región. Es necesario destacar que existen variantes de corte y

empalme de la subunidad  $\alpha 2$  que presentan distinta sensibilidad a glicina (Miller et al., 2004). Además, datos no publicados por nuestro grupo de investigación mostró que los receptores conformados por las subunidades  $\alpha 2\beta$  son altamente sensibles a etanol, sin embargo, como los GlyRs que contienen la subunidad  $\alpha 2$  no se expresan en el ratón KO $\alpha 2$ ; una explicación más probable para este cambio puede ser un proceso compensatorio que ocurre en el modelo KO $\alpha 2$ , mediada por otra subunidad  $\alpha$ , como la  $\alpha 3$ .

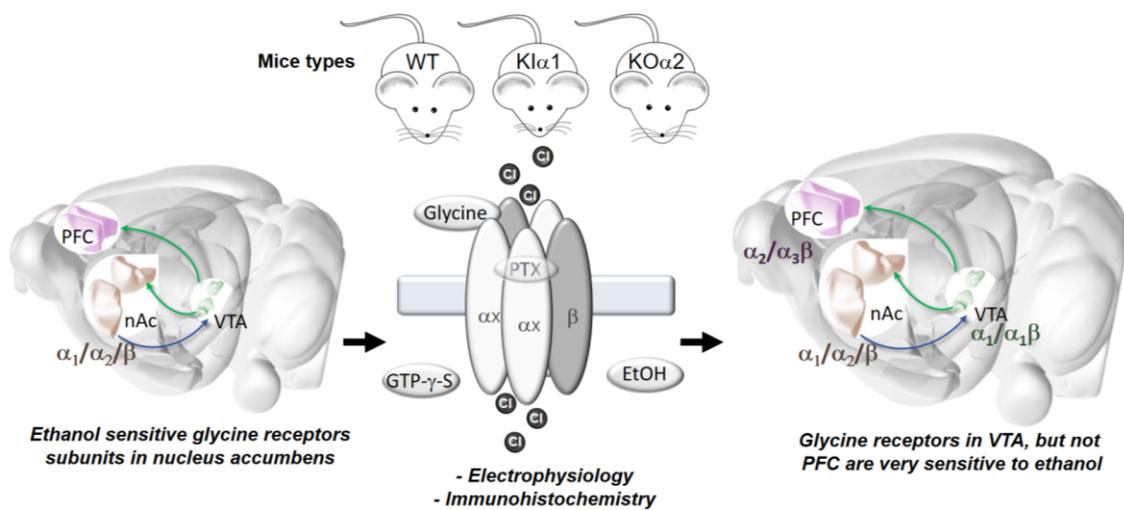
Por otro lado, los receptores de glicina presentes en PFC expresan otras subunidades, y muy posiblemente  $\alpha 2$  y/o  $\alpha 3$ . Estudios en neuronas disociadas de PFC en ratas (6-39 días postnatal) reportaron corrientes evocadas por glicina con un  $EC_{50}$  de 58 a 117  $\mu M$  (Lu and Ye, 2011), lo que está dentro del rango obtenido en la presente investigación donde el  $EC_{50}$  fue igual a  $70 \pm 7 \mu M$  (figura 5.1.1). Sin embargo, este valor difiere bastante de lo reportado en otro estudio que reportó una corriente de glicina utilizando rebanadas de cerebro y que mostró que las neuronas perfundidas con glicina mostraban un aumento lento en las corrientes de  $Cl^-$ , con un  $EC_{50}$  de  $674 \pm 32 \mu M$  (McCracken et al., 2017). Ésta marcada diferencia en la sensibilidad de los receptores frente a glicina con respecto a los datos obtenidos en esta tesis se puede explicar tanto por el tipo de subunidades y más probablemente debido a la metodología utilizada, ya que el sistema en rebanada es mucho más complejo al tener que perfundir el tejido con el agonista para alcanzar al sitio de acción y además existen mecanismos de *clearence* y recaptación de neurotransmisores, lo que lleva a finalmente necesitar mayores concentraciones de neurotransmisor para detectar un efecto (McCracken et al., 2017).

Por otro lado, en cuanto a la potenciación por etanol o por el análogo no hidrolizable de ATP, GTP- $\gamma$ -S, indican una diferencia entre los receptores de glicina presentes en VTA y

en PFC. La perfusión de GTP- $\gamma$ -S no fue capaz de modular la corriente activada por glicina en neuronas disociadas de PFC de ratones WT (figura 5.1.8). Esta es una evidencia adicional que apoya la idea que los receptores de glicina presentes en la PFC están compuestos por subunidades distintas a  $\alpha 1$ . Esta conclusión está respaldada además con los resultados de potenciación por etanol en los modelos de ratones  $KI\alpha 1$ ,  $KI\alpha 2$  y  $KO\alpha 2$ . Los datos mostraron que los GlyR presentes en PFC, de los tres modelos de ratones estudiados, fueron insensibles al etanol. Esta ausencia de potenciación en neuronas WT indicó muy baja expresión de la subunidad  $\alpha 1$  en PFC. Además, en el modelo de ratón  $KO\alpha 2$ , solo en pocas neuronas en mostraron corrientes activadas por glicina, las corrientes fueron reducidas, pero no completamente eliminadas. Solo fue posible obtener curvas concentración-respuesta en pocas neuronas que presentaron corrientes superiores a 130 pA con concentraciones de glicina saturante (figura 5.1.2 y 5.1.3). Es por esto que los GlyRs en PFC estarían formados probablemente por las subunidades  $\alpha 2/\alpha 3$ .

Finalmente, y para completar el análisis, la presencia de la subunidad  $\beta$  en los ensayos de western blot sugiere que los receptores presentes tendrían una conformación de tipo heteromérica en estas dos regiones cerebrales (Araya et al., 2021). Esta presencia de subunidad  $\beta$  fue similar a lo encontrado en nAc de ratones WT y  $KO\alpha 2$  (San Martín et al., 2020), lo que está en concordancia con los estudios electrofisiológicos realizados utilizando el bloqueador selectivo de los receptores homoméricos, la PTX (Lu and Ye, 2011; Lynch, 2009; Maleeva et al., 2017). De acuerdo al estudio de Maleeva et al 2017, mediante el uso de receptores de glicina recombinantes en células HEK, que mostraron una inhibición de un 70% de la amplitud de la corriente de  $Cl^-$  en los receptores homoméricos. Nuestros resultados muestran que tanto en PFC y VTA, la inhibición por PTX fue de  $40 \pm 5\%$  y  $50 \pm 4\%$ , respectivamente (figura 5.1.5). Por lo que a pesar de la

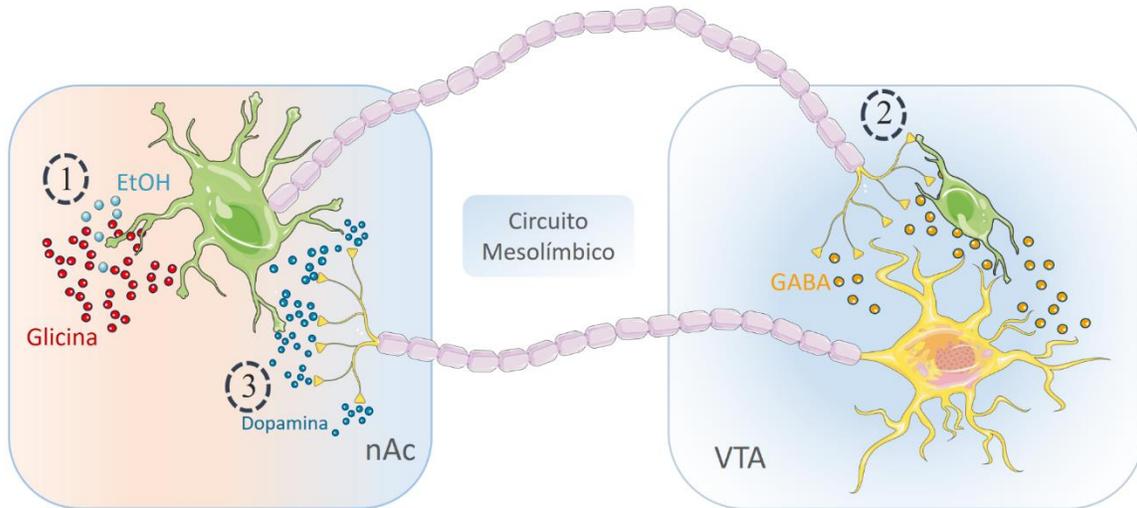
heterogeneidad en términos de sensibilidad a PTX en VTA, los resultados sugieren una alta contribución de GlyR heteroméricos en la diversa población neuronal presente en esta región del circuito mesolímbico (Morales and Margolis, 2017). Por otro lado, la dispersión de los datos en PFC es menor a la que se encuentra en VTA indicando una población neuronal más homogénea. La figura 7.1 corresponde a un graphical abstract el cual resume el trabajo realizado en el primer objetivo de este trabajo de investigación.



**Figura 7.1. Esquema resumen primer objetivo.** Debido a estudios previos a esta tesis se conocía la identidad de los receptores de glicina presentes en el nAc, pero no la de estos receptores en las áreas de la corteza prefrontal (PFC) y en el área del tegmento ventral (VTA), pero gracias al trabajo realizado en esta tesis, mediante el uso de técnicas de electrofisiología y de las distintas propiedades farmacológicas que tienen los distintas configuraciones de receptores de glicina, además del uso de distintos animales genéticamente modificados, se determinó la identidad de los receptores de glicina en PFC corresponden mayormente a  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 $\beta$ , mientras que en VTA principalmente a  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 1 $\beta$ .

### **7.3. Receptores de glicina expresados en el circuito de la recompensa frente al alcohol.**

Los estudios de Molander 2005 y Li 2012 (Li et al., 2012; Molander et al., 2007, 2005; Molander and Söderpalm, 2005a, 2005b) permitieron iniciar nuestro entendimiento sobre el rol que tendrían los receptores de glicina en nAc y VTA, donde hemos detectado una presencia importante de subunidades funcionales  $\alpha 1$ . Los datos de consumo y preferencia al alcohol, usando animales  $Kl\alpha 1$ ,  $Kl\alpha 2$  y  $KO\alpha 2$ , sugieren que estos receptores participan en el control de la excitabilidad de estas regiones y su pérdida de modulación por etanol causa un aumento en consumo y preferencia (Gallegos et al., 2020; Muñoz et al., 2019; San Martin et al., 2020). En el animal WT, estos receptores son sensibles a etanol, lo que potencia la inhibición neuronal causada por activación de estos, así se ejerce un control al consumo excesivo de la droga. En el modelo propuesto por el grupo sueco, la activación de receptores de glicina en nAc produce un aumento de los niveles de dopamina en el nAc (Molander and Söderpalm, 2005b). Este aumento en dopamina es inducido por aplicación de glicina y ORG-24598, un inhibidor de la recaptación de glicina, e inhibido por estricnina (Lidö et al., 2011; Molander and Söderpalm, 2005a). Además, el aumento en los niveles de dopamina, producto del consumo de etanol, en nAc fue inhibido por el antagonista glicinérgico, sugiriendo un importante rol de receptores de glicina en fenómenos de recompensa cerebral. Más importante, la activación de receptores de glicina causó una disminución en el consumo de etanol (Molander et al., 2007, 2005), lo que sugiere que la red neuronal se ajusta a un nuevo nivel, donde el consumo ya no es tan recompensante para la rata. La figura 7.2 es un esquema que resume el mecanismo propuesto por diversos investigadores que explica el aumento de los niveles de dopamina en el nAc mediante la activación o potenciación del efecto de los receptores de glicina.



**Figura 7.2. Esquema propuesto del rol de los receptores de glicina en el circuito mesolímbico.** 1) Los GlyRs en MSNs pueden ser activados o modulados mediante microdiálisis de glicina u ORG-24598 o potenciados por EtOH. 2) La potenciación de estos receptores inhibitorios con etanol genera un efecto desinhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA. 3) Lo anterior produce un aumento en los niveles de dopamina extracelular en el nAc, lo que se ha asociado a un consumo regulado de etanol. Datos en el ratón KI indican que se pierde esta regulación y el consumo aumenta.

Además, estos investigadores utilizaron microdiálisis para administrar glicina directamente en el VTA, para posteriormente determinar el consumo de alcohol, observando una disminución en el consumo, lo que confirma que estos receptores participan en los procesos de control neuronal del circuito de recompensa (Li et al., 2012). Los estudios realizados con el modelo de ratón KO $\alpha$ 2 respaldan la importante participación de los receptores de glicina en el consumo de alcohol, ya que este modelo de ratón presenta un consumo alterado al compararlo con el ratón WT. Específicamente, el ratón muestra un comportamiento de *binge drinking* al inicio de su exposición al alcohol, lo que denota la relevancia biológica que tienen estos receptores en el sistema de la recompensa (San Martín et al., 2020). Los datos más novedosos en esta tesis muestran

que el ratón KO $\alpha$ 2 presentó alteraciones en la expresión de otras subunidades de receptores de glicina en el nAc. Todas las neuronas del nAc registradas electrofisiológicamente mostraron una completa pérdida de corrientes de Cl<sup>-</sup> evocada por la glicina (figura 5.1.3). Además, en el PFC, una importante población de neuronas no expresó receptores de glicina (figura 5.1.3). En el VTA hubo un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración respuesta con respecto al WT, pero se detectaron corrientes de amplitud normal y todas las neuronas presentaron corriente de glicina (figura 5.1.2). Este resultado de las alteraciones que se ven en el circuito de la recompensa del modelo KO $\alpha$ 2 nos permiten entender a su vez el comportamiento alterado frente al consumo de etanol. Sin embargo, no podemos excluir la presencia de algún fenómeno de compensación neurobiológica debido a la pérdida de  $\alpha$ 2, la cual es importante para el desarrollo neuronal (Avila et al., 2013a). En el estudio de Molchanova y cols 2018, estudiaron las subunidades presentes en el *striatum* de ratones WT, el mismo modelo de KO $\alpha$ 2 utilizado para esta tesis, y determinaron mediante electrofisiología en rebanadas y ensayos de comportamiento que las subunidades más relevantes en esta región era la subunidad  $\alpha$ 2 (Molchanova et al., 2018), sin embargo existe la posibilidad que debido a la metodología utilizada en esa investigación faltasen datos para asegurar que puede haber expresión de otras subunidades, similar a lo observado en nAc, donde en el modelo WT se encuentran las subunidades  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\beta$ , sin embargo, en el modelo del KO $\alpha$ 2 no hay corriente de glicina en nAc.

Como ya fue discutido anteriormente, los receptores de glicina en nAc y VTA, pero no PFC, fueron potenciados por etanol, lo que debería afectar al comportamiento frente al consumo de alcohol. Es en esta línea que diversos estudios con distintos modelos murinos muestran concordancia con nuestros resultados. Por ejemplo, se observó una contribución de los receptores de glicina sensibles a la potenciación por etanol frente al

consumo de etanol, utilizando los modelos de animales KI $\alpha$ 1 y KI $\alpha$ 2, modelos de estudio que tienen GlyR insensibles a la potenciación por etanol, además presentan un consumo de etanol elevado con respecto a animales WT (Gallegos et al., 2020; Muñoz et al., 2019). Para la generación de estos modelos se realizaron estudios con receptores recombinantes de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 GlyR, identificando el sitio de regulación alostérica positiva, cercana a dos residuos básicos, KK-AA y KR-AA para  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 respectivamente (Aguayo et al., 2014; Gallegos et al., 2020; Yevenes et al., 2010), del dominio intracelular. Luego de la generación de los ratones genéticamente modificados, en estudios electrofisiológicos se pudo determinar que la mayoría de las neuronas del nAc de estos ratones eran insensibles a la potenciación por etanol, apoyando la conclusión que los receptores  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 son importantes blancos moleculares frente a bajas concentraciones de etanol. Además, el elevado consumo de etanol por parte de estos ratones modificados genéticamente permite concluir un rol protector de los receptores de glicina frente al consumo de alcohol. Este rol se relaciona con un aumento en la inhibición producida por etanol sobre los disparos de potenciales de acción en nAc (Gallegos et al., 2020). Sin embargo, al ser modelos con modificaciones genéticas globales, no podemos excluir la contribución de estas mutaciones en otras regiones cerebrales y como estas pudiesen afectar al consumo, por lo que resultó de gran importancia estudiar de manera selectiva el efecto de estas mutaciones en una región en particular y relevante para la regulación del consumo de etanol como es el nAc, y es lo que se discutirá a continuación.

#### **7.4. Rescate de un fenotipo de alto consumo de alcohol con transducción de proteínas usando AAV.**

El núcleo accumbens es un centro integrador que controla el circuito de la recompensa y de la motivación al recibir entradas sinápticas que controlan la actividad neuronal y permiten proyectar a otras regiones cerebrales, regulando su propia excitabilidad (Sesack and Grace, 2009). Una de las mayores inervaciones que recibe el nAc corresponde a proyecciones dopaminérgicas desde el VTA, y glutamatérgicas de la PFC e hipocampo, entre otros (Russo and Nestler, 2013; Volkow and Morales, 2015). El control inhibitorio de MSNs accumbales es producido por entradas GABAérgicas y glicinérgicas (Muñoz et al., 2018; Russo and Nestler, 2013), que ejercen un control inhibitorio rápido. Estas entradas sinápticas y los canales permeables a ion Cl<sup>-</sup> parecen estar involucrados en el desorden del consumo de alcohol (Burgos et al., 2015; Stephens et al., 2017; Vengeliene et al., 2008). La función de estas MSNs es proveer una influencia inhibitoria, ya que estas neuronas sintetizan y liberan GABA en el nAc, así como también en sus terminales de proyección a otras áreas cerebrales. Debido a la interacción entre excitabilidad intrínseca y las entradas sinápticas, la relación entre el disparo de potenciales de acción y el comportamiento debería estar asociada con el número de potenciales de acción en estas neuronas, número que se ve reducido luego de la activación de los GlyR y posterior potenciación por etanol (Gallegos et al., 2019). Varias investigaciones han estudiado la relación entre etanol y el aumento de los niveles de dopamina en nAc y los GlyRs. El etanol, al igual que otras drogas de abuso aumenta los niveles de dopamina en el nAc (Di Chiara and Imperato, 1988), este efecto es bloqueado por estriquina (Molander and Söderpalm, 2005b)(Molander and Söderpalm, 2005a). El aumento en la activación de los GlyRs por glicina o por ORG-24598, un inhibidor de la recaptación de glicina GlyT1, producen un aumento en los niveles de dopamina (Lidö et al., 2011; Molander and Söderpalm, 2005a). Se demostró que este aumento en la función glicinérgica lleva a una

reducción en el consumo y preferencia a etanol (Molander et al., 2007). Mecanísticamente, el efecto de los GlyRs sobre la liberación de dopamina se encuentra en estudio, pero probablemente está relacionado al hecho de que etanol deprime la excitabilidad neuronal en las MSNs, neuronas inhibitorias de proyección GABAérgicas, lo que causa un aumento en la función dopaminérgica desde el VTA (Molander and Söderpalm, 2005a). La activación de las MSNs producto del aumento de dopamina produce una desinhibición de las neuronas en la corteza y en el tálamo, lo que permite la generación de potenciales de acción (GO-noGo) para promover el consumo de alcohol (Gallo et al., 2015). De esta manera la modificación de los niveles de actividad del nAc deberían afectar conductas de ingesta de alcohol. Por lo tanto, se cree que la activación neuronal en el nAc es crítica para los comportamientos que involucran recompensa cerebral, por ejemplo, un aumento en la neurotransmisión excitatoria en el nAc se ha observado que afecta el consumo de etanol (Purohit et al., 2018). Así, el complejo postsináptico glutamatérgico, Homer2 es capaz de afectar la localización y función de los receptores NMDA (Goulding et al., 2017), y además el consumo de alcohol (Quadri et al., 2016). En esa línea, fue demostrado que después de una inyección de AAV en el nAc para sobrepresar Homer2, el consumo y preferencia al alcohol aumentó (Szumlinski et al., 2008). Sin embargo, la expresión de Homer2 no alteró la sensibilidad de los receptores de NMDA al etanol, sino que sólo aumentó su expresión como un canal iónico funcional en la membrana, sugiriendo de una mayor excitabilidad en el nAc aumenta el consumo de etanol y sus capacidades reforzantes (Smothers et al., 2016). También otros estudios recientes apoyan la noción de que el consumo de etanol puede ser controlada a través de cambios en la actividad neuronal asociada con la frecuencia de potenciales de acción de neuronas accumbales. Utilizando DREADDs (por sus siglas en inglés, *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*), se reportó que su activador CNO

(clozapine-n-oxide) causó un aumento en el número de disparos de potencial de acción en el nAc, lo cual fue asociado a una disminución en el comportamiento de consumo excesivo de alcohol en ratones (Purohit et al., 2018). Así, esto muestra que la disminución en la actividad neuronal tiene un efecto negativo sobre el consumo de alcohol (Purohit et al., 2018). Adicionalmente, estudios con DREADDs en ratones D1 Cre, modelo en el que se profundizará más adelante, mostraron que el aumento en el consumo de etanol es mediado por la activación de D1 MSNs (Strong et al., 2020). Por lo tanto, el nivel global de activación de las MSNs parece afectar las propiedades recompensantes del etanol, donde la activación de las D1 MSNs tendería a aumentar el consumo y preferencia. En esta noción, la acción inhibitoria potenciada de los GlyR $\alpha$ 1WT por glicina y etanol, pero no de los K1 $\alpha$ 1 GlyRs, expresados en MSNs (Gallegos et al., 2020; Muñoz et al., 2019), reducirían la excitación y el efecto recompensante de etanol.

### **7.5. Rescate de fenotipo silvestre con la expresión de $\alpha$ 1 WT en el nAc del ratón K1 $\alpha$ 1**

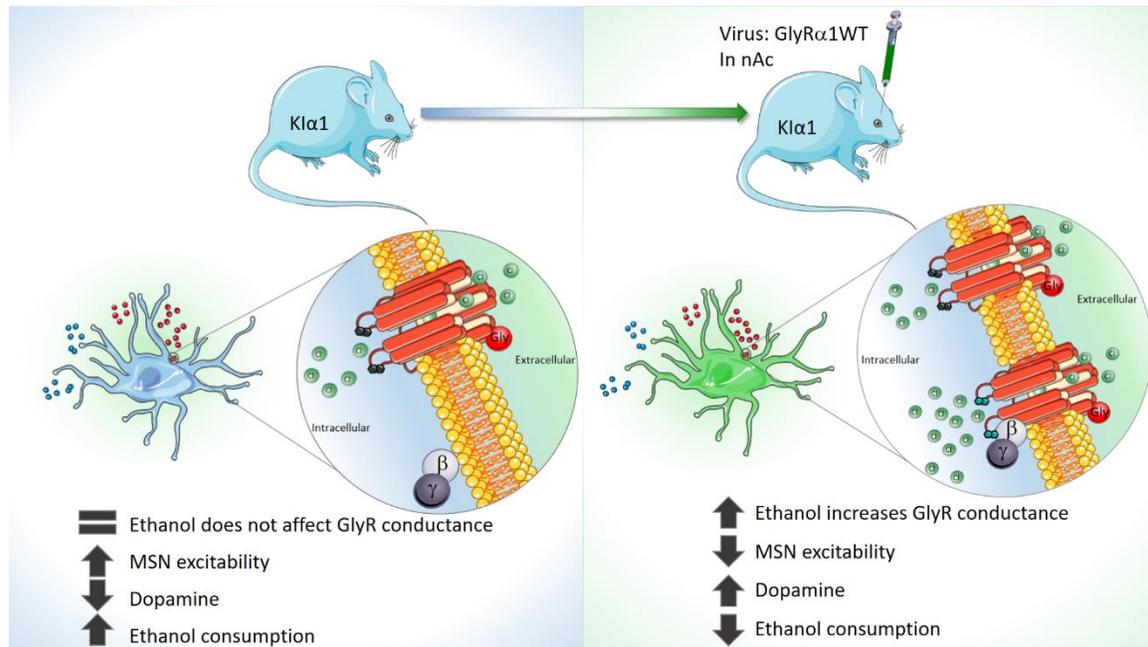
Para estudiar una región específica del cerebro, por ejemplo, del sistema mesolímbico, y analizar en particular el efecto de los receptores de glicina en el nAc, se diseñaron vectores virales para sobre expresar las subunidades  $\alpha$ 1 WT del receptor de glicina en el modelo de ratón K1 $\alpha$ 1. Con esto se pretendía recuperar la función protectora de los receptores  $\alpha$ 1 WT en el nAc de ratones que consumen elevadas cantidades de etanol (Muñoz et al., 2019). Los datos electrofisiológicos obtenidos luego de inyectar el AAV estereotáxicamente indican claramente que la densidad de corriente aumentó 5 veces luego de la expresión de la subunidad  $\alpha$ 1 WT en los ratones K1 $\alpha$ 1 (figura 5.2.8). Este efecto fue selectivo para los GlyR, ya que las corrientes activadas por los receptores GABAA no se vieron alteradas por la transducción viral, sugiriendo que la técnica no

causó compensaciones significativas, al menos en cuanto a neurotransmisión inhibitoria. Por lo tanto, una posible explicación para este efecto de disminución del consumo de alcohol en estos ratones inyectados puede ser atribuido a una ganancia de función al adicionar receptores de glicina sensibles al etanol. Esto llevó a una inhibición de las MSNs en presencia de alcohol y en conclusión a una menor activación del circuito de la recompensa, lo que está en concordancia con la noción de que los receptores de glicina tienen un rol protector frente al consumo excesivo de etanol (Muñoz et al., 2018). Un control adicional fue la inyección de receptores de glicina insensibles a la potenciación por etanol, para determinar si este efecto era producto de un todo inhibitorio general elevado en el nAc, o debido a la potenciación por etanol mediada por el mecanismo de  $G\beta\gamma$ . Los resultados con este control mostraron que no hay diferencias entre el ratón con el fenotipo bebedor inyectado con un virus control y el ratón fenotipo bebedor inyectado con el virus que promueve la expresión de GlyR $\alpha$ 1KI, insensible a etanol. Este resultado resultó ser un muy buen control, no solo porque frente al primer control que habíamos pensado de un virus solo que codifica para un reportero, este control codifica para un receptor funcional, que solo carece de la función que estamos estudiando, y por otro lado nos indica que por sobre la cantidad de receptores, el hecho que sean sensibles o no a la potenciación por etanol resulta ser un factor mucho más relevante frente al comportamiento de consumo de alcohol. Los animales KI $\alpha$ 1 además presentan una resistencia a la sedación por etanol, observado en los ensayos de *Loss of Righting Reflex* (LORR) (Aguayo et al., 2014), lo que podría indicar que los animales beben más ya que están más activos y durante más tiempo que los animales WT. Por otro lado, también cabe destacar que poder conocer la dinámica del consumo, es decir analizar el periodo de tiempo en que consumen en mayor o menor medida resulta de gran interés para poder tener un mejor análisis de los ensayos de consumo, ya que es posible que los animales

beban en gran medida al comienzo del ensayo y luego pasen el resto del tiempo, es decir 2 o 4 horas, sin beber, lo que podría repercutir en el análisis de etanol en sangre.

Los resultados de este objetivo también demuestran que es posible estudiar neuronas disociadas con receptores nativos  $Kl\alpha 1$  y que sobreexpresan la subunidad  $\alpha 1$  WT (figura 5.2.7 a la 5.2.9). Las características electrofisiológicas generadas por el agonista glicina en neuronas disociadas de ratones  $Kl\alpha 1$  inyectados con virus AAV-mDlx-GlyR $\alpha 1$ WT-GFP ( $\alpha 1$ WT) y AAV-mDlx-GFP (control vacío) presentaron pequeñas diferencias (figura 5.2.7). Por ejemplo, en el caso de las células transducidas con virus  $\alpha 1$ WT, el  $EC_{50}$  fue bastante similar a los registrados en ratones  $Kl\alpha 1$  inyectados con virus control vacío ( $45 \pm 4 \mu M$  vs  $58 \pm 10 \mu M$  respectivamente) y  $Kl\alpha 1$  no inyectados ( $EC_{50} = 54 \pm 1 \mu M$ , Muñoz et al., 2019). Lo que sugiere que la sobreexpresión de GlyR $\alpha 1$ WT no produce cambios en la sensibilidad a glicina en neuronas disociadas de nAc del ratón  $Kl\alpha 1$ . Sin embargo, existen reportes previos que han mostrado modificaciones postraduccionales específicas de modelos neuronales, que sufren los receptores de glicina al ser sobreexpresados en neuronas versus líneas celulares, como las células HEK 293 (Kung et al., 2001). Estos al ser modelos más complejos de expresión pueden producir compensaciones que modifican el  $EC_{50}$  al sobreexpresar el GlyR en esas neuronas. Aún no está dilucidado si estos cambios son producto de la interacción de receptores cercanos o producto de otras modificaciones proteicas (Breitinger and Becker, 2002). En conclusión, los resultados del segundo objetivo mostraron que el alto consumo de ratones  $Kl\alpha 1$  disminuyó tras la sobreexpresión de GlyR $\alpha 1$ WT en las MSN del nAc (figura 5.2.10) y que los receptores GlyR $\alpha 1$ WT se expresaron de forma funcional al mostrar un  $EC_{50}$  esperado y mostrar potenciación frente a etanol en un modelo que es insensible a la potenciación por etanol de forma nativa. Demostrando que la sobreexpresión del receptor GlyR $\alpha 1$ WT en una región clave del

sistema de recompensa, como es el nAc, se pueden generar cambios en el comportamiento de ratones. La figura 7.3 resume el efecto de recuperación de la función de los GlyR $\alpha$ 1WT en el nAc de ratones bebedores Kl $\alpha$ 1.



**Figura 7.3. Esquema homeostático propuesto para recuperación de la función del receptor de glicina en el ratón Kl $\alpha$ 1.** Se observa el ratón Kl $\alpha$ 1 y abajo una MSN del nAc, con un zoom en una región con receptores de glicina. A la izquierda, se sugiere que el GlyR KI que no son potenciados por etanol, lo que no ejerce la hiperpolarización de la neurona MSN, y finalmente, produciría menor aumento en los niveles de dopamina en el nAc en comparación con un ratón WT, y aumento en consumo del ratón Kl $\alpha$ 1 (color azul) en comparación con el modelo WT. A la derecha, los GlyRs WT son potenciados por etanol, las MSNs son inhibidas, lo que llevaría a un aumento mayor en los niveles de dopamina, más cercanos a los del ratón WT, y menos consumo de etanol Kl $\alpha$ 1 (color verde).

Los datos del presente estudio están en línea con estudios previos realizados en ratas. Por ejemplo, ratas bebedoras que fueron inyectadas en el nAc con un vector que inducía la expresión de los receptores de dopamina tipo D2 produjo un aumento en el nivel de

proteína de alrededor de 50% (Thanos et al., 2001). Estas ratas con fenotipo de preferencia al alcohol mostraron una reducción significativa en el consumo y preferencia del alcohol, lo que sugiere que elevados niveles de DRD2 también poseen un rol protector frente al abuso del consumo de alcohol (Thanos et al., 2005, 2004, 2001). Estudios más recientes en ratones, sin embargo, no mostraron reducción en el consumo de alcohol en modelos de consumo continuo, ni tampoco en modelos de acceso al consumo intermitente, luego de la sobreexpresión de DRD2 (Gallo et al., 2015). Las diferencias en resultados podrían deberse a la exposición previa al alcohol y los diferentes modelos utilizados.

El modelo propuesto en la figura 7.3 infiere que los niveles de dopamina en el ratón  $K1\alpha1$  se encuentran alterados, lo que se ha descrito en modelos de ratas bebedoras, donde los animales que consumen en mayor medida etanol muestran una disminución en el tono dopaminérgico, en comparación con los animales que consumen las menores cantidades de etanol (Ericson et al., 2020). Sin embargo, en estudios realizados en humanos, tanto alcohólicos como con alto riesgo de desencadenar la enfermedad debido a la carga genética e historial familiar, mostraron que luego del consumo de alcohol se observaron aumentos en los niveles de dopamina estriatal mayores que los observados en los grupos controles de bebedores sociales o no alcohólicos (Setiawan et al., 2014; Yoder et al., 2016). Es necesario entender el desbalance de la dopamina en el nAc y cómo afecta al consumo, ya que no solo debemos tener en consideración los niveles de dopamina, sino el número y tipos de receptores, así como en que neuronas produce su efecto para poder integrar ambas evidencias en un mismo modelo.

## 7.6. Estudios en ratones transgénicos D1-Cre.

Otro enfoque de estudio utilizado en esta tesis fue el uso de la herramienta de la recombinasa Cre para la expresión selectiva del receptor en una población neuronal, lo que se discutirá a continuación.

Se utilizó el modelo de ratón transgénico D1-Cre, y vectores virales adenoasociados dependientes de Cre. Además, se realizó inyección estereotáxica de estos virus en el nAc, permitiendo la sobreexpresión de los receptores de glicina  $\alpha 1KI$  en la subpoblación neuronas MSNs que expresan la recombinasa Cre bajo el promotor D1. Así como la sobreexpresión del receptor GlyR $\alpha 1WT$  en los ratones K1a1 modificó el patrón bebedor de esos ratones. Con la sobreexpresión del ahora receptor GlyR $\alpha 1KI$  en ratones WT esperábamos encontrar una pérdida del control inhibitorio en el nAc y por ende un mayor consumo de etanol en estos ratones. Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos de comportamiento no mostraron cambios significativos en el patrón de consumo de etanol de los ratones inyectados con el receptor GlyR $\alpha 1KI$  comparados con los ratones inyectados con el control vacío (figura 5.3.6 y 5.3.7), al igual que en los estudios electrofisiológicos, donde no se observó diferencia en la potenciación por etanol en neuronas disociadas (figura 5.3.8). Una posible interpretación puede ser que la sobreexpresión de la subunidad  $\alpha 1KI$ , insensible a potenciación por etanol, no fue capaz de dominar funcionalmente la del receptor nativo, sensible a potenciación por etanol, y, por lo tanto, estos receptores nativos aún son capaces de producir su efecto protector al consumo de alcohol. Si bien el análisis de la densidad de corriente mostró un aumento significativo en neuronas disociadas de nAc, esto se evidenció en los ratones inyectados con el virus AAV-DIO-GlyR $\alpha 1KI$ -mCitrine, en comparación a las neuronas de la inyección

control con el virus AAV-DIO-mCitrine, donde la densidad de corriente fue menor (figura 5.3.8). Otra posibilidad para explicar la falta de reversión al fenotipo podría ser que la expresión tomó lugar solo en una subpoblación celular, como las D1 MSN y no en el nAc completo como sí ocurrió en el objetivo anterior. Considerando que aún tenemos otras células que no expresan el receptor D1, pero sí el  $\alpha 1$  del GlyR. Por lo tanto, estas MSNs no expresan Cre, pero sí expresan receptores de glicina sensibles a alcohol, las que continúan ejerciendo su efecto protector (Cole et al., 2018; Hikida et al., 2010; Nakanishi et al., 2014).

Cabe destacar que en este trabajo se ha centrado en el análisis del rol de los receptores de glicina en el nAc, sin embargo, no podemos desconocer la presencia de los receptores de glicina en el VTA, que son muy sensibles a la potenciación por etanol, como vimos en el objetivo 1, y pueden estar también involucrados en la regulación del consumo de etanol, de manera similar a lo reportado por el mecanismo propuesto por el salsolinol, el agonista de los receptores  $\mu$ -opioides presentes en las interneuronas gabaérgicas del VTA (Melis et al., 2015; Quintanilla et al., 2016). De la misma manera, es importante decir que el circuito de la recompensa incorpora a diversos centros neuronales, los que de manera directa o indirecta se encuentran interconectados (Abraham et al., 2017; Sesack and Grace, 2009), lo que conlleva a una respuesta en el comportamiento de los individuos, por lo que este estudio aporta al conocimiento del rol de los receptores glicina en las neuronas GABAérgicas del nAc, pero no es posible de momento comprender completamente las implicancias sobre otras regiones del circuito y como estas en última instancia afectan el consumo de etanol.

## 8. Conclusiones

### **Conclusiones finales sobre el rol de los GlyRs en el sistema mesolímbico.**

El circuito mesolímbico es crítico para las propiedades recompensantes de estímulos naturales y de las drogas de abuso, entre ellas el etanol. Recientemente se ha demostrado que receptores de glicina están presentes y regulan la excitabilidad de neuronas en el nAc en presencia de etanol (Gallegos et al., 2019; Muñoz et al., 2019). En este trabajo de tesis se logró evidenciar la existencia de este componente inhibitorio glicinérgico en otras dos regiones del circuito mesolímbico que están estrechamente relacionadas al nAc.

La presencia de los GlyRs en neuronas de VTA parece ser importante por dos razones: primero, la alta sensibilidad de los GlyRs a glicina en esta región, donde a bajas concentraciones de glicina (5 - 10  $\mu$ M) fue capaz de activar corrientes de alta amplitud lo que sugiere que pueden ser activados a concentraciones fisiológicas del CSF (Stover et al., 1997). Evidencia sobre activación tónica de los GlyRs en las neuronas de VTA (Wang et al., 2005; Ye et al., 2004) sugiere que estos GlyRs juegan un rol en el control basal del circuito mesolímbico, y sobre el comportamiento adictivo y efectos recompensantes; segundo, debido a la alta sensibilidad a etanol de estos GlyRs, la excitabilidad de las neuronas de VTA se esperaría que se redujera, similar a lo observado en nAc en presencia de la droga (Gallegos et al., 2019; Muñoz et al., 2019). Esto es interesante, ya que es sabido que el etanol afecta la liberación de dopamina en el nAc (Bassareo et al., 2017; Di Chiara and Imperato, 1988; Molander and Söderpalm, 2005a) y ya que el soma de las neuronas dopaminérgicas se encuentra en el VTA, este puede ser un mecanismo adicional que contribuye a la regulación de los efectos adictivos del etanol.

En conclusión, este estudio mostró que neuronas en dos regiones mesolímbicas, el VTA y la PFC, las cuales expresan GlyRs con diferentes propiedades funcionales que están asociados a la conformación de estos receptores por distintas subunidades. Las neuronas de VTA expresan predominantemente GlyRs compuestos por la subunidad  $\alpha 1$  sensibles a etanol, lo que puede tener implicancias en las propiedades adictivas de etanol. En contraste, los estudios con modelos de ratones KO $\alpha 2$  y KI $\alpha 1$  sugiere que los receptores insensibles a etanol presentes en PFC contienen predominantemente subunidades  $\alpha 2/\alpha 3$ .

Es importante que exista un equilibrio y una regulación del circuito neuronal del sistema de recompensa. En este trabajo reportamos la presencia de receptores de glicina en las 3 principales regiones que componen este sistema: PFC, VTA y nAc. Estos receptores están compuestos de diferentes subunidades y presentan distinta sensibilidad a glicina y a etanol, además de ser importantes para mantener el balance inhibitorio de este sistema de recompensa el cual se ve sobre-activado cuando se consumen drogas de abuso como etanol. Cabe destacar que este es uno de los mecanismos por los cuales el etanol actúa sobre el circuito de la recompensa cerebral, ya que también está el componente GABAérgico (Nestoros, 1980), el cual se encuentra ampliamente descrito (Mishra and Chergui, 2013; Stephens et al., 2017; Vashchinkina et al., 2014). Otros estudios han involucrado los sistemas nicotínico (Dani and Heinemann, 1996; Larsson et al., 2002), glutamatérgico (Kalivas, 2009; Li et al., 2012; Nie et al., 1994), serotoninérgicos (Cunningham and Anastasio, 2014; Lovinger and White, 2013), de canales iónicos activados por voltaje (Horishita and Harris, 2008; Wang et al., 1994), así como también el sistema opioide (Al-Hasani and Bruchas, 2011; Mitchell et al., 2012). A su vez, el consumo de alcohol también es afectado por el salsolinol (Berríos-Cárcamo et al., 2017; Quintanilla

et al., 2016), que es capaz de afectar la excitabilidad de neuronas en el VTA (Melis et al., 2015). Este es un metabolito producto de la condensación de la dopamina y el acetaldehído capaz de activar los receptores  $\mu$ -opioides. Por otro lado, el efecto inflamatorio y de estrés oxidativo que produce su principal metabolito, el acetaldehído y los innovadores estudios realizados con las células madres inhibiendo este efecto (Quintanilla et al., 2019), o los posibles usos en terapia génica utilizando el modulador alostérico de la enzima aldehído deshidrogenasa 2, ALDA-1, para favorecer la metabolización del acetaldehído a acetato y de esta forma reducir el consumo de alcohol (Rivera-Meza et al., 2019). Recientemente, se ha reportado que la microbiota es también capaz de alterar el consumo de alcohol (Ezquer et al., 2021). Todo lo anterior sugiere que el consumo de alcohol no solo depende de los receptores de glicina, si no que como patología completa es afectada por varios factores y estímulos. Comprender los mecanismos neurológicos y bioquímicos que se ven afectados y como se relacionan entre ellos, nos permite avanzar en el desarrollo de mejores tratamientos para esta enfermedad.

## 9. Bibliografía

- Abraham, K.P., Salinas, A.G., Lovinger, D.M., 2017. Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* 96, 1223–1238. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>
- Aguayo, L.G., Tapia, J.C., Pancetti, F.C., 1996. Potentiation of the Glycine-Activated Cl<sup>-</sup> Current by Ethanol in Cultured Mouse Spinal Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1116–1122.
- Aguayo, L.G., Castro, P., Mariqueo, T., Muñoz, B., Xiong, W., Zhang, L., Lovinger, D.M., Homanics, G.E., 2014. Altered sedative effects of ethanol in mice with  $\alpha 1$  glycine receptor subunits that are insensitive to G $\beta\gamma$  modulation. *Neuropsychopharmacology* 39, 2538–2548. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.100>
- Al-Hasani, R., Bruchas, M.R., 2011. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115, 1363–1381. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Araya, A., Gallegos, S., Viveros, R., San Martín, L., Muñoz, B., Harvey, R.J., Zeilhofer, H.U., Aguayo, L.G., 2021. Presence of ethanol-sensitive and ethanol-insensitive glycine receptors in the ventral tegmental area and prefrontal cortex in mice. *Br. J. Pharmacol.* 178, 4691–4707. <https://doi.org/10.1111/bph.15649>
- Avila, A., Nguyen, L., Rigo, J.-M., 2013a. Glycine receptors and brain development. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00184>
- Avila, A., Vidal, P.M., Dear, T.N., Harvey, R.J., Rigo, J.M., Nguyen, L., 2013b. Glycine receptor  $\alpha 2$  subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep.* 4, 738–750. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.016>
- Bassareo, V., Cucca, F., Frau, R., Di Chiara, G., 2017. Changes in dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core during ethanol and sucrose self-

administration. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00071>

Berríos-Cárcamo, P., Quintanilla, M.E., Herrera-Marschit, M., Vasiliou, V., Zapata-Torres, G., Rivera-Meza, M., 2017. Racemic salsolinol and its enantiomers act as agonists of the  $\mu$ -opioid receptor by activating the Gi protein-adenylate cyclase pathway. *Front. Behav. Neurosci.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00253>

Betz, H., 1991. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci.* 14, 458–461. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90045-V](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90045-V)

Blum, K., Werner, T., Carnes, S., Carnes, P., Bowirrat, A., Giordano, J., Marlene-Oscar-Berman, Gold, M., 2012. Sex, Drugs, and Rock 'N' Roll: Hypothesizing Common Mesolimbic Activation as a Function of Reward Gene Polymorphisms. *J. Psychoactive Drugs* 44, 38–55. <https://doi.org/10.1080/02791072.2012.662112>

Bowery, N.G., Smart, T.G., 2006. GABA and glycine as neurotransmitters: A brief history. *Br. J. Pharmacol.* 147, 109–119. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706443>

Breitinger, H., Becker, C., 2002. The Inhibitory Glycine Receptor – Simple Views of a Complicated Channel. *ChemBioChem* 3, 1042–1052.

Breitinger, U., Breitinger, H., 2020. Modulators of the Inhibitory Glycine Receptor. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 1706–1725. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00054>

Burgos, C.F., Muñoz, B., Guzman, L., Aguayo, L.G., 2015. Ethanol effects on glycinergic transmission: From molecular pharmacology to behavior responses. *Pharmacol. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.002>

Cole, S.L., Robinson, M.J.F., Berridge, K.C., 2018. Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. *PLoS One* 13, 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207694>

- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., Costa, R.M., 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11846>
- Cunningham, K.A., Anastasio, N.C., 2014. Serotonin at the nexus of impulsivity and cue reactivity in cocaine addiction. *Neuropharmacology* 76, 460–478. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.030>
- Dani, J.A., Heinemann, S., 1996. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16, 905–908. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80112-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80112-9)
- Davies, D.L., Trudell, J.R., Mihic, S.J., Crawford, D.K., Alkana, R.L., 2003. Ethanol Potentiation of Glycine Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes Antagonized by Increased Atmospheric Pressure. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 743–755. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000065722.31109.A1>
- Davies, P.A., Hoffmann, E.B., Carlisle, H.J., Tyndale, R.F., Hales, T.G., 2000. The influence of an endogenous  $\beta 3$  subunit on recombinant GABA(A) receptor assembly and pharmacology in WSS-1 cells and transiently transfected HEK293 cells. *Neuropharmacology* 39, 611–620. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00163-X)
- Delaney, A.J., Esmaili, A., Sedlak, P.L., Lynch, J.W., Sah, P., 2010. Differential expression of glycine receptor subunits in the rat basolateral and central amygdala. *Neurosci. Lett.* 469, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.003>
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dichter, G.S., Damiano, C.A., Allen, J.A., 2012. Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and

clinical findings. *J. Neurodev. Disord.* 4, 1–43.

Dimidschstein, J., Chen, Q., Tremblay, R., Rogers, S.L., Saldi, G.A., Guo, L., Xu, Q., Liu, R., Lu, C., Chu, J., Grimley, J.S., Krostag, A.R., Kaykas, A., Avery, M.C., Rashid, M.S., Baek, M., Jacob, A.L., Smith, G.B., Wilson, D.E., Kosche, G., Kruglikov, I., Rusielewicz, T., Kotak, V.C., Mowery, T.M., Anderson, S.A., Callaway, E.M., Dasen, J.S., Fitzpatrick, D., Fossati, V., Long, M.A., Noggle, S., Reynolds, J.H., Sanes, D.H., Rudy, B., Feng, G., Fishell, G., 2016. A viral strategy for targeting and manipulating interneurons across vertebrate species. *Nat. Neurosci.* 19, 1743–1749. <https://doi.org/10.1038/nn.4430>

Ericson, M., Ulenius, L., Andrén, A., Jonsson, S., Adermark, L., Söderpalm, B., 2020. Different dopamine tone in ethanol high- and low-consuming Wistar rats. *Addict. Biol.* 25, 1–9. <https://doi.org/10.1111/adb.12761>

Ezquer, F., Quintanilla, M.E., Moya-Flores, F., Morales, P., Munita, J.M., Olivares, B., Landskron, G., Hermoso, M.A., Ezquer, M., Herrera-Marschitz, M., Israel, Y., 2021. Innate gut microbiota predisposes to high alcohol consumption. *Addict. Biol.* 26, 1–14. <https://doi.org/10.1111/adb.13018>

Farokhnia, M., Browning, B.D., Leggio, L., 2019. Prospects for pharmacotherapies to treat alcohol use disorder: An update on recent human studies. *Curr. Opin. Psychiatry* 32, 255–265. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000519>

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. *J. Physiol.* 595, 5285–5300. <https://doi.org/10.1113/JP273767>

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, 1–8. <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., 2020. Reduced sedation and increased ethanol consumption in knock-in mice expressing an ethanol insensitive alpha 2 subunit of the glycine receptor. *Neuropsychopharmacology* 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0689-9>
- Gallo, E.F., Salling, M.C., Feng, B., Morón, J.A., Harrison, N.L., Javitch, J.A., Kellendonk, C., 2015. Upregulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens indirect pathway increases locomotion but does not reduce alcohol consumption. *Neuropsychopharmacology* 40, 1609–1618. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.11>
- Goulding, S.P., Szumlinski, K.K., Contet, C., MacCoss, M.J., Wu, C.C., 2017. A mass spectrometry-based proteomic analysis of Homer2-interacting proteins in the mouse brain. *J. Proteomics* 166, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.07.008>
- Greg, G., Muse, S. V., 2009. *A Primer of Genome Science*, third edit. ed, Cladistics. Sinauer Associates, Inc. Publishers. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2005.00069.x>
- Havekes, R., Abel, T., 2009. Chapter 1 Genetic Dissection of Neural Circuits and Behavior in *Mus musculus*, 1st ed, *Advances in Genetics*. Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(09\)65001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(09)65001-X)
- Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K., Nakanishi Shigetada, S., 2010. Distinct Roles of Synaptic Transmission in Direct and Indirect Striatal Pathways to Reward and Aversive Behavior. *Neuron* 66, 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.011>
- Horishita, T., Harris, R.A., 2008. n-alcohols inhibit voltage-gated Na<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 270–277. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.138370>

- Jonsson, S., Morud, J., Pickering, C., Adermark, L., Ericson, M., Söderpalm, B., 2012. Changes in glycine receptor subunit expression in forebrain regions of the Wistar rat over development. *Brain Res.* 1446, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.01.050>
- Jun, S.B., Carlson, V.C., Ikeda, S., Lovinger, D., 2011. Vibrodissociation of Neurons from Rodent Brain Slices to Study Synaptic Transmission and Image Presynaptic Terminals. *J. Vis. Exp.* 1–9. <https://doi.org/10.3791/2752>
- Kalivas, P.W., 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561–572. <https://doi.org/10.1038/nrn2515>
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., 2013. *Principles of Neural Science*, 5th ed.
- Kennedy, W.K., Leloux, M., Kutscher, E.C., Price, P.L., Morstad, A.E., Carnahan, R.M., 2010. Acamprosate. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 363–380.
- Kiefer, F., Andersohn, F., Otte, C., Wolf, K., Jahn, H., Wiedemann, K., 2004. Long-term effects of pharmacotherapy on relapse prevention in alcohol dependence. *Acta Neuropsychiatr.* 16, 233–238. [https://doi.org/DOI: 10.1111/j.0924-2708.2004.00093.x](https://doi.org/DOI:10.1111/j.0924-2708.2004.00093.x)
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., Fang, S., 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* 34, 147. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
- Kobayashi, S., Millhorn, D.E., 2001. Hypoxia regulates glutamate metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J. Neurochem.* 76, 1935–1948. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00214.x>
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry* 3, 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)

- Kung, A.Y., Rick, C., Shea, S.O., Harrison, N.L., McGehee, D.S., 2001. Expression of glycine receptors in rat sensory neurons vs . HEK293 cells yields different functional properties. *Neurosci. Lett.* 309, 202–206.
- Larsson, A., Svensson, L., Söderpalm, B., Engel, J.A., 2002. Role of different nicotinic acetylcholine receptors in mediating behavioral and neurochemical effects of ethanol in mice. *Alcohol* 28, 157–167. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(02\)00244-6](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(02)00244-6)
- Ley 20580, 2012. Ley N°20.580, Modifica Ley N° 18.290, Aumenta las sanciones por manejo en estado de ebriedad, bajo la influencia de sustancias estupefacientes o psicotrópicas, y bajo la influencia del alcohol, Ministerio de Transportes, Chile.
- Li, J., Nie, H., Bian, W., Dave, V., Janak, P.H., Ye, J., 2012. Microinjection of Glycine into the Ventral Tegmental Area Selectively Decreases Ethanol Consumption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 196–204.
- Lidö, H.H., Ericson, M., Marston, H., Söderpalm, B., 2011. A role for accumbal glycine receptors in modulation of dopamine release by the glycine transporter-1 inhibitor Org25935. *Front. Psychiatry* 2, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00008>
- Lovinger, D.M., White, G., 2013. Ethanol Potentiation of 5-Hydroxytryptamine<sub>3</sub> Receptor-Mediated Ion Current in Neuroblastoma Cells and Isolated Adult Mammalian Neurons. *Mol. Pharmacol.* 40, 263–270.
- Lu, Y., Ye, J.H., 2011. Glycine-activated chloride currents of neurons freshly isolated from the prefrontal cortex of young rats. *Brain Res.* 1393, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.073>
- Lynch, J.W., 2009. Neuropharmacology Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56, 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.034>
- Maas, C., Tagnaouti, N., Loeblich, S., Behrend, B., Lappe-siefke, C., Kneussel, M., 2006.

- Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J. Cell Biol.* 172, 441–451. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506066>
- 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, 1232–1244. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.326>
- Maleeva, G., Peiretti, F., Zhorov, B.S., Bregestovski, P., 2017. Voltage-Dependent Inhibition of Glycine Receptor Channels by Niflumic Acid. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00125>
- Margolis, E.B., Lock, H., Hjelmstad, G.O., Fields, H.L., 2006. The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J. Physiol.* 577, 907–924. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.117069>
- Marin, M.T., Morais-Silva, G., 2017. Ethanol's Action Mechanisms in the Brain: From Lipid General Alterations to Specific Protein Receptor Binding, Addictive Substances and Neurological Disease: Alcohol, Tobacco, Caffeine, and Drugs of Abuse in Everyday Lifestyles. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805373-7.00016-5>
- McCracken, L.M., Lowes, D.C., Salling, M.C., Carreau-Vollmer, C., Odean, N.N., Yuri A., B., Heinrich, B., Harrisc, R.A., Harrison, N.L., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7179–E7186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703839114>
- Mehta, P., Kreeger, L., Wylie, D.C., Pattadkal, J.J., Lusignan, T., Davis, M.J., Turi, G.F., Li, W.K., Whitmire, M.P., Chen, Y., Kajs, B.L., Seidemann, E., Priebe, N.J., Losonczy, A., Zemelman, B. V., 2019. Functional Access to Neuron Subclasses in Rodent and Primate Forebrain. *Cell Rep.* 26, 2818-2832.e8.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.011>

- Melis, M., Carboni, E., Caboni, P., Acquas, E., 2015. Key role of salsolinol in ethanol actions on dopamine neuronal activity of the posterior ventral tegmental area. *Addict. Biol.* 20, 182–193. <https://doi.org/10.1111/adb.12097>
- Miller, P.S., Harvey, R.J., Smart, T.G., 2004. Differential agonist sensitivity of glycine receptor  $\alpha 2$  subunit splice variants. *Br. J. Pharmacol.* 143, 19–26. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705875>
- Mishra, D., Chergui, K., 2013. Ethanol inhibits excitatory neurotransmission in the nucleus accumbens of adolescent mice through GABAA and GABAB receptors. *Addict. Biol.* 18, 605–613. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00350.x>
- Mitchell, J.M., O'Neil, J.P., Janabi, M., Marks, S.M., Jagust, W.J., Fields, H.L., 2012. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Sci. Transl. Med.* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002902>
- Molander, A., Höfödt Lidö, H., Löf, E., Ericson, M., Söderpalm, B., 2007. The glycine reuptake inhibitor ORG 25935 decreases ethanol intake and preference in male wistar rats. *Alcohol Alcohol.* 42, 11–18. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agl085>
- Molander, A., Löf, E., Stomberg, R., Ericson, M., Söderpalm, B., 2005. Involvement of accumbal glycine receptors in the regulation of voluntary ethanol intake in the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 38–45. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000150009.78622.E0>
- Molander, A., Söderpalm, B., 2005a. Accumbal Strychnine-Sensitive Glycine Receptors : An Access Point for Ethanol to the Brain Reward System. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 27–37. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000150012.09608.81>
- Molander, A., Söderpalm, B., 2005b. Glycine receptors regulate dopamine release in the

- rat nucleus accumbens. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 17–26.  
<https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000150006.17168.F7>
- Molchanova, S.M., Comhair, J., Karadurmus, D., Piccart, E., Harvey, R.J., Rigo, J.-M., Schiffmann, S.N., Brône, B., Gall, D., 2018. Tonicly Active  $\alpha$  2 Subunit-Containing Glycine Receptors Regulate the Excitability of Striatal Medium Spiny Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00442>
- Morales, M., Margolis, E.B., 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 73–85.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Muñoz, B., Gallegos, S., Peters, C., Murath, P., Lovinger, D.M., Homanics, G.E., Aguayo, L.G., 2019. Influence of nonsynaptic  $\alpha$ 1 glycine receptors on ethanol consumption and place preference. *Addict. Biol.* 25, 1–14. <https://doi.org/10.1111/adb.12726>
- Muñoz, B., Yevenes, G.E., Förster, B., Lovinger, D.M., Aguayo, L.G., 2018. Presence of Inhibitory Glycinergic Transmission in Medium Spiny Neurons in the Nucleus Accumbens. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 1–15.  
<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>
- Nestler, E.J., 2001. MOLECULAR BASIS OF LONG-TERM PLASTICITY UNDERLYING ADDICTION. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128.
- Nestoros, J.N., 1980. Ethanol Specifically Potentiates GABA-Mediated Neurotransmission in Feline Cerebral Cortex 209, 708–710.
- Nie, Z., Madamba, S.G., Siggins, G.R., 1994. Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. *J.*

Pharmacol. Exp. Ther. 271, 1566 LP – 1573.

Pribillal, I., Takagi, T., Langosch, D., Bormann, J., Betz, H., 1992. The atypical M2 segment of the  $\beta$  subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. *EMBO J.* 11, 4305–4311. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05529.x>

Purohit, K., Parekh, P.K., Kern, J., Logan, R.W., Liu, Z., Huang, Y., McClung, C.A., Crabbe, J.C., Ozburn, A.R., 2018. Pharmacogenetic Manipulation of the Nucleus Accumbens Alters Binge-Like Alcohol Drinking in Mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 42, 879–888. <https://doi.org/10.1111/acer.13626>

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2004. *NEUROSCIENCE*, 3rd ed.

Quadir, S.G., Santos, J.R.B. Dos, Campbell, R.R., Wroten, M.G., Singh, N., Holloway, J.J., Bal, S.K., Camarini, R., Szumlinski, K.K., 2016. Homer2 regulates alcohol and stress cross-sensitization. *Addict. Biol.* 21, 613–633. <https://doi.org/10.1111/adb.12252>

Quintanilla, M.E., Ezquer, F., Morales, P., Santapau, D., Berríos-Cárcamo, P., Ezquer, M., Herrera-Marschitz, M., Israel, Y., 2019. Intranasal mesenchymal stem cell secretome administration markedly inhibits alcohol and nicotine self-administration and blocks relapse-intake: Mechanism and translational options. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1304-z>

Quintanilla, M.E., Rivera-Meza, M., Berríos-Cárcamo, P., Cassels, B.K., Herrera-Marschitz, M., Israel, Y., 2016. (R)-Salsolinol, a product of ethanol metabolism, stereospecifically induces behavioral sensitization and leads to excessive alcohol intake. *Addict. Biol.* 21, 1063–1071. <https://doi.org/10.1111/adb.12268>

Raistrick, D., Heather, N., Godfrey, C., 2006. A Review of the Effectiveness of Treatment

for Alcohol Problems. Natl. Treat. Agency Subst. Misuse.

Rang, H.P., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2016. Rang & Dales's Pharmacology, 8th ed.

Richardson, B.D., Rossi, D.J., 2017. Recreational concentrations of alcohol enhance synaptic inhibition of cerebellar unipolar brush cells via pre- and postsynaptic mechanisms. *J. Neurophysiol.* 118, 267–279. <https://doi.org/10.1152/jn.00963.2016>

Rivera-Meza, M., Vásquez, D., Quintanilla, M.E., Lagos, D., Rojas, B., Herrera-Marschitz, M., Israel, Y., 2019. Activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) by ALDA-1 reduces both the acquisition and maintenance of ethanol intake in rats: A dual mechanism? *Neuropharmacology* 146, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.001>

Russo, S.J., Nestler, E.J., 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 609–625. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>

San Martín, L., Cerda, F., Jiménez, V., Fuentealba, J., Muñoz, B., Aguayo, L.G., Guzmán, L., 2012. Inhibition of the Ethanol-induced Potentiation of  $\alpha 1$  Glycine Receptor by a Small Peptide That Interferes with  $G\beta\gamma$  Binding. *J. Biol. Chemistry* 287, 40713–40721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393603>

San Martín, L., Gallegos, S., Araya, A., Romero, N., Morelli, G., Comhair, J., Harvey, R.J., Rigo, J.M., Brone, B., Aguayo, L.G., 2020. Ethanol consumption and sedation are altered in mice lacking the glycine receptor  $\alpha 2$  subunit. *Br. J. Pharmacol.* 177, 3941–3956. <https://doi.org/10.1111/bph.15136>

Sánchez, A., Yévenes, G.E., Martín, L.S., Burgos, C.F., Moraga-cid, G., Harvey, R.J., Aguayo, L.G., 2015. Control of Ethanol Sensitivity of the Glycine Receptor  $\alpha 3$  Subunit by Transmembrane 2, the Intracellular Splice Cassette and C-Terminal Domain s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 80–90.

- Sesack, S.R., Grace, A.A., 2009. Cortico-Basal Ganglia Reward Network : Microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35, 27–47. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.93>
- Setiawan, E., Pihl, R.O., Dagher, A., Schlagintweit, H., Casey, K.F., Benkelfat, C., Leyton, M., 2014. Differential Striatal Dopamine Responses Following Oral Alcohol in Individuals at Varying Risk for Dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 126–134. <https://doi.org/10.1111/acer.12218>
- Simmons, S.C., Wheeler, K., Mazei-robison, M.S., 2019. Determination of circuit-specific morphological adaptations in ventral tegmental area dopamine neurons by chronic morphine. *Mol. Brain* 12, 1–10.
- Skvorak, K., Vissel, B., Homanics, G.E., 2006. Production of conditional point mutant knockin mice. *Genesis* 44, 345–53. <https://doi.org/10.1002/dvg.20222>
- Smothers, C.T., Szumlinski, K.K., Worley, P.F., Woodward, J.J., 2016. Altered NMDA receptor function in primary cultures of hippocampal neurons from mice lacking the Homer2 gene. *Synapse* 70, 33–39. <https://doi.org/10.1002/syn.21869>
- Soares-Cunha, C., de Vasconcelos, N.A.P., Coimbra, B., Domingues, A.V., Silva, J.M., Loureiro-Campos, E., Gaspar, R., Sotiropoulos, I., Sousa, N., Rodrigues, A.J., 2020. Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol. Psychiatry* 25, 3241–3255. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0484-3>
- Söderpalm, B., Lidö, H.H., Ericson, M., 2017. The Glycine Receptor — A Functionally Important Primary Brain Target of Ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 41, 1816–1830. <https://doi.org/10.1111/acer.13483>
- Stephens, D.N., King, S.L., Lambert, J.J., Belelli, D., Duka, T., 2017. GABAA receptor subtype involvement in addictive behaviour. *Genes, Brain Behav.* 16, 149–184. <https://doi.org/10.1111/gbb.12321>

- Stover, J.F., Pleines, U.E., Morganti-Kossmann, M.C., Krossmann, T., Lowitzsch, K., O.S., K., 1997. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur. J. Clin. Invest.* 27, 1038–1043.
- Strong, C.E., Hagarty, D.P., Guerrero, A.B., Schoepfer, K.J., Cajuste, S.M., Kabbaj, M., 2020. Chemogenetic selective manipulation of nucleus accumbens medium spiny neurons bidirectionally controls alcohol intake in male and female rats. *Sci. Rep.* 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76183-2>
- Szumliński, K.K., Ary, A.W., Lominac, K.D., Klugmann, M., Kippin, T.E., 2008. Accumbens Homer2 Overexpression Facilitates Alcohol-Induced Neuroplasticity in C57BL / 6J Mice 1365–1378. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301473>
- Thanos, P.K., Rivera, S.N., Weaver, K., Grandy, D.K., Rubinstein, M., Umegaki, H., Wang, G.J., Hitzemann, R., Volkow, N.D., 2005. Dopamine D2R DNA transfer in dopamine D2 receptor-deficient mice: Effects on ethanol drinking. *Life Sci.* 77, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.061>
- Thanos, P.K., Taintor, N.B., Rivera, S.N., Umegaki, H., Ikari, H., Roth, G., Ingram, D.K., Hitzemann, R., Fowler, J.S., Gatley, S.J., Wang, G.J., Volkow, N.D., 2004. DRD2 gene transfer into the nucleus accumbens core of the alcohol preferring and nonpreferring rats attenuates alcohol drinking. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 28, 720–728. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000125270.30501.08>
- Thanos, P.K., Volkow, N.D., Freimuth, P., Umegaki, H., Ikari, H., Roth, G., Ingram, D.K., Hitzemann, R., 2001. Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self-administration. *J. Neurochem.* 78, 1094–1103. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00492.x>
- 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, 235–241.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.08.005>

Tyndale, R.F., Hales, T.G., Olsen, R.W., Tobin, A.J., 1994. Distinctive patterns of GABA(A) receptor subunit mRNAs in 13 cell lines. *J. Neurosci.* 14, 5417–5428.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05417.1994>

Vashchinkina, E., Panhelainen, A., Aitta-aho, T., Korpi, E.R., 2014. GABAA receptor drugs and neuronal plasticity in reward and aversion: Focus on the ventral tegmental area.

*Front. Pharmacol.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00256>

Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., Spanagel, R., 2008. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154, 299–315.

<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.30>

Volkow, N.D., Morales, M., 2015. Review The Brain on Drugs : From Reward to Addiction.

*Cell* 162, 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>

Wang, F., Xiao, C., Ye, J.H., 2005. Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurones in ventral tegmental area of young rats. *J. Physiol.*

565, 503–516. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.085423>

Wang, X., Wang, G., Lemos, J.R., Treistman, S.N., 1994. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel in neurohypophysial terminals. *J. Neurosci.* 14, 5453–5460.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-09-05453.1994>

WHO, 2018. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization, Geneva PP - Geneva.

Wilson, D.E., Smith, G.B., Jacob, A.L., Walker, T., Dimidschstein, J., Fishell, G., Fitzpatrick, D., 2017. GABAergic Neurons in Ferret Visual Cortex Participate in

Functionally Specific Networks. *Neuron* 93, 1058-1065.e4.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.035>

Witkiewitz, K., Hamreus, K., 2012. Acamprosate for treatment of alcohol dependence :

- mechanisms , efficacy , and clinical utility. *Ther. Clin. Risk Manag.* 8, 45–53.
- Wittekindt, B., Malany, S., Schemm, R., Otvos, L., Laube, B., Betz, H., 2001. Point mutations identify the glutamate binding pocket of the N-methyl-d-aspartate receptor as major site of Conantokin-G inhibition. *Neuropharmacology* 41, 753–761.
- Xu, T. Le, Gong, N., 2010. Glycine and glycine receptor signaling in hippocampal neurons: Diversity, function and regulation. *Prog. Neurobiol.* 91, 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.008>
- Xu, T.-L., 2007. Inhibitory Transmission, in: Zhuo, M. (Ed.), *Molecular Pain*. Springer New York, New York, NY, pp. 157–168. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-75269-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-0-387-75269-3_13)
- Ye, J., 2000. Physiology and pharmacology of native glycine receptors in developing rat ventral tegmental area neurons. *Brain Res.* 862, 74–82.
- Ye, J., Wang, F., Krnjevic, K., Wang, W., Xiong, Z., Zhang, J., 2004. Presynaptic Glycine Receptors on GABAergic Terminals Facilitate Discharge of Dopaminergic Neurons in Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 24, 8961–8974. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2016-04.2004>
- Yevenes, G.E., Moraga-cid, G., Avila, A., Guzmán, L., Figueroa, M., Peoples, R.W., Aguayo, L.G., 2010. Molecular Requirements for Ethanol Differential Allosteric Modulation of Glycine Receptors Based on Selective G $\beta\gamma$  Modulation. *J. Biol. Chemistry* 285, 30203–30213. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134676>
- Yevenes, G.E., Moraga-cid, G., Peoples, R.W., 2008. A selective G $\beta\gamma$  -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 20523–20528.
- Yevenes, G.E., Peoples, R.W., Tapia, J.C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., Aguayo, L.G., 2003. Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nat. Neurosci.* 6, 819–824. <https://doi.org/10.1038/nn1095>

- Yevenes, G.E., Zeilhofer, H.U., 2011a. Allosteric modulation of glycine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 164, 224–236. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01471.x>
- Yevenes, G.E., Zeilhofer, H.U., 2011b. Molecular Sites for the Positive Allosteric Modulation of Glycine Receptors by Endocannabinoids. *PLoS One* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023886>
- Yoder, K.K., Albrecht, D.S., Dziedzic, M., Normandin, M.D., Federici, L.M., Graves, T., Herring, C.M., Hile, K.L., Walters, J.W., Liang, T., Plawecki, M.H., O'Connor, S., Kareken, D.A., 2016. Differences in IV alcohol-induced dopamine release in the ventral striatum of social drinkers and nontreatment-seeking alcoholics. *Drug Alcohol Depend.* 160, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.01.001>
- Zeilhofer, H.U., Studler, B., Arabadzisz, D., Schweizer, C., Ahmadi, S., Layh, B., Bo, M.R., Fritschy, J.-M., 2005. Glycinergic Neurons Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein in Bacterial Artificial Chromosome Transgenic Mice. *J. Comp. Neurol.* 482, 123–141. <https://doi.org/10.1002/cne.20349>
- Zhang, L.H., Gong, N., Fei, D., Xu, L., Xu, T. Le, 2008. Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition. *Neuropsychopharmacology* 33, 701–711. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301449>
- Zhang, Y., Dixon, C.L., Keramidas, A., Lynch, J.W., 2015. Functional reconstitution of glycinergic synapses incorporating defined glycine receptor subunit combinations. *Neuropharmacology* 89, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.026>
- Zheng, F., Johnson, S.W., 2001. Glycine receptor-mediated inhibition of dopamine and non-dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. *Brain Res.* 919, 313–317.
- Zhu, L., Ye, J.H., 2005. The role of G proteins in the activity and ethanol modulation of

glycine-induced currents in rat neurons freshly isolated from the ventral tegmental area. *Brain Res.* 1033, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.027>