



Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Programa de Doctorado en Biomedicina, investigación traslacional y
nuevas tecnologías en salud

TESIS DOCTORAL

Papel del fragmento de Galanina (1-15) en el trastorno por uso de alcohol y en la comorbilidad alcoholismo- depresión.

Role of the N-terminal fragment of Galanin 1-15 in Alcohol Use
Disorder: Implication in the comorbidity of alcoholism and depression.

Directores:

Prof. Dra. Zaida Díaz Cabiale
Prof. Dr. Carmelo Millón Peñuela

Memoria presentada por **Noelia Cantero García** para optar al grado
de doctor por la Universidad de Málaga

Málaga, julio 2024



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Noelia Cantero García

 <https://orcid.org/0000-0003-3233-7532>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña NOELIA CANTERO GARCÍA

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: PAPEL DEL FRAGMENTO DE GALANINA (1-15) EN EL TRASTORNO POR USO DE ALCOHOL Y EN LA COMORBILIDAD ALCOHOLISMO-DEPRESIÓN.

Realizada bajo la tutorización de ZAIDA DÍAZ CABIALE y dirección de CARMELO MILLÓN PEÑUELA Y ZAIDA DÍAZ CABIALE (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 25 de JULIO de 2024

Fdo.: Doctorando/a	Fdo.: Tutor/a





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.:

Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es



Dña. ZAIDA DÍAZ CABIALE, Catedrática del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva de la Universidad de Málaga y D. CARMELO MILLÓN PEÑUELA, Profesor Titular del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que Dña. **NOELIA CANTERO GARCÍA** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo recogido en la presente Memoria titulada “Papel del fragmento de Galanina (1-15) en el trastorno por uso de alcohol y en la comorbilidad alcoholismo-depresión”. Revisado el trabajo y considerar que la memoria reúne todo el rigor científico y los requisitos necesarios para ser sometido a juicio de la comisión correspondiente, autorizamos su exposición y defensa para optar al grado de doctor por la Universidad de Málaga.

Y que las publicaciones que avalan la presente tesis doctoral y cuyas referencias son:

- Cantero-García N, Flores-Burgess A, Pineda-Gómez JP, Orio L, Serrano A, Díaz-Cabiale Z, Millón C. Galanin N-terminal fragment (1-15) reduces alcohol seeking and alcohol relapse in rats: Involvement of mesocorticolimbic system. *Biomed Pharmacother.* 2022 Sep;153:113508. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113508.
- Cantero-García N, Flores-Burgess A, Ladrón de Guevara-Miranda D, Serrano A, García-Durán L, Puigcerver A, Fuxe K, Narváez JÁ, Santín LJ, Díaz-Cabiale Z, Millón C. The Combination of Galanin (1-15) and Escitalopram in Rats Suggests a New Strategy for Alcohol Use Disorder Comorbidity with Depression. *Biomedicines.* 2022 Feb 9;10(2):412. doi: 10.3390/biomedicines10020412

no han sido utilizadas en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Málaga a 25 de julio de 2024.

Fdo. Dña. Zaida Díaz Cabiale

Fdo. D. Carmelo Millón Peñuela

Agradecimientos

Es muy emocionante para mi poder estar escribiendo estos agradecimientos de mi tesis doctoral, que llega ya a su fin. No ha sido un camino fácil, pero miro atrás y me siento orgullosa de ver todo lo que he conseguido y de las personas que he tenido a mi alrededor que me han ayudado y apoyado durante todo este tiempo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis la oportunidad de haber podido realizar este trabajo, ya que sin ellos esto no hubiera sido posible. Gracias Zaida Díaz Cabiale por la confianza que has depositado en mí estos años, gracias a ello he podido formar parte de este grupo de investigación tan bueno del que he aprendido tanto y del que espero seguir aprendiendo. Tu disciplina y tu labor científica me han ayudado a crecer tanto profesional como personalmente como nunca me hubiera imaginado. Gracias de corazón por haberlo hecho posible.

Carmelo Millón Peñuela, gracias por haberme orientado y guiado tan bien en todo este largo proceso, para mí has sido más que un director de tesis. Gracias por transmitirme tu pasión y tu entrega por la ciencia, por cada reunión en la que me has enseñado siempre algo nuevo de lo que aprender, por tu paciencia y bondad conmigo y, sobre todo, por hacerme crecer en la investigación, me has dado las mejores herramientas para convertirme en la investigadora que quiero ser y con los principios que quiero tener. Gracias por impulsarme y creer en mí, has sido una pieza fundamental en este trabajo.

A Antonio, gracias por ayudarme y ofrecerme tu ayuda siempre que lo he necesitado, por tus consejos, tus ánimos y por ese humor que te caracteriza.

A mis compañeros de grupo de investigación, Marta y Juan Pedro, han sido largas horas de estabulario y laboratorio que sin duda han sido más a menos gracias a vosotros. Compartir agobios, dudas, comidas, risas e ir a congresos juntos hacen que todo sea mejor y que el trabajo sea menos trabajo. A Amel, gracias por ayudarme en los últimos meses de tesis.

Quisiera agradecer a todos los miembros del departamento de Fisiología Humana del que formo parte, que me acogieron desde el primer momento y que de una forma u otra me han ayudado en este camino: María, Pablo Lara, Yanina, Laura, Belén, Silvia, Laura C, Estrella, Pablo Z, Manuel Víctor, Marta G., Amelia, Miguel Ángel Barbancho, Marc Estefan, Manuel Narváez. A los miembros del departamento de psicobiología Luis, Araceli, Emma, David y Sara por vuestra ayuda en protocolos de experimentos y diseño de datos. También quisiera agradecer al personal del estabulario y del SCAI ya que sin su apoyo y ayuda esta tesis doctoral no habría sido posible.

Durante mi período de estancia internacional en Camerino (Italia) tuve la suerte de conocer a increíbles personas de las que aprendí mucho y que se convirtieron en familia durante tres meses. Gracias a Roberto Ciccocioppo y a su grupo de investigación por acogerme en vuestro laboratorio y considerarme una más, ha sido una experiencia que no olvidaré nunca. Gracias en especial a Adana, por tu bondad y tu amistad en este corto período de tiempo, te llevaré siempre en el corazón.

Y, por supuesto, agradecer a mi familia. A mis padres, José Luis y Pilar, gracias por la educación que me habéis dado, por celebrar conmigo y estar ahí en cada paso que he dado y fundamentalmente, por vuestro amor incondicional.

A mi hermano Christian, por ser mi mejor amigo, por escucharme siempre y por los buenos momentos que pasamos cada vez que estamos juntos. Somos uno. Sin vosotros esto no hubiera sido posible os quiero muchísimo.

A mis abuelos, Antonio y María, mis personas favoritas, gracias por quererme tanto como lo hacéis, por alegraros más que yo misma por todos mis logros. Sois mi luz.

Y, por último, mi más profundo agradecimiento a Manu, mi compañero de vida. Gracias por tu paciencia infinita, por tus consejos, por cuidarme tanto y tan bien como lo haces. Sin ti no lo hubiera conseguido. Eres mi apoyo fundamental. Te quiero.

A mis abuelos, a mi familia, a Manu

*“El único modo de hacer un gran trabajo
es amar lo que haces”*

- Steve Jobs

*“El que no lleva la belleza
dentro del alma no la encontrará en ninguna parte”*

- Noel Clarasó



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados y presentados en los siguientes artículos y congresos científicos:

- Artículo: **“Galanin N-terminal fragment (1-15) reduces alcohol seeking and alcohol relapse in rats: Involvement of mesocorticolimbic system”**
Autores: Cantero-García N, Flores-Burgess A, Pineda-Gómez JP, Orio L, Serrano A, Díaz-Cabiale Z, Millón C. Biomed Pharmacother. 2022 Sep; 153:113508. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113508.
- El artículo **“Galanin N-terminal fragment (1-15) reduces alcohol seeking and alcohol relapse in rats: Involvement of mesocorticolimbic system”** ha sido galardonado con el premio ciencias de la salud “Kjell Fuxe” en la XIII convocatoria de los Premios de Investigación de la Universidad de Málaga-Fundación General de la Universidad de Málaga. Octubre 2023.
- Artículo: **“The combination of Galanin (1-15) and escitalopram in rats suggests a new strategy for alcohol use disorder comorbidity with depression”**. Autores: Cantero-García N, Flores-Burgess A, Ladrón de Guevara-Miranda D, Serrano A, García-Durán L, Puigcerver A, Fuxe K, Narváez JA, Santín LJ, Díaz-Cabiale Z, Millón C. Biomedicines. 2022 Feb9;10(2):412. doi: 10.3390/biomedicines10020412.
- FENS-HERTIE Winter School 2023. **“N-terminal Fragment of Galanin 1-15 as a novel strategy to reduce alcohol consumption in rats”**. Noelia Cantero-García, Marta Flores-Gómez, Antonio Flores-Burgess, Juan Pedro Pineda-Gómez, Laura Orio, Antonia Serrano, Zaida Díaz-Cabiale, Carmelo Millón. FENS-HERTIE Winter School 2023. Neuroscience of Mental Health, Obergurgl, Austria. 03/12/23 – 09/12/23
- Beca competitiva para la asistencia a la Winter School organizada por la Federación Europea de Neurociencias (FENS) sobre salud mental en Obergurgl, Austria (diciembre 2023).

- IBRO World Congress of Neuroscience. **“Galanin N-terminal fragment (1-15) reduces alcohol consumption in the self-administration with involvement of mesocorticolimbic system in rats”**. Noelia Cantero-García, Marta Flores-Gómez, Antonio Flores-Burgess, Juan Pedro Pineda-Gómez, Laura Orio, Antonia Serrano, Zaida Díaz-Cabiale, Carmelo Millón. 9-13 septiembre 2023, Granada, España.
- IBRO World Congress of Neuroscience. **“The combination of Galanin (1-15) and escitalopram decrease the alcohol self-administration in rats through the functional network ventral tegmental area –dorsal raphe”**. M. Flores Gómez, N. Cantero García, A. Flores Burgess, J.P. Pineda Gómez, A. Serrano, L. Orio, A. Puigcerver, L.J. Santín, C. Millón Peñuela, Z. Díaz Cabiale. 9-13 septiembre 2023, Granada, España.
- Congreso I jornadas jóvenes investigadores en fisiología: **“La combinación Galanina (1-15) y escitalopram disminuye la motivación por reforzantes artificiales como la sacarina y el alcohol en rata”**. Marta Flores-Gómez, Noelia Cantero-García, Antonio Flores-Burgess, Juan Pedro Pineda-Gómez, Antonia Serrano, Laura Orio, Araceli Puigcerver, Luis Santín, Zaida Díaz-Cabiale & Carmelo Millón. 28 octubre 2022, Madrid, España.
- Federation of European Neuroscience Societies (FENS). **“Galanin (1-15) and escitalopram combination in rats reduces alcohol consumption in the ethanol self-administration test and improves escitalopram effects in the forced swimming test”** N. Cantero-García, A. Flores-Burgess, D. Ladrón de Guevara-Miranda, A. Serrano, L. García-Durán, A. Puigcerver, K. Fuxe, JA. Narváez, L. Santín, Z. Díaz-Cabiale & C. Millón. 9-13 julio 2022, París, Francia.

Los trabajos de investigación realizados para la elaboración de la presente tesis doctoral han sido financiados por los siguientes entidades y proyectos de investigación:

- Título del proyecto: “Nueva terapia de potenciación: Galanina (1-15) y los inhibidores de la recaptación de serotonina para el tratamiento de la depresión y otros desórdenes psicóticos” (**PDC2021-121566-I00**). Investigador principal: Zaida Díaz Cabiale. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Duración: 24/11/2021-24/11/2023. Financiación recibida: 138.000€.
- Título del proyecto: "Galanina (1-15) y anhedonia: nueva intervención terapéutica antidepressiva" (**UMA18-FEDERJA-008**). Investigadora principal: Zaida Díaz Cabiale. Junta de Andalucía, 10/12/2019 - 14/11/2022. Financiación recibida: 57.599€.
- Título del proyecto: "Estudio traslacional de la implicación del fragmento n-terminal 1-15 de Galanina en la dependencia del alcohol: nuevas estrategias terapéuticas y evaluación de biomarcadores en la adicción" (**PI-0083-2019**). Investigador principal: Carmelo Millón Peñuela. Conserjería de Salud y Familia, 23/12/2019-22/12/2022. Financiación recibida: 52.000 €.
- Título del proyecto: “Aislamiento social en la pandemia de COVID-19 y consumo de alcohol: Combinación Galanina(1-15)-Naltrexona como estrategia terapéutica” (**EXP2022/008766**). Investigador Principal: Carmelo Millón Peñuela. Plan Nacional sobre Drogas. 12/07/23 – 12/01/25. Financiación recibida: 116.985,53 €.

Abreviaturas

5-HT1AR: Receptor 5-HT1A.

5-HT: Serotonina.

8-OH-DPAT: 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AUDIT: Test de Identificación de Trastornos por Uso de Alcohol.

ATV: Área tegmental ventral.

B_{max}: Número de sitios de unión.

CAGE: Cuestionario para problemas con el alcohol.

CB1: Receptor cannabinoide tipo 1.

CDT: Transferrina Deficiente en Carbohidratos.

CPF: Corteza prefrontal.

CRF: Factor liberador de corticotropina.

COVID-19: Enfermedad por Coronavirus 2019.

D1: Receptor de dopamina tipo 1.

D2: Receptor de dopamina tipo 2.

D3: Receptor de dopamina tipo 3.

DA: Dopamina.

DAT: Transportador activo de dopamina.

DSM: Manual de Diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.

DSM-V: Quinta edición del Manual de Diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos.

EPM: Laberinto elevado en cruz.

ESC: Escitalopram.

FDA: "American Food and Drug Administration".

F-FDG: 18F-fluorodesoxiglucosa.

FLX: Fluoxetina.

FST: Test de natación forzada.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

GAL: Galanina.

GAL(1-15): Fragmento N-terminal de Galanina.

GALP: Péptido similar a la Galanina.

GALR1: Receptor Galaninérgico tipo I.

GALR2: Receptor Galaninérgico tipo II.

GALR3: Receptor Galaninérgico tipo III.

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.

GGT: Gamma-glutamyl transferasa.

GLU: Glutamato.

GMAP: Péptido mensajero asociado a Galanina.

Gr: Gramos

HbL: Habénula lateral.

Icv: Intracerebroventricular.

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

Kd: Constante de disociación.

MADRS: Escala de evaluación de la depresión de Montgomery-Åsberg.

MAST: Test de Detección de Alcoholismo de Michigan.

MsP: Cepa Marchigian Sardinian.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NPY: Neuropeptido Y.

MSN: Neuronas espinosas medianas.

NAC: Núcleo Accumbens.

LCRa: Líquido cefalorraquídeo artificial.

OBX: Bulbectomía olfatoria.

OFT: Test del campo abierto.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PET: Tomografía por Emisión de Positrones.

PLA: Ensayo de ligamiento por proximidad.

PLC: fosfolipasa C.

PVN: Núcleo paraventricular.

q-PCR-rt: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

RD: Núcleo rafe dorsal.

RMTg: Núcleo tegmental rostromedial mesopontino.

SHAPS: Escala de placer de Snaith-Hamilton.

SiRNA-GALR1: Reactivo comercial Acell siRNA para GALR1.

SiRNA-GALR2: Reactivo comercial Acell siRNA para GALR2.

SNC: Sistema nervioso central.

SPT: Test de preferencia de sacarosa.

TST: Test de suspensión de la cola.

TUA: Trastorno por uso de alcohol.

VCM: Volumen Corpuscular Medio.

Veh: Vehículo.

Vmat2: Transportador de Monoaminas Vesiculares.

Resumen

El trastorno por uso de alcohol (TUA) es uno de los trastornos más comunes en todo el mundo, caracterizado por una alteración de la capacidad para detener o controlar el consumo de alcohol a pesar de sus consecuencias negativas. Otro factor relevante es que más del 50% de los nuevos pacientes con abuso de alcohol recaen en el plazo de tres meses siendo el principal desencadenante los acontecimientos estresantes, las señales y el contexto asociados a las drogas o la reexposición a una pequeña cantidad de alcohol. A pesar de ello, las farmacoterapias han tenido un uso limitado en el tratamiento del TUA en parte debido a la baja eficacia de la medicación. Además, más del 50% de los pacientes con trastorno por uso de alcohol presentan un trastorno psiquiátrico comórbido, como los trastornos del estado de ánimo.

La Galanina (GAL) es un péptido que se encuentra en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se ha visto que existen fragmentos activos de GAL, como el fragmento N-terminal 1-15 [GAL(1-15)], el cual presenta actividad biológica en el SNC. Este fragmento, GAL(1-15), ha mostrado un papel específico y diferencial con respecto a la molécula completa GAL, en distintas funciones, específicamente en aspectos de la depresión como la anhedonia, así como en la modulación de drogas de abuso, en concreto en el consumo voluntario de alcohol. **En esta tesis doctoral se plantea el estudio de la GAL(1-15) en la búsqueda y motivación por el alcohol así como en la recaída alcohólica en un modelo de autoadministración. Además, debido a que la depresión es uno de los trastornos comórbidos más frecuentes en el alcoholismo, se analizará la combinación de GAL(1-15) con el antidepresivo Escitalopram (ESC) en la autoadministración de alcohol además en conductas depresivas y ansiogénicas en roedores durante un consumo de alcohol crónico.**

Los resultados de la presente tesis demuestran que la administración intracerebroventricular (icv) de GAL(1-15) 3nmol induce una importante reducción en el consumo y la búsqueda de alcohol, reflejado en un menor número de refuerzos obtenidos en un modelo de autoadministración. Además, se demostró la implicación del receptor GALR2 en este efecto mediante el uso de un antagonista específico para GALR2 (M871), donde la administración del mismo bloqueó el efecto producido por GAL(1-15). Mediante un modelo de silenciamiento génico in vivo (knockdown), se mostró la implicación del receptor GALR1 así como la confirmación de implicación de GALR2 ya que la disminución de expresión de los receptores GALR1 o GALR2 mediante siRNA fue suficiente para bloquear el efecto de GAL(1-15). Además, estos efectos son específicos de GAL(1-15), ya que la molécula completa de GAL carece de efecto en esta prueba.

Los estudios de q-PCR revelaron que GAL(1-15) indujo un aumento significativo de los niveles de ARNm del marcador neuronal C-Fos en los principales núcleos del sistema de recompensa como son el área tegmental ventral (ATV), el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF). GAL(1-15) no solo reduce el número de refuerzos de alcohol en un ratio fijo 1 (FR1) sino que también lo hace en un ratio progresivo, donde la administración de GAL(1-15) 3 nmol fue capaz de reducir de forma significativa el breaking point en comparación con los animales controles.

La recaída alcohólica es un factor relevante en el TUA y es por ello que ha sido objetivo de estudio en la presente tesis. Así, tras un periodo de autoadministración de alcohol en un contexto A, se realizó la extinción de la conducta en un contexto diferente (Contexto B). Durante el periodo de extinción los animales disminuyeron progresivamente las pulsaciones de la palanca activa, hasta alcanzar el criterio de extinción en el día 13.

Tras introducir de nuevo el contexto original (contexto A), se produjo un aumento significativo en la búsqueda de alcohol de los animales, indicando una recaída alcohólica, sin embargo, los animales inyectados con GAL(1-15) redujeron las pulsaciones de palanca activa de forma significativa en comparación con los animales controles, lo que muestra un papel específico de este fragmento en este tipo de recaída. Una vez analizado el perfil farmacológico de la GAL(1-15) se estudió una vía de administración alternativa compatible con su traslación al uso en humanos, así se observó que la vía de administración intranasal es compatible con el uso de GAL(1-15) ya que replica los efectos producidos por la administración intracerebroventricular de GAL(1-15).

En esta tesis también se ha evaluado la combinación de GAL(1-15) y el antidepresivo ESC para el estudio de la comorbilidad alcoholismo-depresión.

Los experimentos realizados demuestran que la coadministración de GAL(1-15) con ESC disminuye el poder de recompensa de sacarosa o sacarina en el paradigma de autoadministración, siendo además más potente que la mostrada por el ESC en solitario. Además, la coadministración de GAL(1-15)+ESC induce una reducción de la conducta de búsqueda de alcohol en la prueba de autoadministración, lo que indica una potenciación del efecto de ESC en esta prueba que lleva a una disminución de la motivación por el alcohol.

En animales con consumo crónico de alcohol, la administración de GAL(1-15) revirtió los efectos adversos mediados por ESC en la prueba de desesperanza FST (Test de natación forzada), lo que confirma que la combinación GAL(1-15) + ESC mejora los síntomas depresivos en un modelo de comorbilidad alcoholismo-depresión.

Estudios inmunohistoquímicos revelaron que la coadministración de GAL(1-15)+ESC disminuyó significativamente la activación de células dopaminérgicas en el ATV, observadas mediante expresión de C-Fos. Además, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) que sugirió la existencia de una red funcional que está implicada en los efectos sobre la autoadministración de alcohol, que involucra a los núcleos ATV, núcleo tegmental rostromedial (RMTg) y rafe dorsal (RD), lo que refuerza la importancia del ATV en el efecto mediado por la combinación de GAL(1-15)+ESC en la búsqueda de alcohol.

Estos resultados muestran que GAL(1-15) tiene un papel específico en el consumo y búsqueda de alcohol, así como en la recaída alcohólica, lo que sugiere que la administración de GAL(1-15) podría ser una posible diana terapéutica para el trastorno por uso de alcohol. Por otro lado, la combinación de GAL(1-15) y ESC reduce la motivación por la búsqueda de alcohol además de revertir el efecto producido por la administración única de ESC en el FST, lo que sugiere que la combinación GAL(1-15)+ESC podría utilizarse como una estrategia terapéutica para la comorbilidad alcoholismo-depresión.

Índice

INTRODUCCIÓN

1. El trastorno por uso de alcohol (TUA).....	3
1.1 Epidemiología y criterios diagnósticos	3
1.1.1 Etapas en la adquisición del consumo de alcohol.....	7
1.2 Neurobiología del TUA.....	10
1.2.1 Circuito de recompensa.....	10
1.2.2 Cambios neurobiológicos en el TUA.....	15
1.3 Tratamiento farmacológico del TUA.....	21
1.4 Pruebas conductuales en animales para la evaluación del trastorno por uso de alcohol.....	23
2. Comorbilidad alcoholismo y depresión.....	30
2.1 Neurobiología de la comorbilidad TUA-depresión.....	31
2.2 Tratamiento del TUA y trastornos depresivos concurrentes.....	34
3. Galanina y el fragmento N-terminal 1-15 de Galanina.....	37
3.1 Galanina.....	37
3.2 Fragmento N-terminal 1-15 de Galanina[GAL(1-15)]	42
3.2.1 GAL(1-15) en el sistema de refuerzo: anhedonia y consumo de alcohol.....	48

OBJETIVOS	53

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología animal.....	58
1.1 Animales de experimentación.....	58
1.1.1 Cepa Sprague – Dawley.....	58
1.1.2 Cepa Marchigian Sardinian (msP).....	59
1.2 Cirugía estereotáxica con implantación de cánula crónica Intracerebroventricular lateral.....	60
1.3 Administración de sustancias.....	62
1.3.1 Inyección intracerebroventricular.....	62
1.3.2 Inyección intraperitoneal.....	63

1.3.3 Inyección intranasal.....	63
2. Procedimientos experimentales.....	64
2.1 Condiciones de la sala de experimentación.....	64
2.2 Manipulación y habituación de los animales de experimentación...	65
2.3 Pruebas de comportamiento animal.....	65
2.3.1 Test del campo abierto.....	65
2.3.2 Test del laberinto elevado en cruz.....	66
2.3.3 Test de Natación Forzada.....	68
2.3.4 Test de Suspensión de la Cola	70
2.3.5 Test de Preferencia de Sacarosa.....	71
2.3.6 Prueba de autoadministración.....	72
2.3.6.1 Autoadministración de sacarina.....	75
2.3.6.2 Autoadministración de alcohol.....	75
2.4 Obtención y procesamiento del tejido cerebral.....	80
2.4.1 Perfusión intracardíaca.....	80
2.4.2 Procesamiento del tejido cerebral perfundido.....	82
2.4.3 Procesamiento del tejido cerebral fresco.....	82
2.4.4 Técnicas Inmunohistoquímicas.....	83
2.4.4.1 Inmunohistoquímica simple.....	84
2.4.4.2 Inmunohistoquímica doble.....	86
2.4.4.3 Análisis de las técnicas inmunohistoquímicas.....	88
2.4.5 rt-qPCR.....	89
2.4.6 Modelo animal knockdown.....	92
3. Grupos experimentales.....	94
3.1 GAL(1-15) en un modelo de autoadministración de alcohol.....	97
3.2 GAL(1-15) en combinación con el antidepresivo escitalopram (ESC) en la comorbilidad alcoholismo y depresión.....	109
4. Análisis estadístico	118

RESULTADOS

1. GAL(1-15) en un modelo de autoadministración	
de alcohol	122
1.1 Papel de GAL(1-15) en el consumo y búsqueda de alcohol	122
1.1.1 Curva dosis-respuesta de GAL(1-15).....	122
1.1.2 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de genes en el sistema mesolímbico.....	124
1.1.1.1 GAL(1-15) en la expresión de ARNm de C-Fos en ATV, NAc y CPF.....	124
1.1.2.2 GAL(1-15) en la expresión de ARNm de los receptores de dopamina D1, D2, D3, D5, DAT, Vmat2, el receptor 5-HT1A y los receptores GALR1 y GALR2 en ATV, NAc y CPF.....	127
1.1.3 Comparación del efecto de Galanina (GAL) y GAL(1-15).....	130
1.1.4 Papel de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto producido por GAL(1-15).....	132
1.1.4.1 Antagonista del receptor GALR2, M871.....	132
1.1.4.2 Generación de animales knockdown para el estudio de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto inducido por GAL(1-15).....	135
1.2 Modulación de GAL(1-15) sobre el grado de motivación por el alcohol: Ratio Progresivo	139
1.3 Efecto de GAL(1-15) en recaída alcohólica por contexto	142
1.4 Efecto de GAL(1-15) por la vía de administración intranasal	147
1.5 GAL(1-15) en la cepa Marchigian Sardinian (msP): un modelo animal con alta preferencia por el alcohol	149
2. GAL(1-15) en combinación con el antidepresivo escitalopram (ESC) en la comorbilidad alcoholismo y depresión	152
2.1 Efecto de GAL(1-15) y ESC en la Prueba de Preferencia de Sacarosa (SPT).....	153
2.1.1 Curva dosis-respuesta de ESC en el SPT.....	153
2.1.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en el SPT.....	155
2.2 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.....	158

2.2.1	Curva dosis-respuesta de ESC en autoadministración de sacarina.	158
2.2.2	Combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.....	160
2.3	Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.....	164
2.3.1	GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.....	164
2.3.2	GAL(1-15) y ESC en pruebas de desesperanza: Test de Natación Forzada (FST) y Test de Suspensión de la Cola (TST).....	167
2.3.3	GAL(1-15) y ESC en pruebas de ansiedad: Test del Campo Abierto (OFT) y Test del laberinto Elevado en Cruz (EPM).....	170
2.3.4	GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en los núcleos implicados en alcoholismo y depresión.	172
2.3.5	GAL(1-15) y ESC en la expresión de pCREB en el núcleo accumbens (NAc).....	177

DISCUSIÓN

1.	GAL(1-15) en un modelo de autoadministración de alcohol.....	181
2.	GAL(1-15) en combinación con el antidepresivo escitalopram (ESC) en la comorbilidad alcoholismo y depresión.....	207

CONCLUSIONES

THESIS SUMMARY

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO: Publicaciones

Introducción



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. El trastorno por uso de alcohol (TUA).

1.1 Epidemiología y criterios diagnósticos.

El consumo de bebidas alcohólicas es una costumbre muy arraigada en nuestra sociedad desde hace siglos, siendo una de las prácticas más comunes a la vez que perjudiciales en la población. Los datos acerca del consumo de alcohol se ven reflejados a nivel mundial donde alrededor de 2.3 billones de personas son bebedores de alcohol habituales con una media de consumo de 32.8 gramos de alcohol puro al día mientras que 76.3 millones son diagnosticadas con trastorno por uso de alcohol (TUA). Entre las bebidas más consumidas en la población mundial se encuentran las bebidas destiladas como son el whisky, el ron o el vodka (44.8%), seguida de la cerveza (34.4%) y en último lugar el vino (11.7%) (WHO, 2018). Los países de Europa, según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), presentan los niveles más altos de consumo de alcohol (figura 1), donde más del 50% de la población realiza esta práctica por encontrarla divertida y por la sensación que les produce. Si ponemos el foco en España, el último informe del Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, muestra que en 2020 un 5.2% de la población entre 15 a 64 años mostró un consumo de alcohol de riesgo, incrementándose a un 6.9% si el último año estaba precedido por el consumo de bebidas alcohólicas (OEDA, 2021). En nuestro país, el alcohol es la droga más consumida, especialmente entre los jóvenes, registrándose en 2018 un aumento de la práctica del *binge drinking* o consumo por atracón, con una mayor prevalencia en chicas que en chicos (OEDA, 2021). Los patrones de consumo de alcohol también son alarmantes en esta población ya que la Encuesta sobre Alcohol y Drogas EDADES 2019/2020 reflejó que el 63% había consumido alcohol durante el último mes mientras que un 8.8% indicó un consumo diario de éste (EDADES, 2022).

Por otro lado, la pandemia por coronavirus de 2019 (COVID-19) a nivel global indujo en la población un aumento de los casos de ansiedad, depresión y estrés que afectaron a los patrones de consumo de alcohol derivando en un aumento en su uso (Clay and Parker, 2020; Charles et al; 2021; Kilian et al., 2022; Faris et al., 2023).

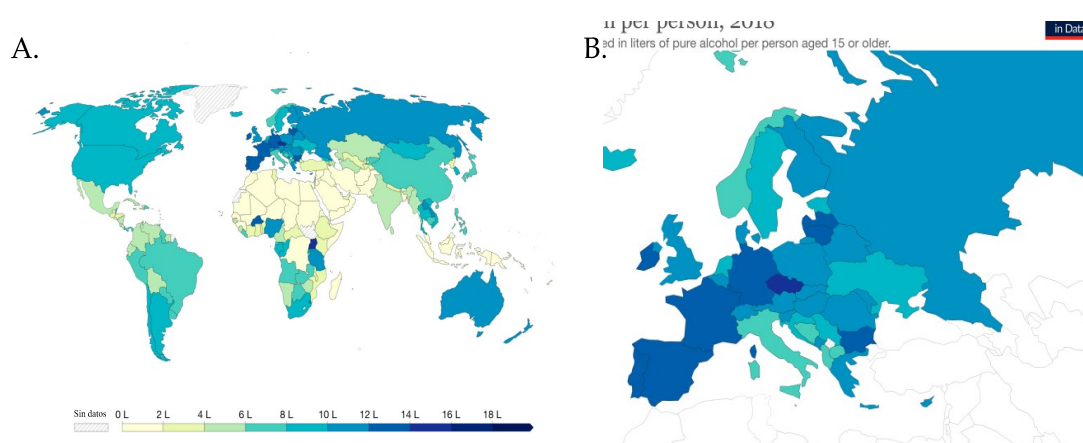


Figura 1. Datos del consumo de alcohol en 2016. La imagen de la izquierda (A) representa los litros de alcohol per cápita consumidos en el mundo y la imagen de la derecha representa los litros de alcohol per cápita consumidos en Europa (B). World Health Organization (World Bank).

Las consecuencias derivadas del consumo de alcohol se manifiestan principalmente en la salud en un aumento del riesgo del desarrollo de enfermedades hepáticas, cardiovasculares o determinados tipos de cáncer, así como enfermedades transmisibles o problemas de salud mental como ansiedad o depresión (OEDA, 2021).

El abuso del alcohol supone además una disminución de la percepción de riesgo, lo que deriva en accidentes de tráfico o el fomento de la agresión y el aumento de las tasas de violencia (WHO, 2018; OEDA, 2021). Es importante nombrar el impacto socio-económico que supone el abuso del alcohol en la sociedad además de estar acompañado por otros trastornos psiquiátricos concurrentes como son el consumo de otras drogas de abuso, trastornos bipolares o problemas somáticos y psicosociales entre otros que han inducido al desarrollo de nuevas políticas con el objetivo de la búsqueda de un tratamiento eficaz para este problema social (Kranzler and Soyka, 2018). Este uso nocivo del alcohol se ve reflejado en la mortalidad, donde un 5.9% del total de las muertes en todo el mundo son atribuibles al alcohol, con un porcentaje mayor en hombres (7.6%) que en mujeres (4%) y siendo mayor en países de bajos y medios ingresos (WHO, 2018; Mekonen et al., 2021; Kranzler and Soyka, 2018; Spitta et al., 2023).

A lo largo de la historia el concepto del trastorno por uso de alcohol ha ido variando en su definición. En 1960, Keller definió el alcoholismo como una enfermedad crónica que se manifiesta por el hábito de beber repetidamente, perjudicando la salud y el funcionamiento social y económico mientras que, para Jellinek, el problema con el alcohol se debe al uso de bebidas alcohólicas que causan un daño al individuo, a la sociedad o a ambos. La OMS define al alcohólico como aquel bebedor excesivo cuya dependencia al alcohol ha alcanzado un grado tal que presentan notables trastornos mentales o interferencias con su salud mental o física, con sus relaciones interpersonales y su funcionamiento social económico, o bien tiene signos claros de la tendencia a orientarse hacia tales síntomas. Es por esto, entonces, que tales personas requieren tratamiento (Belloch, Sandín, and Ramos, 1995).

Los criterios diagnósticos para definir al trastorno por uso de alcohol se han descrito en el Manual diagnóstico y estadístico (DSM) de los trastornos mentales en sus diferentes ediciones. El DSM en su 5ª edición define al trastorno por uso de alcohol como “un patrón problemático de consumo de alcohol que conduce a un deterioro o malestar clínicamente significativo, con un mínimo de dos criterios manifestados, que ocurre en un período de 12 meses”, integrando por primera vez los conceptos de abuso y dependencia, lo que permite un diagnóstico más claro del trastorno (APA, 2014; Kranzler et al., 2020). Además, en esta 5ª edición se incluye el criterio de ansia por consumir o *craving*, área que no estaba presente en las anteriores ediciones (Iwanicka and Olajossy, 2015).

DSM-IV		DSM-5	
Uno más síntomas: abuso	1. Problemas laborales, escolares o en el hogar 2. Consumo en situaciones peligrosas 3. Problemas legales repetidos 4. Consumo a pesar de problemas interpersonales	1. El alcohol se consume a menudo en cantidades mayores o durante un periodo más largo de lo previsto 2. Deseo persistente o esfuerzo intructuoso de control 3. Mucho tiempo dedicado a obtención/consumo/recuperación 4. Ansia o urgencia por consumir (<i>craving</i>) 5. Problemas laborales, escolares o en el hogar 6. Consumo a pesar de los problemas interpersonales 7. Reducción o abandono de otras actividades 8. Consumo en situaciones peligrosas 9. Consumo a pesar de problemas físicos 10. Tolerancia (necesidad de más sustancia o efecto disminuido) 11. Abstinencia (síntomas de abstinencia o consumo de la sustancia para evitarlos)	Gravedad: Leve: 2-3 síntomas Moderada: 4-5 Grave: 6 o más
Tres síntomas o más: dependencia	1. Tolerancia (necesidad de más sustancia o efecto disminuido) 2. Abstinencia (síntomas de abstinencia o consumo de la sustancia para evitarlos) 3. Más consumo del pretendido 4. Deseo persistente o esfuerzo intructuoso de control 5. Mucho tiempo dedicado a obtención/consumo/recuperación 6. Reducción o abandono de otras actividades 7. Consumo a pesar de problemas físicos o psicológicos		

Tabla 1. Diferencias entre los criterios diagnósticos para el trastorno por uso de alcohol entre el DSM-IV y el DSM 5 (APA, 2014).

En la evaluación del alcoholismo se utilizan varios instrumentos como cuestionarios (AUDIT, CAGE, MAST) o pruebas que indican el nivel de alcohol en sangre como la Gama GT (GGT), el Volumen Corpuscular Medio (VCM) o la Transferrina Deficiente en Carbohidratos (CDT) (Kranzler and Soyka, 2018).

1.1.1 Etapas en la adquisición del consumo de alcohol.

No todas las personas sufren las consecuencias negativas del alcohol, ni pasan por todas las fases de adquisición del consumo ya que hay individuos que hacen un uso responsable y carecen de problemas de índole mayor. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, un gran número de personas abusan del alcohol, fomentando la dependencia hacia éste y derivando finalmente en un TUA.

El inicio del consumo como algo nuevo o simple curiosidad en un contexto social determinado puede llevar a un **abuso** de alcohol caracterizado por un patrón de consumo inadecuado y continuado de la sustancia, que se traduce en consecuencias dañinas para el individuo como problemas sociales e interpersonales. El abuso puede llevar a la **dependencia** o adicción al alcohol, proceso que está mediado por factores biológicos, sociales y psicológicos, donde resulta difícil controlar el consumo, dando como resultado la aparición de una serie de síntomas conductuales y fisiológicos junto al deseo o ansia de consumir la sustancia (*craving*) a pesar de sus consecuencias adversas. El *craving* es un aspecto clave en las adicciones que afecta a la esfera motivacional (deseo de consumir), cognitiva-conductual (intención de consumir, compulsividad) y psicofisiológica (respuesta galvánica de la piel) (Iwanicka and Olajossy, 2015)

Para que se produzca dependencia a una sustancia es necesario que la conducta de consumir se refuerce (refuerzo positivo) de manera que consumir alcohol tenga consecuencias apetitivas que favorezcan que dicha conducta se repita en un futuro (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

Durante el período de consumo de una droga pueden suceder dos procesos: uno es la **sensibilización**, es decir, en cada exposición a la droga, crece la respuesta hacia ella y otro es la **tolerancia** que se produce cuando aparece una disminución a la sensibilidad de la droga a causa de su consumo continuado, por lo que el individuo necesita aumentar la cantidad de sustancia para notar el efecto placentero que le generaba al inicio del consumo (Kramer et al., 2020). Con la interrupción brusca de la sustancia aparece la **abstinencia** caracterizada por la presencia de síntomas adversos negativos tales como ansiedad, nerviosismo o taquicardia que desaparecen al volver a consumir la droga, por lo que, el consumo de la sustancia está impulsado por el refuerzo negativo, consumiendo alcohol para evitar la aparición de síntomas negativos, contribuyendo así al **mantenimiento de la adicción** (Koob, 2013).

Muchas personas con trastorno por uso de alcohol experimentan un curso crónico de **recaídas** y remisiones a lo largo de su vida, siendo los seis primeros meses tras el tratamiento el período con más riesgo de sufrir una recaída alcohólica, de hecho estudios recientes indican que el 50 % de las personas que sufren TUA recaen en los primeros tres meses siendo esta fase acompañada de alteraciones en el funcionamiento psicosocial como absentismo laboral o problemas en la relación de pareja (Hunt et al., 1971; Domi et al., 2021). Por otra parte, la recuperación neurobiológica y neurocognitiva del trastorno se ha relacionado con una abstinencia de alcohol durante 6-12 meses (Witkiewitz et al., 2007; Durazzo et al., 2018). Debido a su relevancia, la recaída alcohólica será objetivo de estudio en el presente trabajo.

Recaída alcohólica.

La recaída alcohólica puede desencadenarse por varios factores, como la reexposición a la droga, la reexposición a señales y contextos asociados previamente con el consumo de drogas o por la exposición a factores estresantes (O'Brien et al., 1992; Sinha, 2011; Fredriksson et al., 2021; Tavares et al., 2023).

La reexposición a los contextos ambientales emparejados con la sustancia de consumo es un potente desencadenante de recaídas (Bouton, 2002; Crombag et al., 2008; Janak and Chaudhri, 2010; Valyear et al., 2017; Tavares et al., 2023) provocando la reanudación de una respuesta. Tanto el contexto como las señales contextuales tienen valor de incentivo ya que predicen la disponibilidad de la droga y presentan un factor motivacional recordando el efecto gratificante de la sustancia al establecer una asociación contexto-droga, por lo que el contexto y las señales asociadas a él son un potente desencadenante de la búsqueda y recaída alcohólica (Martin-Fardon and Weiss, 2013; Tavares et al., 2023).

Un mecanismo psicológico que podría explicar la recaída por contexto es el sugerido en la teoría de Pavlov. Esta teoría sugiere que el contexto actúa como un estímulo condicionado excitatorio, ya que se asocia con la disponibilidad de la droga y, por tanto, fomentará la búsqueda y motivación por la sustancia, mejorando la respuesta operante para conseguirla, lo que se conoce como transferencia pavloviana a instrumental (PIT). Sin embargo, debido a que la extinción ocurre en un contexto diferente, no se asocia con la disponibilidad de droga (Crombag et al., 2008). De esta forma, el contexto influye en el comportamiento de los individuos, facilitando la conducta de beber y el ansia por la droga en aquellos entornos que se encuentran asociados con el consumo de alcohol, por ejemplo, asistir a una fiesta o permanecer en un bar (Janak and Chaudhri, 2010).

Acontecimientos vitales de estrés puntuales o crónicos en ciertos momentos de la vida tienen como resultado un aumento de síntomas como son ansiedad, irritabilidad e incertidumbre que precipitan el consumo y el ansia por consumir alcohol, utilizado como una estrategia de afrontamiento, que finalmente puede desencadenar en una recaída alcohólica en función de la vulnerabilidad individual al estrés (Brady and Sonne, 1999).

Por otro lado, puede ocurrir que tras un periodo de abstinencia alcohólica prolongado se consuman pequeñas dosis de la sustancia de abuso, aumentando el deseo por consumir, lo que conlleva una pérdida de control que precipita una recaída en el consumo de alcohol. Esto se conoce como recaída por priming (Martin-Fardon and Weiss, 2013).

1.2 Neurobiología del TUA.

1.2.1 Circuito de recompensa.

En 1954, los experimentos de Olds y Milner demostraron que el sistema mesolímbico y las neuronas dopaminérgicas juegan un papel importante en el refuerzo y la adicción, así, profesor y estudiante observaron de forma fortuita que al colocar un electrodo en la formación reticular del cerebro de rata, la estimulación provocaba que los animales pasaran la mayor parte del tiempo en el lugar donde se había producido esta y, posteriormente, observaron que los animales realizaban esfuerzos conductuales para recibir dicha estimulación cerebral (Gardner, 2011; Carlson and Birkett., 2013).

Gracias a esta investigación hoy en día se conoce que la estimulación de ciertas regiones cerebrales como, el haz prosencefálico medial y el área tegmental ventral y, en menor medida, la corteza prefrontal y el núcleo accumbens, están relacionadas con la obtención de recompensas y forman parte del sistema de recompensa cerebral.

El circuito de recompensa también conocido como **sistema mesolímbico dopaminérgico** es una red neuronal compuesta por diferentes regiones cerebrales, entre las que se encuentran el área tegmental ventral (ATV), el núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF) (figura 2), entre otras, así como por los sistemas de neurotransmisores dopaminérgico, serotoninérgico, gabaérgico y glutamatérgico relacionados con la recompensa, aversión, memoria y control ejecutivo (Eşel and Dinç, 2017).

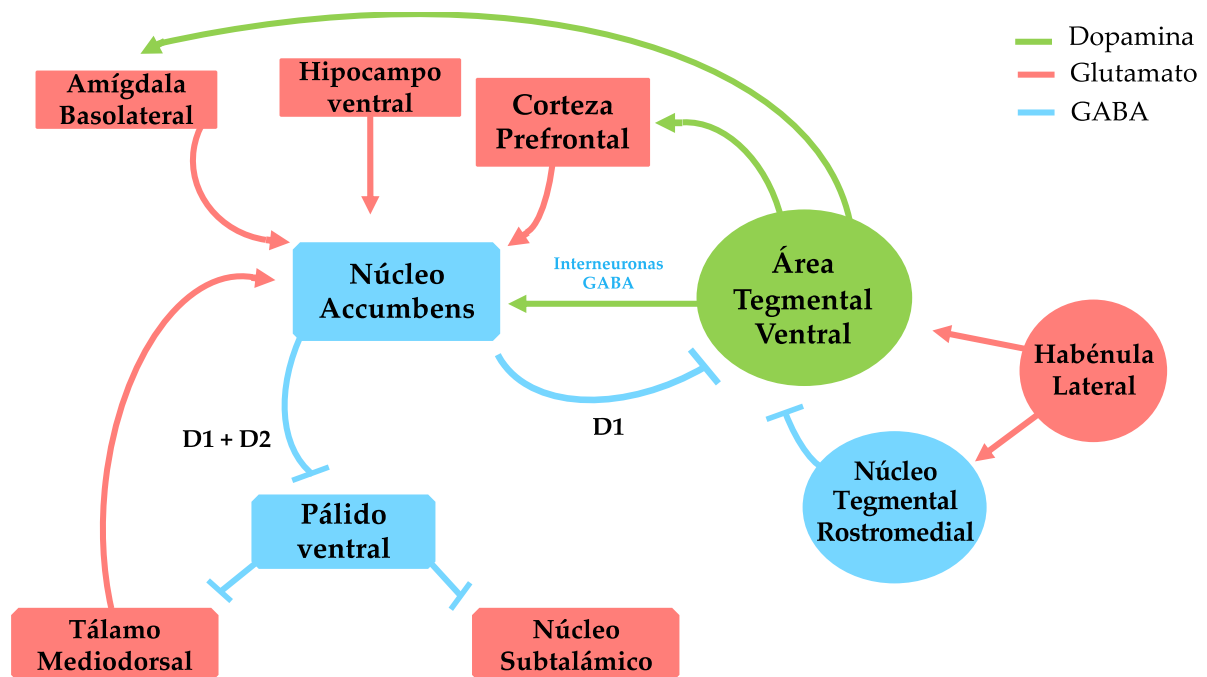


Figura 2. Esquema resumido del circuito de recompensa cerebral implicado en la adicción. Modificado de Cooper et al., 2017

La dopamina (DA) es fundamental en el refuerzo de las diferentes sustancias de abuso y en concreto en los efectos gratificantes del consumo y dependencia de alcohol siendo el neurotransmisor más importante del circuito de recompensa (Carlson and Birkett, 2013; Eşel and Dinç, 2017). El sistema dopaminérgico consta de tres vías fundamentales: la vía nigroestriatal relacionada con el control motor, la vía mesocortical, implicada en el aprendizaje y memoria y la vía mesolímbica, responsable del comportamiento motivacional (Dahlström and Fuxe, 1966).

Área tegmental ventral

El área tegmental ventral (ATV) es una región que se encuentra ubicada en el tronco cerebral, concretamente en el mesencéfalo, y presenta un papel clave en la recompensa y la motivación (Bariselli et al., 2016). El ATV contiene en mayor proporción neuronas dopaminérgicas (60-65%) que se proyectan principalmente al NAc (mesolímbica) y a la CPF (mesocortical), aunque también son proyectadas a la amígdala, hipocampo y otras regiones cerebrales. A su vez, las neuronas dopaminérgicas del ATV se encuentran reguladas de forma inhibitoria por neuronas gabaérgicas (30-35%), por lo que la activación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el ATV va a producir aversión mientras que su inhibición producirá preferencia por la recompensa, y de forma excitatoria por neuronas glutamatérgicas (2-3%) (Cooper et al., 2017).

Cuando se consumen drogas o se emiten conductas que son reforzadas naturalmente, como comer, o incluso con la aparición de señales que predicen su suceso, se activa el sistema mesolímbico dopaminérgico, lo que produce un aumento en la liberación de DA en el ATV hacia el NAc, siendo la activación de DA en el ATV suficiente para producir el efecto gratificante de las sustancias de abuso (Cooper et al., 2017; Lewis et al., 2021).

Las neuronas dopaminérgicas del ATV y la sustancia negra son inhibidas indirectamente por la habénula lateral (HbL), provocando aversión, a través de sus entradas a las neuronas gabaérgicas en el núcleo tegmental rostromedial mesopontino (RMTg), una estructura cerebral principalmente gabaérgica localizada en la parte caudal del ATV que actúa como modulador de la recompensa y la excitación. Por tanto, la activación de la vía HbL - ATV por ejemplo con la exposición a expectativas no correspondidas y estímulos aversivos, reduce la motivación por la recompensa (Lavezzi and Zahm, 2011; Volkow and Morales, 2015)

Núcleo accumbens

Este núcleo subcortical se encuentra ubicado en el estriado ventral y se encuentra implicado en el procesamiento y evaluación de las recompensas, así como en el aprendizaje asociativo (Lewis et al., 2021). Una vez la DA es liberada en el NAc, se activan los receptores de dopamina que se encuentran ubicados en las neuronas predominantes del NAc, las neuronas espinosas medianas (MSN) que son neuronas de proyección principalmente gabaérgicas que generan dos vías: Las MSN D1 o de vía directa, asociadas con la recompensa y las MSN D2 o vía indirecta, asociadas con el castigo. La coordinación de dopamina entre las MSN 1 y las MSN 2 es fundamental para la respuesta a los estímulos gratificantes (Lewis et al., 2021).

Las neuronas MSN del NAc, aparte de DA, también reciben proyecciones glutamatérgicas de regiones límbicas y corticales como la CPF, relacionada con el control ejecutivo, así como con la búsqueda de drogas (Volkow and Morales, 2015).

Se ha demostrado que, en personas adictas a sustancias, en el cuerpo estriado ventral y dorsal, se produce la reducción en la señalización de los receptores D2 de dopamina lo que provoca una menor inhibición de la vía indirecta de la dopamina y como consecuencia la actividad en la CPF se reduce, lo que facilita la aparición de la impulsividad y la compulsividad (Volkow and Morales, 2015)

La conexión del hipocampo con el NAc modula las respuestas de búsqueda de droga inducida por señales, además, la conexión amígdala basolateral-NAc mediante las proyecciones de GLU, fomenta la recompensa y el refuerzo, así como el aprendizaje emocional. En contraste, las proyecciones de GLU procedentes del tálamo al NAc están relacionadas con la aversión a la recompensa (Cooper et al., 2017).

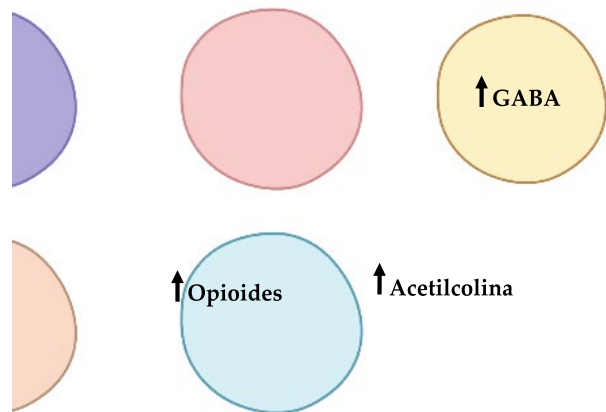
Corteza prefrontal

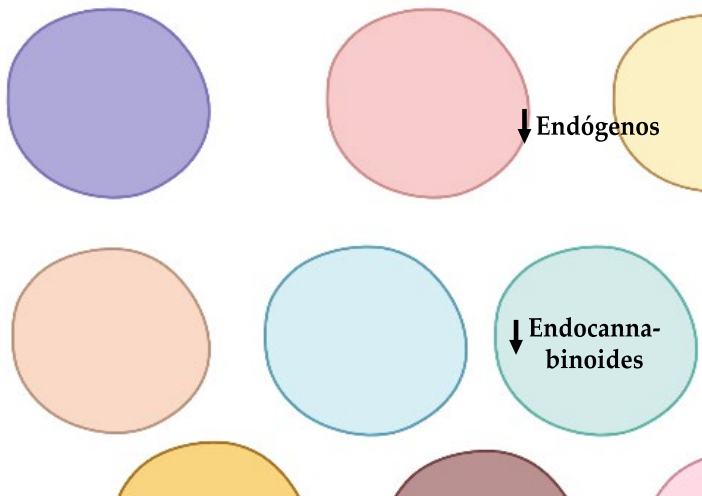
Se trata de una estructura cerebral implicada en aquellos procesos relacionados con la toma de decisiones basada en la recompensa, y está compuesta por distintas regiones entre las que se encuentran la corteza cingulada anterior, la corteza orbitofrontal y la corteza prefrontal ventromedial. La CPF recibe proyecciones de DA desde el ATV y, a su vez, la CPF envía salidas eferentes de GLU al estriado ventral, donde se encuentra el NAc, por lo que esta transmisión estaría asociada con la búsqueda y planificación de acciones conductuales para conseguir la recompensa deseada (Cooper et al., 2017; Chau et al., 2018). Las proyecciones de la CPF al NAc constituyen el centro de integración del hipocampo dorsal (información espacial/contextual) y de la amígdala (información emocional).

1.2.2 Cambios neurobiológicos en el TUA.

El consumo de alcohol producido tanto de forma aguda como crónica provoca cambios neurobiológicos y neuroquímicos en el cerebro, acompañados de alteraciones en la función de neurotransmisores y neuropéptidos, entre los que se encuentran el ácido gamma-aminobutírico, el glutamato (GLU), la dopamina, la noradrenalina, la serotonina y varios neuropéptidos endógenos (Schneider et al., 2007; Marcinkiewicz et al., 2016) lo que provoca modificaciones en los sistemas cognitivo, motivacional y conductual, que disminuyen el umbral para la recaída alcohólica. Los cambios neurobiológicos que se producen en cada una de las fases de la adicción a sustancias son los siguientes (Koob et al., 2016):

1. Atracón/intoxicación. Se caracteriza por el abuso y posterior dependencia de la sustancia de consumo, donde la droga adquiere un valor reforzante que suele presentarse acompañado de señales y contexto concreto, lo que fortalece la asociación señal-droga provocando una fuerte motivación para buscar la recompensa, así como para el mantenimiento de la adicción y del desarrollo de comportamientos compulsivos por consumir la droga. En esta fase aumenta la liberación de DA, 5-HT, GABA, opioides y acetilcolina, fundamentalmente en el **NAc**, activando el sistema de recompensa (Koob et al., 2016).





2. Abstinencia/afecto negativo. En esta fase predomina la presencia de síntomas motivacionales negativos como irritabilidad, ansiedad o dolor emocional como consecuencia de un período sin consumo de la sustancia (abstinencia). La exposición crónica a drogas conlleva una serie de neuroadaptaciones, como la desregulación del sistema hipotálamo-pituitario-suprarrenal, el anti-reward (habénula lateral) y/o el sistema de estrés (**amígdala**) así como las alteraciones en el factor liberador de corticotropina (CRF) o el neuropéptido Y (NPY) (Koob et al., 2016).

3. Preocupación/anticipación/recaída.

Esta fase se caracteriza por el deseo del individuo por la búsqueda de la sustancia (*craving*), lo que lleva a la recaída como consecuencia de alteraciones en el control ejecutivo de la CPF, interfiriendo en la toma de decisiones, la autoregulación o el control inhibitorio. El **hipocampo**, clave en la recaída, aumenta la liberación de GLU en el estriado dorsal, ante las señales contextuales vinculadas al consumo de la sustancia (Koob et al., 2016).



Como se puede observar en la figura 3, estas tres fases comprenden un proceso cíclico, de forma que se produce el proceso de alostasis, es decir, los mecanismos de adaptación del sistema fisiológico se modulan en búsqueda de un equilibrio, así, a medida que se producen episodios de abstinencia y recaída, el efecto gratificante por consumir va perdiendo fuerza mientras que el afecto negativo es el que predomina, aumentando el valor del incentivo que fomenta la búsqueda de drogas, como una forma de evitar los síntomas negativos asociados al consumo, aumentando la vulnerabilidad a la recaída y al inicio de un nuevo ciclo que contribuye a la consolidación de la adicción (Koob et al., 2013, 2016).

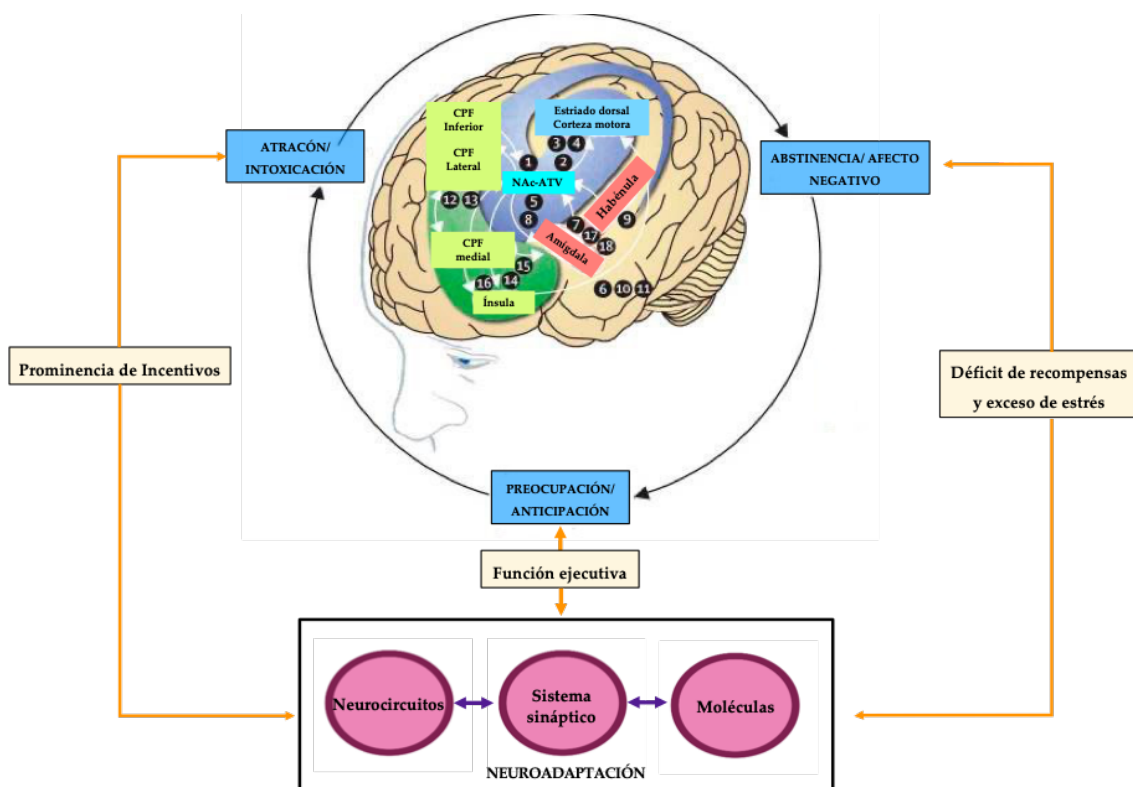


Figura 3. Modelo de circuito cerebral implicado en las fases de la adicción a las drogas. Modificado de Koob et al., 2016. Fase atracón/intoxicación: circuito 1-2 [Área tegmental ventral (ATV)], 3 (cuerpo estriado dorsal), 4 (estriado dorsal). Fase de abstinencia/afecto negativo: circuito 5 (ATV), 6 (núcleo central de la amígdala), 7 (núcleo del lecho de la estría terminal), 8 (Núcleo Accumbens (NAc), 9 (habénula), 10-11 (núcleo central de la amígdala). Preocupación/anticipación/recaída: circuito 12-13 [Corteza prefrontal (CPF)], 14 (hipocampo), 15 (amígdala basolateral), 16-17 (núcleo del lecho de la estría terminal) y 18 (ínsula).

El consumo de alcohol agudo activa el sistema de recompensa produciendo la liberación de dopamina desde el ATV hacia el NAc, lo que produce un refuerzo positivo inmediato y que incita a continuar con el consumo (Gilpin et al., 2008; Spitta et al., 2023; Lauretani et al., 2024). El sistema serotoninérgico está implicado en los efectos reforzadores del alcohol, por lo que tras una única toma de alcohol se observa un aumento en los niveles de serotonina en distintas zonas del cerebro entre las que se encuentran el NAc, ATV, CPF e hipocampo (Lovinger et al., 1997; Belmer et al., 2016). La actividad de GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro se ve afectada, incrementándose tras la exposición aguda de alcohol, lo que conduce a una mayor inhibición neuronal, favoreciendo la disminución de atención, memoria y somnolencia mientras que se produce una disminución en la neurotransmisión de GLU en el cerebro (Gilpin et al., 2008).

Consumo de alcohol crónico.

Los experimentos realizados en esta tesis doctoral se fundamentaron en un modelo de consumo de alcohol crónico dada su relevancia clínica. La administración crónica de esta sustancia produce cambios neuronales en el sistema de recompensa y desencadena una serie de adaptaciones biológicas para conseguir la homeostasis. Durante el consumo de alcohol diario los efectos placenteros de la sustancia al consumirla van disminuyendo mientras que aumentan los efectos adversos dando como resultado los procesos de dependencia, abstinencia y recaída mencionados anteriormente (Gilpin and Koob, 2008).

Como consecuencia de la neuroadaptación cerebral causada por el consumo de alcohol crónico, se produce una reducción de los receptores de dopamina D1 y D2 (Lauretani et al., 2024) lo que conduce a una **hiperactivación de la neurotransmisión excitatoria glutamatérgica**, mediado por los receptores NMDA aspecto clave en el *craving* y en la pérdida de inhibición en la búsqueda de alcohol (Kalivas and Volkow, 2005; Siciliano et al., 2016). Además, se produce una hiperactividad en la amígdala que favorece la aparición de los síntomas negativos asociados con el consumo de alcohol (Eşel and Dinç, 2017).

En cuanto a la actividad serotoninérgica, se produce una reducción de los niveles generales de **serotonina** (5-HT), así como del número de transportadores de 5-HT en varias estructuras cerebrales, relacionado con la conducta impulsiva y agresiva característica de las personas adictas al alcohol (Storvik et al., 2006; Koob et al., 2013). La exposición crónica al alcohol modifica la modulación serotoninérgica provocando neuroadaptaciones en el sistema receptor que propician el desarrollo de la tolerancia y la adicción. Así, por ejemplo, se ha observado un aumento de la expresión y función del autoreceptor 5-HT_{1A}, receptor de serotonina más estudiado por su implicación tanto en la regulación del estado de ánimo como en el consumo de alcohol (Belmer et al., 2016).

El consumo de alcohol altera la síntesis, liberación y transmisión de **GABA** a través de neuronas presinápticas o postsinápticas de algunas regiones cerebrales y las vías de recompensa, así se produce una reducción en la liberación de GABA por muerte neuronal en el giro dentado del hipocampo y disminuye la expresión del receptor GABA-A en hipocampo y en el ATV (Pérez-Rial et al., 2003; Eşel and Dinç, 2017).

En las etapas avanzadas de la adicción, coincidiendo con la fase de preocupación/anticipación/recaída que se comentó anteriormente, se produce un aumento de la neurotransmisión de **GLU** en la corteza prefrontal y orbitofrontal, que afectaría a la capacidad motivacional dirigida al consumo como la inhibición del comportamiento impulsivo, la toma de decisiones, el autocontrol sobre el consumo lo que favorece el ansia (*craving*) en la búsqueda de alcohol y el aumento de la vulnerabilidad a sufrir recaídas y por tanto a mantener la adicción (Gilpin et al., 2008).

La exposición crónica al alcohol también afecta a otros sistemas como el sistema cannabinoide endógeno (Pérez-Rial et al., 2003; Lauretani et al., 2024) donde se ha observado una reducción en la densidad y función del receptor cannabinoide CB1 en ratones expuestos crónicamente a alcohol. Además, afecta a los sistemas de estrés cerebrales, como el CRF y el NPY, generando desadaptaciones que contribuyen al estado emocional negativo característico del período de abstinencia (Gilpin et al., 2008).

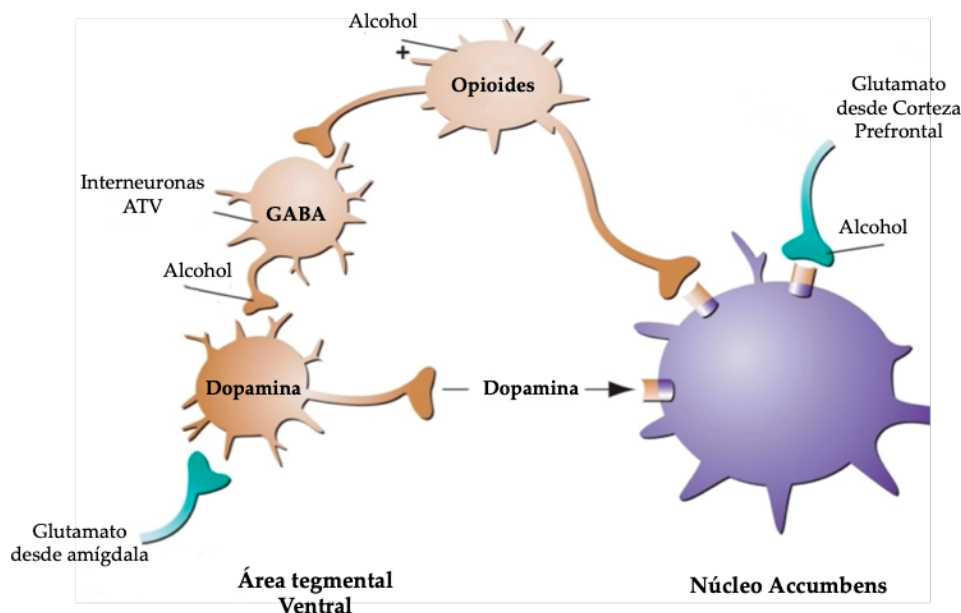


Figura 4. Ilustración sobre los efectos del alcohol en los sistemas de neurotransmisores cerebrales. Modificado de Gilpin et al., 2008.

1.3 Tratamiento farmacológico del TUA.

A pesar de que el trastorno por uso de alcohol representa un importante problema de salud pública, menos del 10 % de los adultos con TUA en Europa se benefician de tratamiento farmacológico y/o psicoterapéutico, lo que provoca una gran brecha de tratamiento entre la prevalencia del trastorno y la proporción de personas que reciben el tratamiento (Tesfa et al., 2021; Burnette et al., 2022). Factores como el desconocimiento acerca de la oferta y seguridad de los medicamentos, la baja eficacia de los fármacos y el estigma social, que impide que las personas con este problema busquen ayuda, favorecen las limitaciones de los tratamientos existentes (Burnette et al., 2022).

Actualmente existen tres medicamentos que cuentan con la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA) como tratamiento para el TUA: disulfiram (Antabuse), acamprosato y naltrexona. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) añade a estos tres medicamentos el nalmeveno (Burnette et al., 2022).

El fármaco disulfiram fue el primer medicamento aprobado para el tratamiento del TUA por la FDA en 1951 (Witkiewitz et al., 2019). Disulfiram es el fármaco más prescrito para tratar específicamente la abstinencia, actúa como un inhibidor de aldehído deshidrogenasa que bloquea el metabolismo del alcohol y aumenta la concentración de acetaldehído, lo que se refleja en una respuesta aversiva inducida por el alcohol, lo que hace que la tasa de adherencia al fármaco sea baja (Burnette et al., 2022).

El acamprosato actúa como coagonista parcial del receptor del ácido N -metil-d-aspartico (NMDA) en el sistema glutamatérgico, reduciendo la hiperexcitabilidad neuronal en la abstinencia alcohólica, por lo que se recomienda para conseguir y mantener la abstinencia completa pero no para la reducción del consumo de alcohol o para prevenir las recaídas alcohólicas (Burnette et al., 2022).

La naltrexona actúa como un antagonista de los receptores opioides (delta, kappa y mu), modulando los efectos gratificantes del alcohol y reduciendo así el *craving* y el consumo de alcohol (Burnette et al., 2022).

Por tanto, aunque existen medicamentos con resultados prometedores para el TUA, no logran ser eficaces para el alcoholismo, ya sea por sus efectos secundarios o porque no abarcan todas las fases de la adicción al alcohol como las recaídas sin mejorar por tanto en su pronóstico (Tesfa et al., 2021; Burnette et al., 2022). Es por ello que sigue siendo una prioridad desarrollar nuevos fármacos para esta adicción que consigan reducir eficazmente el consumo de alcohol y que ayuden también a reducir el riesgo de recaídas, esto supondría una mejora en las tasas de éxito en la recuperación de los pacientes afectados por este trastorno (Tesfa et al., 2021; Burnette et al., 2022).

Recientemente se ha observado que distintos sistemas neurobiológicos, entre ellos, los neuropéptidos como la Galanina, se encuentran implicados en distintos aspectos del abuso de alcohol, lo que los convierte en nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del alcoholismo (Ciccocioppo et al., 2009; Genders et al., 2020; Heilig et al., 2023) y por ello serán objetivo de estudio en la presente tesis doctoral.

1.4 Pruebas conductuales en animales para la evaluación del trastorno por uso de alcohol.

El consumo y la adicción por el alcohol han sido estudiados y evaluados durante mucho tiempo de forma eficiente en modelos animales mediante distintas técnicas y pruebas de comportamiento.

El estudio en animales de experimentación permite obtener y estudiar los parámetros relacionados con el consumo de alcohol como la influencia del estrés y la recompensa, la genética, así como los factores neurobiológicos y neurofisiológicos que están implicados en el trastorno (Nieto et al., 2021). La mayoría de las investigaciones sobre el consumo de drogas en animales se han basado en modelos de aprendizaje operantes y no operantes, aunque existen otro tipo de procedimientos no basados en el aprendizaje que se usan habitualmente para estudiar las enfermedades relativas al consumo de alcohol (figura 5).

En los procedimientos no operantes las variables que se analizan son las relacionadas con la cantidad consumida de la sustancia (medida en mililitros, por ejemplo) mientras que, en los procedimientos operantes, se analizan las variables referentes a la respuesta en sí, como la tasa o la frecuencia de respuestas (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Dentro de los modelos no operantes se encuentra la administración oral utilizada en distintas drogas de abuso, pero con una frecuencia más notable en el consumo de alcohol. Estos procedimientos conocidos como elección de dos biberones o “two bottle choice” consisten en colocar dos biberones, uno de agua y otro de alcohol a diferentes graduaciones, en la jaula de los animales (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

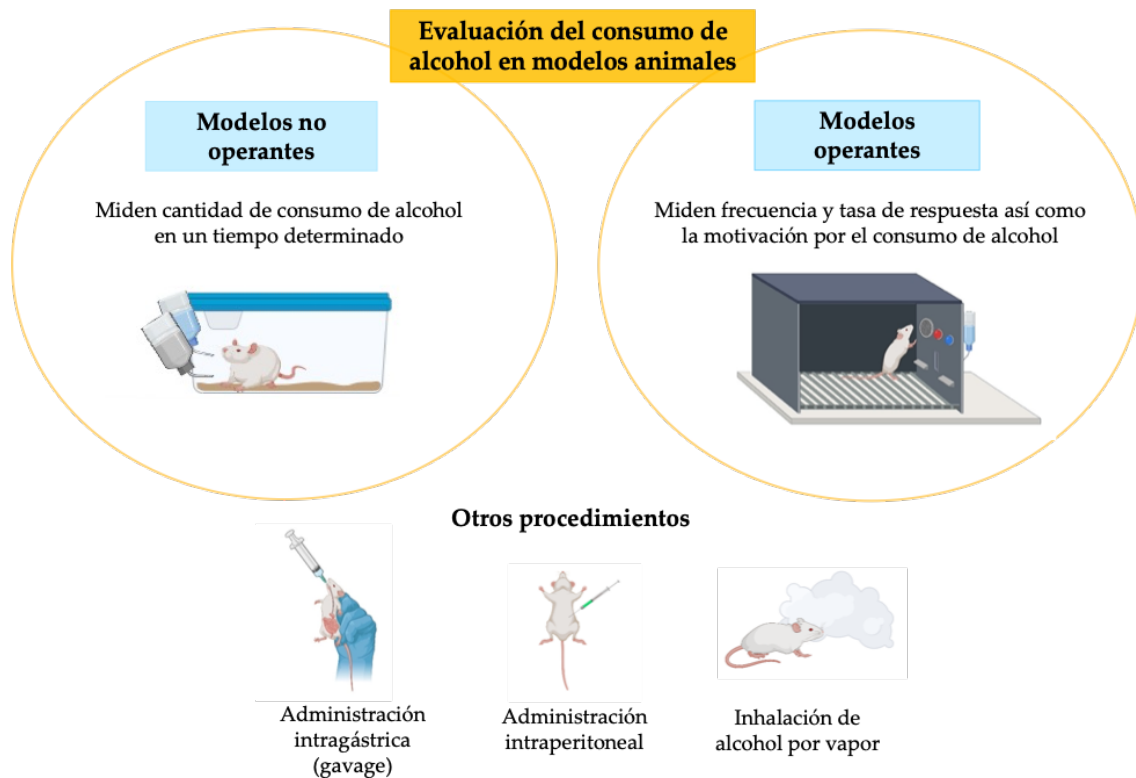


Figura 5. Esquema de los distintos procedimientos usados en la investigación con animales para el estudio del consumo de alcohol. Ilustración creada con el programa Biorender.

El modelo operante o instrumental es un tipo de aprendizaje que tiene como máximos representantes a Thorndike y Skinner, basado en la contingencia de aprendizaje donde la realización de una determinada conducta en una situación concreta da como resultado la entrega de un refuerzo (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006; Panlilio and Goldberg, 2007). Este modelo de aprendizaje operante, donde el refuerzo aumenta la probabilidad de que la conducta se produzca en el futuro mientras que el castigo la disminuye (Carlson and Birkett, 2013) será el estudiado en el presente trabajo.

Por tanto, el refuerzo fortalece la conexión entre los circuitos neuronales implicados en la percepción del estímulo y el movimiento hacia éste (figura 6). El alcohol y otras drogas, se caracterizan por su alto potencial de refuerzo de manera que aumentan la probabilidad de la conducta de búsqueda y consumo de la sustancia al actuar como un refuerzo positivo (aumenta el efecto placentero de la droga) y, posteriormente, por refuerzo negativo, es decir, la respuesta aumenta por la evitación o desaparición de un estímulo aversivo, por ejemplo, los síntomas negativos de la abstinencia (Koob and Le Moal, 2001; Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

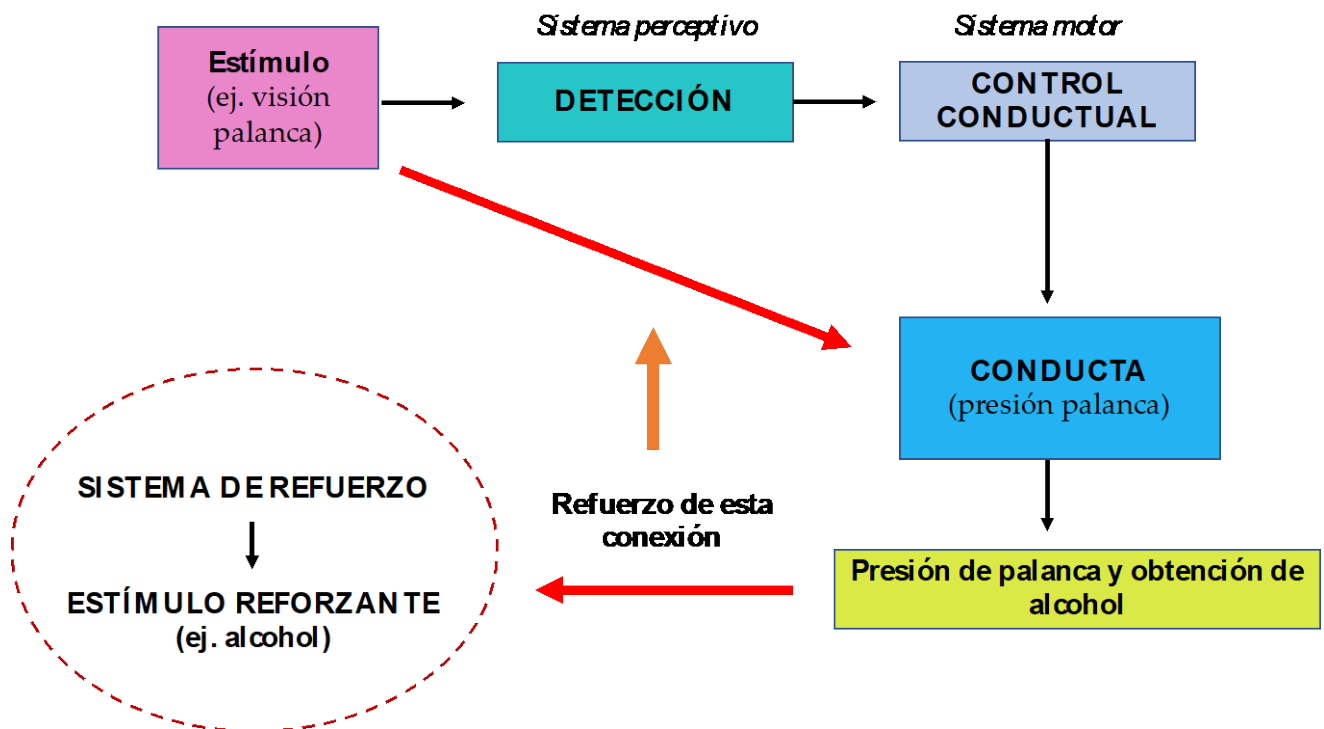


Figura 6. Modelo neural simplificado del aprendizaje instrumental. Modificado de Fisiología de la conducta. Carlson, 2013.

La prueba de conducta más utilizada para la evaluación del aprendizaje operante en animales es la autoadministración o la caja operante, donde los animales son entrenados para conseguir un refuerzo mediante la realización de una conducta/respuesta operante (García Pardo et al., 2017). Las cajas de autoadministración constan de uno o más detectores físicos de la respuesta operante (como una palanca o un disco) y uno o más dispositivos que entregan los reforzadores (sacarina, alcohol, etc). Este procedimiento de autoadministración de sustancias presenta un alto grado de validez aparente ya que es el método que más se asemeja al consumo de alcohol en humanos (Panlilio and Goldberg, 2007).

En las cajas de autoadministración la entrega del refuerzo positivo se establece mediante los programas de reforzamiento de razón o de intervalo. Los programas más utilizados son los de razón fija y los de razón variable. En los **programas de razón fija** el refuerzo se entrega cuando se completa un número determinado de respuestas siendo necesario en algunos casos incorporar un tiempo de espera después de cada refuerzo para evitar sobredosis de la sustancia. Los **programas de razón variable** son aquellos donde el número de respuestas para conseguir un refuerzo es variable (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

Para el evaluar el grado de motivación que presenta un animal por conseguir una sustancia se utiliza el indicador llamado punto de ruptura o *breaking point*, que consiste en la tasa de respuesta más alta que emite un animal para obtener un solo refuerzo, de manera que se evalúa el esfuerzo que es capaz de realizar por consumir la droga (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

Diversos estudios con animales han conseguido modelar de forma adecuada características específicas del comportamiento adictivo, lo que ha permitido el estudio de la búsqueda de drogas y la recaída alcohólica en animales (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). La evaluación de una recaída alcohólica implica establecer una conducta de autoadministración estable de la sustancia seguida de un período de extinción donde no se obtengan las consecuencias programadas a pesar de la realización de la conducta. Esta recaída puede desencadenarse por estrés, por estímulos ambientales (señales o contexto) o por estímulos internos, que si se combinan entre ellos pueden potenciar la búsqueda de drogas (aumentando el número de respuestas operantes) después de la extinción (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

En la recaída alcohólica por estrés se utiliza un estresor fuerte en el animal como descargas eléctricas o privación de alimento que incitan la búsqueda de drogas. En la recaída alcohólica inducida por señales (luz o sonido, por ejemplo) las señales implican una consecuencia contingente de la respuesta operante, actuando como reforzadores condicionados que incitarían la conducta de pulsar la palanca y recibir el refuerzo (Bachteler et al., 2005; Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). El cambio de contexto ambiental donde se desarrolla el entrenamiento de consumo de una droga también se considera una señal de valor informativo de la presencia o no de la droga, modificando la emisión de las respuestas operantes. Los estudios de Bachteler combinaron señales y contexto dando como resultado un aumento de las presiones de palanca para la obtención del refuerzo en comparación con las dos señales por separado (Bachteler et al., 2005).

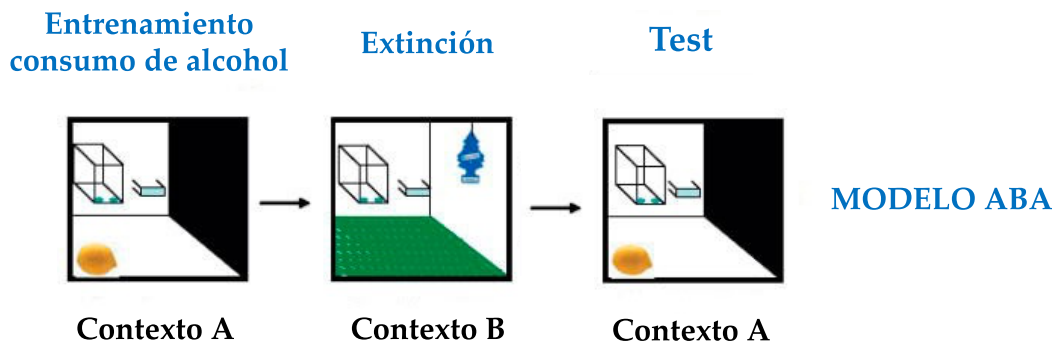


Figura 7. Modelo animal de recaída alcohólica por contexto ABA. Modificado de Janak and Chaudhri, 2010.

Un modelo muy conocido y eficaz de **recaída alcohólica inducida por contexto** es el modelo ABA (Fredriksson et al., 2021; Tavares et al., 2023; Figura 7) donde los animales primero se entrenan en autoadministración en un entorno (contexto A) que está asociado con distintos estímulos discriminativos (ventilador, señales visuales, táctiles, etc.) para realizar una respuesta operante y recibir un refuerzo (droga). Posteriormente, en un entorno diferente (contexto B) con distintos estímulos de fondo, al realizar la respuesta operante (presionar la palanca) no se obtiene la droga como recompensa. En la evaluación de recaída, nuevamente se expone a los animales en el contexto A, que previamente se encontraba emparejado con la droga y así se reestablece la respuesta operante para obtenerla (Fredriksson et al., 2021). Una variante de este modelo es el modelo de recaída ABC, donde la recaída se desarrolla en un nuevo contexto (contexto C) (Janak and Chaudhri, 2010).

La recaída **por priming** es otro tipo de recaída que se produce al tener acceso a pequeñas cantidades de alcohol lo que incita al aumento del consumo de la sustancia tras un período de abstinencia, y, por tanto, a la recaída alcohólica. (Nieto et al., 2021).

Modelos animales con preferencia por el alcohol

Muchos laboratorios han desarrollado cepas de roedores con un alto consumo y preferencia de alcohol, lo cual resulta de gran utilidad a la hora de estudiar la predisposición genética al consumo excesivo de alcohol y sus posibles tratamientos (Spanagel et al., 2017; Nieto et al., 2021).

Un ejemplo de estas cepas es la **cepa Marchigian Sardinian (msP)**, que ha demostrado ser un buen modelo preclínico para el alcoholismo, criadas durante 20 años en la Universidad de Camerino (Italia), a partir de ratas sardas con predisposición a beber alcohol (Ciccocioppo et al., 1998, 2006). La cepa msP se caracteriza por un alto consumo y preferencia por el alcohol desde el primer día, sin mostrar aversión y registrando el mayor consumo de alcohol en la fase de oscuridad, donde se encuentran más activas, llegando a consumir una media diaria de 7-8 g/Kg de alcohol. A nivel molecular, el CRF, una hormona liberada por el hipotálamo, se encuentra más expresado en el ARNm en distintas regiones del cerebro en las ratas msP, además de existir una alta correlación de polimorfismos en la región promotora del gen que codifica CRF, factores genéticos asociados con el alcoholismo y que son compartidos con los humanos (Ciccocioppo et al., 2006).

Por otra parte, la cepa msP presenta un fenotipo ansioso y depresivo que se modula con el consumo de alcohol, de hecho, estudios en pruebas desesperanza han demostrado que el elevado consumo de alcohol en la cepa msP ejerce una función similar a la de los antidepresivos, mientras que la abstinencia forzada empeora los síntomas negativos, como el aumento en el tiempo de inmovilidad en el test de natación forzada, asemejándose esta cepa a la condición de adicción al alcohol en humanos, donde el individuo se “automedica” para paliar el estado afectivo negativo (Ciccocioppo et al., 2006).

Estas características de la cepa msP hacen que sea interesante su estudio y evaluación en la adicción al alcohol y es por ello que serán estudiadas en los experimentos que componen esta tesis doctoral.

2. Comorbilidad alcoholismo y depresión.

La adicción al alcohol está relacionada con el desarrollo de más de 60 tipos de enfermedades y más del 50% de los pacientes con trastorno por uso de alcohol presentan un trastorno psiquiátrico comórbido (J.S, 2014; WHO, 2018; Tang et al., 2023). Los trastornos del estado de ánimo son los trastornos psiquiátricos que más coexisten con el TUA con una prevalencia del 22.9 % (J.S, 2014; Becker et al., 2017). En concreto, la tasa de comorbilidad entre el TUA y la depresión mayor se ha evaluado en estudios epidemiológicos que relacionan el TUA con una probabilidad 3.7 veces mayor de sufrir un episodio depresivo el año anterior, mientras que las personas con un diagnóstico de depresión grave a lo largo de la vida tienen un riesgo 1.3 veces mayor de sufrir un trastorno por uso de alcohol (Kessler et al., 1996; Tang et al., 2023). Los estudios de Merikangas y Gelernter encontraron una frecuencia de entre un 8% y un 53% en pacientes alcohólicos hospitalizados de recibir además un diagnóstico de trastorno depresivo mayor, oscilando la frecuencia de síntomas depresivos entre un 16% y un 59 % (Merikangas and Gelernter, 1990; Swendsen et al., 2000). Además, en otros estudios se observó que la depresión grave empeoraba los síntomas del trastorno por uso de alcohol y viceversa, así como el riesgo de recaída, lo que puede explicar por qué las personas con depresión y TUA comórbidos presentan una mayor gravedad de los síntomas y tienen un mayor riesgo de suicidio, especialmente en la población adolescente, lo que supone un grave problema de salud pública (Kessler et al., 1996; Boden and Fergusson, 2011; J.S, 2014; Grant et al., 2015; Tang et al., 2023).

Existen varios estudios que han revelado que los síntomas depresivos mejoran tras un periodo de abstinencia al alcohol y que la remisión de un trastorno se relaciona estrechamente con la remisión de otro (McHugh and Weiss, 2019). Por otra parte, el período de abstinencia del TUA suele coincidir con un aumento de la sintomatología depresiva, por tanto, para realizar el diagnóstico de depresión mayor, los síntomas depresivos deben manifestarse fuera de los períodos de consumo de alcohol o de abstinencia, así, si tras un período de cuatro semanas de abstinencia existen síntomas depresivos, se podría realizar el diagnóstico de trastorno depresivo mayor (McHugh and Weiss, 2019).

La **hipótesis de la automedicación** fue formulada inicialmente en 1985 por Edward Khantzian y sostiene que el consumo de sustancias se produce como consecuencia de un estado emocional negativo, de manera que el consumo de alcohol sería una forma de autotratamiento para aliviar el sufrimiento psicológico (Khantzian, 1985; Turner et al., 2018). Consumir para hacer frente al malestar emocional puede verse motivado además para contrarrestar los síntomas asociados a la abstinencia lo que implica un mantenimiento del trastorno en el tiempo (Markou et al., 1998).

2.1 Neurobiología de la comorbilidad TUA-depresión.

En las últimas décadas se han estudiado los mecanismos neuronales y sistemas de transmisión que se encuentran implicados en el trastorno por uso de alcohol y la depresión mayor, aunque la fisiopatología que implica ambos trastornos aún no está lo suficientemente esclarecida. Ambas patologías provocan múltiples cambios en los neurotransmisores y mecanismos cerebrales, siendo el más estudiado la desregulación en los sistemas monoaminérgicos, especialmente, en el sistema serotoninérgico (Torrens et al., 2005).

La **hipótesis serotoninérgica** sostiene que los niveles bajos de serotonina estarían relacionados con el desarrollo de trastornos del estado de ánimo. Así, se han observado niveles bajos de metabolitos 5-HT en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con depresión, por ello, el tratamiento farmacológico recomendado para estos pacientes son los antidepresivos, en especial, los antidepresivos Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS) ya que aumentan los niveles serotoninérgicos en el cerebro (Dean and Keshavan, 2017).

La modulación serotoninérgica presenta un papel clave en la motivación, en la reducción de las propiedades reforzantes de la comida, la sacarina, el alcohol, los psicoestimulantes, así como de la estimulación eléctrica cerebral directa (Maurel et al., 1999; Browne et al., 2016; McDevitt et al., 2021) estando implicada en la modulación de la recompensa y la motivación mediante interacciones con el sistema mesolímbico dopaminérgico (Gómez-Coronado et al., 2018; Browne et al., 2019; Bahi, 2024).

En el ATV, un aumento en la liberación de dopamina hacia el NAc refuerza el comportamiento operante mientras que una menor liberación de este neurotransmisor hacia el NAc inhibe los comportamientos de recompensa, además, el ATV y el NAc reciben inervaciones de las neuronas serotoninérgicas procedentes del rafe dorsal que modularían la actividad dopaminérgica, inhibiendo el comportamiento motivado a través de interacciones con ATV y NAc (Sari et al., 2011; Browne et al., 2019). Por tanto, el aumento de la producción de 5-HT en los núcleos del rafe dorsal produce una inhibición de la respuesta operante a través de interacciones con el ATV, lo que modula el estado de ánimo y la conducta (Browne et al., 2019; Bahi, 2024). Además de ATV y NAc, las neuronas serotoninérgicas se proyectan a otras regiones, como la CPF, el hipocampo y la amígdala (Sari et al., 2011).

Déficits en otras regiones del circuito de recompensa como distintas áreas del córtex prefrontal se han relacionado con la anhedonia además de la habénula lateral y medial o el RMTg, el cual constituye el centro inhibitorio de la actividad dopaminérgica del ATV, modulando todos ellos la actividad del sistema de recompensa de la adicción y la depresión (Der-Avakian and Markou, 2012; Browne et al., 2019; Figura 8). De hecho, recientes estudios de neuroimagen en pacientes deprimidos mostraron una menor activación del circuito de recompensa, concretamente en el NAc y la corteza cingulada anterior (Ding et al., 2022).

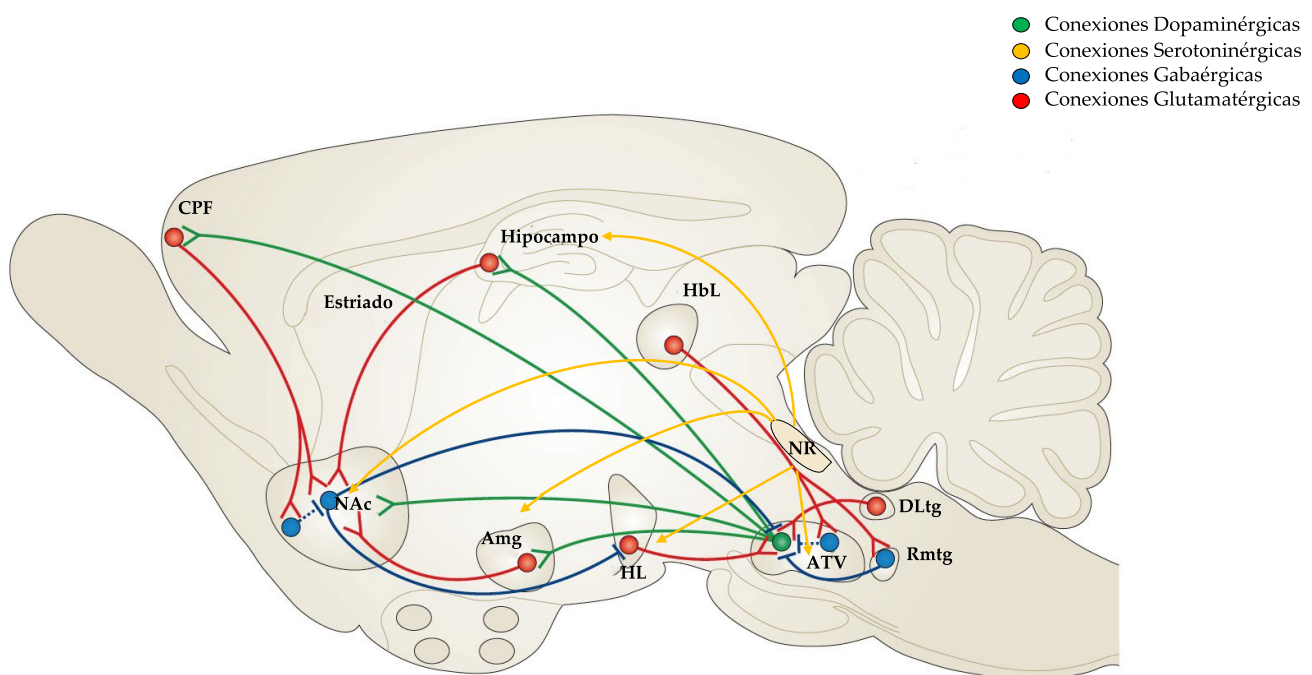


Figura 8. Representación de conexiones serotoninérgicas en el circuito de recompensa. (Modificado de Russo and Nestler, 2013). CPF: corteza prefrontal; HbL: habénula lateral; NR: núcleos del rafe; ATV: área tegmental ventral; NAc: núcleo accumbens; Amg: amígdala; HL: hipotálamo lateral; DLtg: tegmento dorsal lateral; RMTg: núcleo rostromedial medial.

La evaluación de la anhedonia, síntoma definitorio de la depresión, en humanos se suele realizar a través de autoinformes como la Escala de placer de Snaith-Hamilton (SHAPS) mientras que en animales se utilizan pruebas de ingesta y preferencia de sacarosa entre otros, donde una disminución en estos parámetros reflejaría un estado anhedónico en roedores (Der-Avakian and Markou, 2012).

2.2 Tratamiento de TUA y trastornos depresivos concurrentes.

Debido a la complejidad del abordaje de la comorbilidad del trastorno por uso de alcohol y la depresión mayor es importante poner especial énfasis en la realización de un buen diagnóstico para así poder establecer un tratamiento farmacológico adecuado, ya que el tratamiento para la depresión mayor debe incluir la evaluación y el tratamiento del trastorno por uso de alcohol (Boden and Fergusson, 2011). La mayoría de los tratamientos para TUA y trastornos depresivos concurrentes se han basado en ensayos aleatorizados, principalmente, en ensayos de medicamentos antidepresivos (J.S, 2014).

El tratamiento de primera línea del trastorno depresivo mayor se basa en el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) con el objetivo de reestablecer las alteraciones en la transmisión serotoninérgica que muestran los pacientes con depresión (J.S, 2014). El **escitalopram (ESC)**, un enantiómero S puro del citalopram, 100 veces más potente que el enantiómero R en la inhibición de la recaptación de serotonina, es actualmente uno de los ISRS más utilizados para el tratamiento de la depresión mayor (Owens et al., 2001; Cipriani et al., 2009; Pastoor and Gobburu, 2014).

El ESC demostró una mejora de los síntomas depresivos a lo largo de 8 semanas en pacientes con trastorno depresivo mayor en la escala de evaluación de la depresión de Montgomery-Åsberg (MADRS), además de reducir el riesgo de recidiva y el aumento de las tasas de remisión a largo plazo (Vaugh and Goa, 2003). La eficacia del ESC se ha demostrado también en estudios preclínicos en roedores donde se ha observado que su administración disminuye el tiempo de inmovilidad y aumenta el tiempo de natación en la prueba de natación forzada, lo que lo convierte en una buena estrategia farmacológica para los síntomas depresivos (Shahzad et al., 2014).

Sin embargo, en el TUA los ISRS también son una opción farmacológica, y esto se ha observado en estudios preclínicos con roedores donde el tratamiento con citalopram redujo el consumo de alcohol en ratas sin preferencia por el alcohol, así como en ratas predispuestas genéticamente al consumo de alcohol (Hedlund and Wahlström, 1998; Maurel et al., 1999) como en muestras de pacientes no deprimidos, ya que el ISRS citalopram, redujo el deseo por el alcohol (Naranjo et al., 1992). Además, diferentes estudios han comprobado que los ISRS como el ESC han obtenido resultados positivos en pacientes con comorbilidad alcoholismo-depresión (Naranjo and Knoke, 2001; Johnson, 2004).

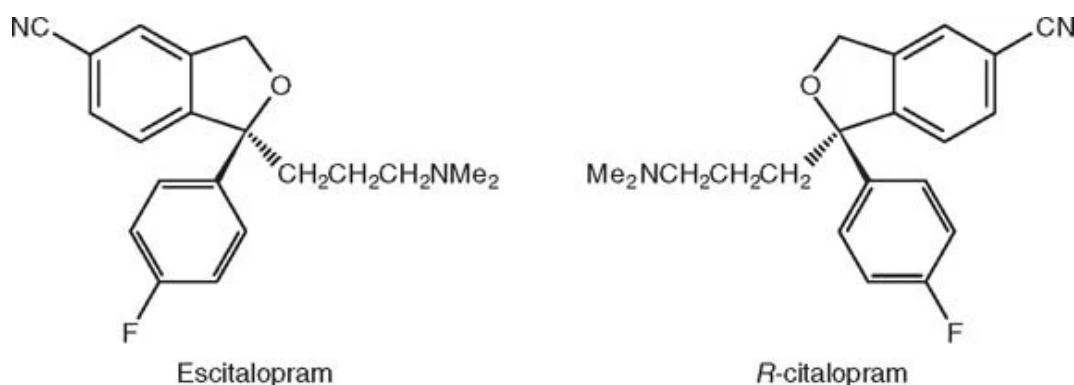


Figura 9. Representación gráfica de las moléculas de escitalopram y citalopram (Vaugh and Goa, 2003).

Aunque los antidepresivos suponen una buena alternativa farmacológica para la concurrencia de alcoholismo y depresión (Markou et al., 1998; J.S, 2014), los pacientes responden de forma variable al tratamiento (Nunes and Levin, 2004; Muhonen et al., 2011; Agabio et al., 2018). Debido a la heterogeneidad de ambos trastornos es necesario encontrar nuevas estrategias farmacológicas que puedan modular el consumo de alcohol y la depresión abarcando la mayor parte de los síntomas posible. En la última década, se ha observado un aumento de la relevancia de los neuropéptidos como la Galanina y sus receptores en los trastornos del estado de ánimo (Genders et al., 2020), es por ello, que en esta tesis estudiaremos su implicación en la comorbilidad TUA-depresión.

Recientemente se ha sugerido que la combinación de fármacos que actúan de forma sinérgica puede ser un novedoso objetivo para la búsqueda de nuevos tratamientos (Witte et al., 2012). De hecho, distintos estudios han demostrado que la combinación de antidepresivos, como el ESC, con otros fármacos eficaces para el TUA, entre ellos, el acamprosato o la naltrexona, en pacientes que presentan TUA y depresión comórbida, produce una mejora significativa de los síntomas depresivos, así como, una reducción del consumo de alcohol. Dichos resultados son mejores que los obtenidos con la administración de ESC solo, mostrando, por tanto, un resultado esperanzador en el tratamiento de ambos trastornos concurrentes (Han et al., 2013; Ho et al., 2016; McHugh and Weiss, 2019).

3. Galanina y el fragmento N-terminal 1-15 de Galanina.

3.1 Galanina.

La Galanina (GAL) es un péptido que fue aislado del intestino de cerdo en 1983 (Tatemoto et al., 1983) y consta de 29 aminoácidos, 30 en humanos, cuya secuencia se encuentra ampliamente conservada entre especies, especialmente en el extremo N-terminal (Wiczek et al., 1996). El fragmento N-terminal de Galanina presenta 15 aminoácidos que son comunes en todos los mamíferos mientras que el resto de la molécula contiene secuencias de aminoácidos diferentes según las especies (Tatemoto et al., 1983; Lang et al., 2007). GAL surge de un pro-péptido precursor conocido como péptido asociado al mensajero de Galanina (GMAP) y del pro-péptido preprogalanina. Otros miembros de la familia de péptidos de la GAL son el Galanin-like peptide (GALP), que presenta una estructura muy similar al de la GAL con seis axones y la Alarina, un péptido de 25 aminoácidos (Lang et al.; 2007).

La **GAL** se encuentra ampliamente **distribuida** en las neuronas dentro del sistema nervioso central (SNC) (Lang et al., 2007); la realización de técnicas inmunohistoquímicas, así como de hibridación in situ, han permitido demostrar que la GAL está presente en los núcleos del rafe dorsal, hipocampo, locus coeruleus, amígdala, NAc y corteza cerebral (Skofitsch y Jacobowitz et al., 1985; Jacobowitz et al., 2004), áreas que además se encuentran implicadas en el desarrollo y mantenimiento de la dependencia de sustancias (Genders et al., 2020). Además, la GAL coexiste en muchos de estos núcleos con neurotransmisores como la serotonina en el rafe dorsal o en el hipocampo o la noradrenalina en el locus coeruleus implicados en trastornos mentales, por ejemplo, la depresión (Melander et al., 1986; Jacobowitz et al., 2004).

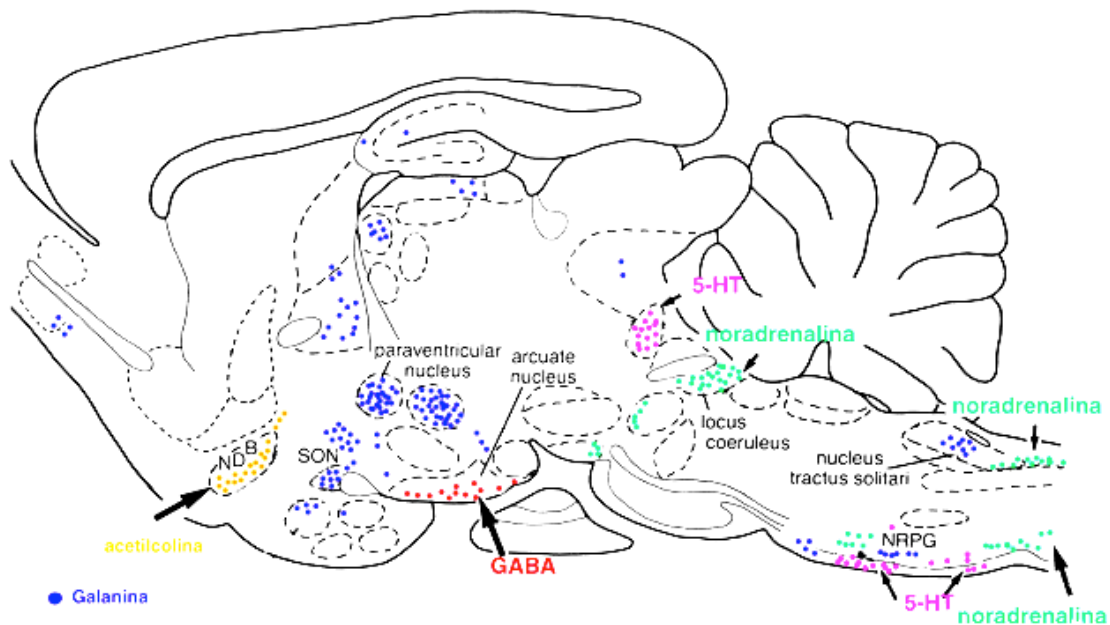


Figura 10: Distribución de GAL en una sección sagital de cerebro de rata. Los puntos de color azul indican la presencia de células positivas de GAL y las estrellas indican la coexistencia de GAL con otro neurotransmisor. Modificado de Bartfai et al., 1992. 5-HT: Serotonina.

Receptores

La acción de **GAL** se ve mediada por tres tipos de **receptores** pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G: GALR1, GALR2 y GALR3 (Branchek et al., 2000; Mitsukawa et al., 2008). Los receptores GALR1 y GALR2 presentan una afinidad similar por la GAL, mientras que la afinidad del receptor GALR3 por este péptido es menor.

GALR1 fue el primer receptor GAL descubierto cuando se aisló de una línea celular humana de melanoma humano de Bowes para posteriormente clonarse en rata (Habert-Ortoli et al., 1994; Burgevin et al., 1995) y su activación provoca la inhibición de adenilato ciclasa reduciendo la concentración de AMPc y facilitando la apertura de los canales de potasio (Branchek et al., 2000; Lang et al., 2007).

El receptor *GALR2* es el receptor más distribuido en el SNC de los tres receptores y, a diferencia del receptor *GALR1*, la activación de *GALR2* se encuentra acoplada a las proteínas estimuladoras Gq y Gs, mientras que no muestra acción sobre las proteínas inhibidoras Gi. Cuando este receptor se acopla a la proteína Gq, activa la fosfolipasa C (PLC), causando y provocando la liberación de calcio intracelular. (Branchek et al., 2000; Lang et al., 2007).

GALR3 se encuentra en la periferia, aunque con una distribución más limitada en el SNC, comparado con el resto de receptores GAL. Del mismo modo que *GALR1*, la activación de *GALR3* es generalmente inhibitoria, acoplándose con Gi (Branchek et al., 2000).

Funciones

Debido a su amplia distribución por el SNC, las funciones de la GAL son muy diversas: control de la ingesta, funciones cardiovasculares, homeostasis energética, funciones endocrinas, regulación de procesos inflamatorios y regulación del estado de ánimo y adicción, incluida el consumo de alcohol y el alcoholismo (Mitzsukawa et al., 2008; Diaz-Cabiale et al., 2010; Lang et al., 2015).

Tras el descubrimiento de GAL se empezó a estudiar su implicación en los **trastornos del estado de ánimo**. En roedores la administración intracerebroventricular (icv) de GAL indujo comportamientos ansiosos y depresivos (Bing et al., 1993) junto a una reducción en el metabolismo de 5-HT en áreas cerebrales clave (Fuxe et al., 1988). En la línea de estos resultados, estudios adicionales mostraron que los ratones que sobreexpresaban GAL mostraban efectos prodepresivos en pruebas de desesperanza, revelando su influencia en los trastornos del estado de ánimo (Kuteeva et al., 2005, 2007).

Actualmente, se sugiere un papel antidepresivo y ansiolítico de GALR2, mientras que, por el contrario, la activación de los receptores GALR1 y GALR3 podrían tener efectos prodepresivos y ansiógenos (figura 11). Así, GALR1 y GALR3 parece que actúan inhibiendo la transmisión de serotonina en el núcleo del rafe dorsal, aumentando la ansiedad y los comportamientos depresivos mientras que el receptor GALR2 estimula la liberación sináptica de serotonina mejorando estos comportamientos (Bartfai et al., 2004; Kuteeva et al., 2008; Lu et al., 2005).

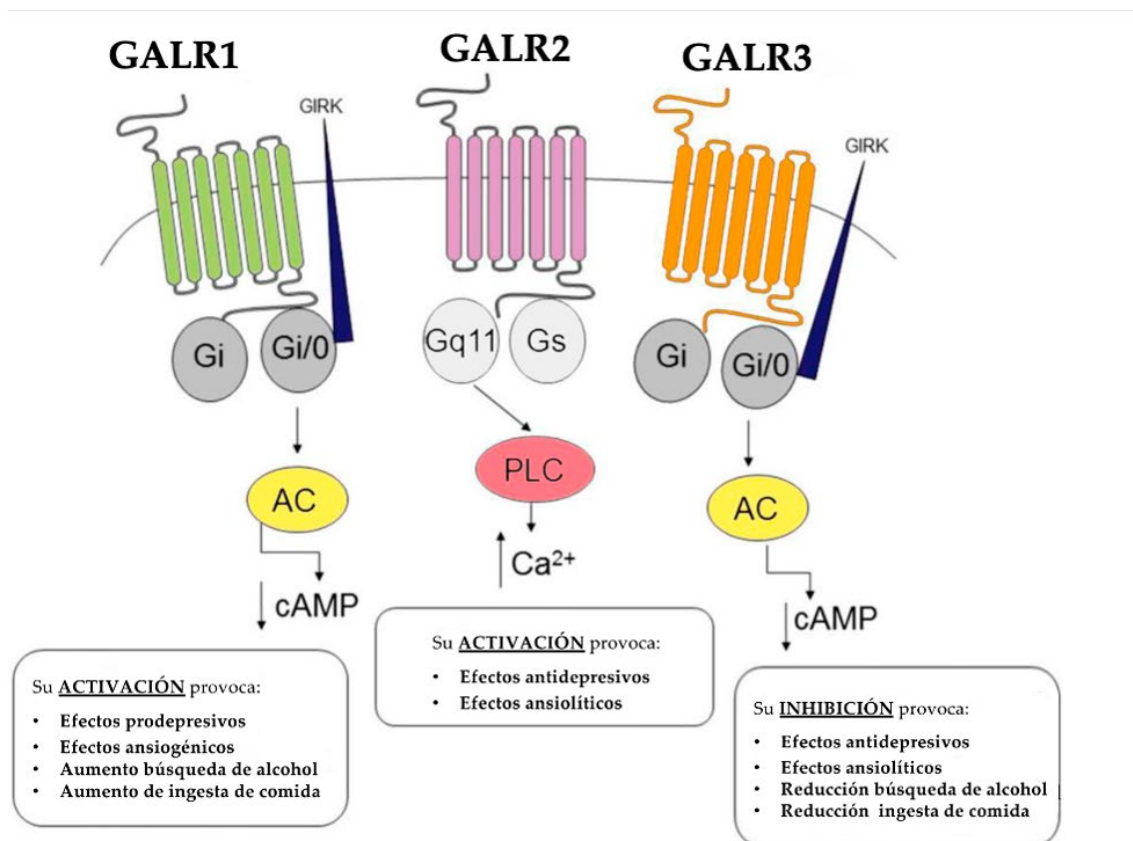


Figura 11. Diagrama de los tres subtipos de receptores GAL (GALR1, GALR2 y GALR3) y sus vías de señalización, incluidos los principales resultados conductuales en roedores tras la activación/inhibición farmacológica. Abreviaturas: AC: adenilato ciclasa; GIRK: canal de potasio rectificador interno regulado por proteína G; PLC: fosfolipasa C. Modificado de Genders et al., 2020.

En **modelos animales de depresión**, como la cepa de rata Flinders, se ha observado un aumento de los lugares de unión a GAL en el núcleo del rafe dorsal relacionado con un aumento del comportamiento de depresivo. Además, la administración de GAL en este núcleo suprimió la liberación de 5-HT, efecto revertido con el M35, antagonista no selectivo de GAL (Bellido et al., 2002; Kehr et al., 2002).

Los estudios sobre los efectos de GAL en **alcoholismo** surgieron en la década de los 80 donde no se obtuvieron datos concluyentes (Roy et al., 1990). No fue hasta el año 2004 cuando el grupo de Leibowitz demostró que la microinyección de GAL en el tercer ventrículo provocaba un aumento de la ingesta de alcohol en ratas Sprague-Dawley, en la prueba de elección de dos botellas a partir de una solución de alcohol al 7 %, sin modificar la ingesta de agua y alimentos (Lewis et al., 2004). Este aumento también se observó cuando se administró GAL directamente en el núcleo paraventricular (PVN) mientras que su efecto fue revertido con el uso del antagonista de receptores de GAL, M40 (Lewis et al., 2004; Rada et al., 2004). La inyección de GAL en el PVN aumentó la liberación de dopamina en el NAc lo que reflejó la capacidad de la GAL para aumentar los efectos gratificantes del alcohol (Rada et al., 1998; Picciotto et al., 2010). Además, se ha visto que el consumo de alcohol aumenta la expresión génica de GAL y este aumento conlleva, a su vez, un incremento del consumo de alcohol mientras que en los ratones knockout de GAL se observa el efecto contrario, con una reducción en el consumo de alcohol (Leibowitz et al., 2003; Karatayev et al. 2010).

Por otro lado, las ratas tratadas con el antagonista de GALR3, SNAP 37889, redujeron la búsqueda de alcohol en un modelo de autoadministración y presentaron una menor motivación para la obtención del alcohol en un modelo de ratio progresivo en comparación con los animales controles (Ash et al., 2011, 2014). En humanos parece que la GAL contribuye a la abstinencia de alcohol presentando niveles reducidos de este péptido en las personas dependientes del alcohol el primer día de abstinencia (Heberlein et al., 2011; Genders et al., 2020).

3.2 Fragmento N-terminal 1-15 de Galanina [GAL(1-15)].

A partir de técnicas como la espectrometría de masa y experimentos de autorradiografía se ha descubierto que existen fragmentos derivados de GAL, que se localizan en la musculatura lisa gastrointestinal y que presentan también actividad biológica (Hedlund et al, 1992; Ihnatko and Theodorsson, 2017). Debido a que en la mayoría de las secuencias de GAL los 15 primeros aminoácidos están muy conservados, se ha propuesto que es la parte N-terminal la parte esencial para la interacción con los receptores de GAL (Bedecs et al., 1995; Wicz et al., 1996). Uno de los fragmentos más estudiados es el fragmento N-terminal de Galanina [GAL(1-15)]. GAL(1-15) tiene actividad en todo el SNC (Díaz-Cabiale et al., 2010; Flores-Burgess et al., 2017; Millón et al., 2017) y muestra un papel diferencial y específico en comparación con la molécula completa de GAL en diferentes funciones, incluida la depresión, la ansiedad y el consumo de alcohol (Millón et al., 2015, 2017, 2019a,b).

Secuencia homóloga de la Galanina (aminoácidos 1-15)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Gly	-Trp	-Thr	-Leu	-Asn	-Ser	-Ala	-Gly	-Tyr	-Leu	-Leu	-Gly	-Pro	-His	-Ala

Secuencia heteróloga de la Galanina (aminoácidos 16-29)

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
¹ Cerdo	Ileu	-Asp	-Asn	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-His	-Asp	-Lys	-Tyr	-Gly	-Leu	-Ala	-NH ₂
² Vaca	Leu	-Asp	-Ser	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-Gln	-Asp	-Lys	-His	-Gly	-Leu	-Ala	-NH ₂
³ Rata	Ileu	-Asp	-Asn	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-Ser	-Asp	-Lys	-His	-Gly	-Leu	-Thr	-NH ₂
⁴ Oveja	Ileu	-Asp	-Asn	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-His	-Asp	-Lys	-His	-Gly	-Leu	-Ala	-NH ₂
⁵ Gallina	Val	-Asp	-Asn	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-Asn	-Asp	-Lys	-His	-Gly	-Phe	-Thr	-NH ₂
⁶ Humano	Val	-Gly	-Asn	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-Ser	-Asp	-Lys	-Asn	-Gly	-Leu	-Thr	-Ser

Figura 12. Secuencia de la Galanina (GAL) en distintas especies donde se observa que el fragmento N- terminal 1-15 es común en todas las especies (Wiczek et al., 1996 modificado).

Los tres tipos de receptores GAL (GALR1, GALR2 y GALR3) muestran una mayor afinidad por la GAL que los fragmentos terminales como la GAL(1-15). Sin embargo, es importante destacar la existencia de lugares de unión específicos que presentan alta afinidad para GAL(1-15), descritos en experimentos de autoradiografía. Estos lugares presentan una baja densidad en sitios de unión de la molécula completa de GAL, como es el caso especialmente del hipocampo dorsal, el neocórtex y estriado, áreas donde los sitios de unión mostraron una alta selectividad por GAL(1-15) (Hedlund et al., 1992). En otras zonas como, por ejemplo, en el núcleo del rafe dorsal existe un solapamiento entre los sitios de unión para GAL y GAL(1-15) (Hedlund et al., 1992).

Tras este hallazgo, inicialmente se postuló la posible existencia de un receptor específico de GAL(1-15) aunque posteriormente mediante técnicas como la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) y la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) se demostró la existencia de heterodímeros GALR1-GALR2 (Fuxe et al., 2008, 2012; Borroto-Escuela et al., 2014).

Realizando un doble marcaje de los receptores GALR1 y GALR2 se observó la colocación celular de ambos receptores en hipocampo dorsal, giro dentado y el núcleo del rafe dorsal (Millón et al., 2015) y, posteriormente, la técnica de ensayo de ligazón por proximidad (PLA) reveló que ambos receptores se colocaban en las mismas neuronas con una estrecha proximidad, lo que permite la formación de complejos heteroreceptores GALR1 y GALR2 (Millón et al., 2015). La reducción en la cuantificación de PLA mostrada tras inyecciones de siRNA GALR1 y siRNA GALR2 indicaron que las señales de PLA obtenidas son específicas y permitirían el complejo heteroreceptor GALR1-GALR2 (Millón et al., 2016).

No solo se observó este complejo heteroreceptor en modelos animales, sino también en líneas celulares, donde estudios de Bioluminiscencia (BRET) y ensayos de ligamiento por proximidad in situ demostraron la presencia del heterorreceptor GALR1-GALR2 en la línea celular HEK293T, en las zonas de rafe e hipocampo (Borroto-Escuela et al., 2014).

Funciones de GAL(1-15)

En experimentos realizados por nuestro grupo de investigación se ha demostrado que GAL(1-15) tiene funciones diferentes a las de la molécula completa de GAL, incluida la regulación del control cardiovascular así como la regulación del estado de ánimo (Díaz-Cabiale et al., 2005, 2010, Millón et al., 2015).

En el estudio de GAL(1-15) en la **regulación del estado de ánimo**, se observó un efecto ansiogénico y prodepresivo del fragmento en distintas pruebas de conducta al administrar GAL(1-15) vía icv en rata, mostrando unos efectos más potentes que la molécula completa GAL, lo que sugiere un papel potencial de GAL(1-15) en los trastornos del estado de ánimo, especialmente en la depresión (Millón et al., 2015).

Por otra parte, la administración de GAL(1-15) mejora los efectos antidepresivos inducidos por el agonista de 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) en roedores, efecto más potente que los inducidos por GAL, demostrando la existencia de una interacción entre GAL(1-15) y el receptor 5-HT_{1A} (Fuxe et al., 2008; Millón et al., 2016). Este receptor serotoninérgico es el más estudiado en relación con el trastorno depresivo mayor y actúa como autoreceptor en las dendritas y el cuerpo celular de las neuronas 5-HT en los núcleos del rafe dorsal y como heteroreceptor postsináptico en las neuronas de las áreas de proyección de 5-HT como el hipocampo, mediando los efectos de los antidepresivos (Barnes and Sharp, 1999; Artigas, 2013; Millón et al., 2016).

En experimentos de autorradiografía, GAL(1-15) modificó las características de unión así como los niveles de ARMm del receptor 5-HT1A en hipocampo dorsal y rafe dorsal, tanto a nivel postsináptico como a nivel de autoreceptor (Millón et al., 2016). Además, la técnica de ligamiento por proximidad mostró que el receptor 5-HT1A estaba en estrecha proximidad de GALR1 y GALR2 en el hipocampo dorsal y rafe dorsal (Millón et al., 2016).

A la vista de las acciones de GAL(1-15) mediadas a través del heterodímero GALR1-GALR2 y la interacción existente entre GAL(1-15) y el receptor 5-HT1A se ha sugerido la existencia de un complejo de receptores en rafe dorsal e hipocampo, el complejo GALR1-GALR2-5-HT1A, lo que abre la posibilidad del desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para la depresión (Fuxe et al., 2012; Millón et al., 2016).

Tras los resultados previos relacionados con GAL(1-15) en los trastornos del estado de ánimo, se investigó la combinación de GAL(1-15) con el ISRS FLX, ya que en la actualidad es frecuente el uso de la terapia de potenciación de fármacos para aumentar o potenciar los efectos de los antidepresivos (Fava et al., 2001). Los resultados de este trabajo revelaron que esta combinación mejoró los efectos antidepresivos en pruebas de desesperanza, como el test de natación forzada, en comparación con la administración sola de FLX (Flores-Burgess et al., 2017). El uso del antagonista de GALR2, M871, y la realización de un modelo knockdown indicó la participación de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto mediado por la GAL(1-15). Además, la coadministración de GAL(1-15) y FLX modificó las características funcionales del receptor 5-HT1A en hipocampo dorsal, indicando una interacción GAL(1-15)-FLX en este área (Flores-Burgess et al., 2017).

El estudio de la combinación de GAL(1-15) junto con antidepresivos ISRS se ha estudiado también en un modelo animal de depresión crónica, como es el modelo de rata bulbectomizada olfativa (OBX) (Flores-Burgess et al., 2021; García-Durán et al., 2021). Este modelo animal presenta características similares, tanto a nivel molecular como a nivel de comportamiento, a la depresión en pacientes, lo que lo convierte en un buen modelo objeto de estudio (Morales-Medina et al., 2017).

Los estudios sobre la combinación de GAL(1-15) y el ISRS FLX mostraron una potenciación del efecto de la FLX sola en el FST, además de reestablecer el estado de anhedonia presentado en los animales OBX en el test de preferencia de sacarosa (SPT) (Flores-Burgess et al., 2021). A nivel molecular, GAL(1-15)+FLX indujo un aumento de los niveles de ARNm del receptor 5-HT_{1A} en el hipocampo dorsal y un ligero aumento de la Bmax en el giro dentado del hipocampo, sugiriendo un papel clave del 5-HT_{1A} en la interacción GAL(1-15)-FLX en el hipocampo (Flores-Burgess et al., 2021). Estos estudios fueron confirmados al estudiar la combinación de GAL(1-15) con ESC, mostrando una potenciación de los efectos antidepresivos producidos por ESC en distintas pruebas de desesperanza, como el FST en la rata OBX (García-Durán et al., 2021).

Todos estos resultados demuestran un efecto en la potenciación de fármacos con distintos ISRS en un modelo animal de depresión, lo que constituye una novedosa estrategia terapéutica con buenos resultados.

3.2.1 GAL(1-15) en el sistema de refuerzo: anhedonia y consumo de alcohol.

GAL(1-15) se ha estudiado en pruebas que evalúan anhedonia y recompensa utilizando para ello métodos ampliamente aceptados para evaluar este comportamiento en pruebas operantes y no operantes en modelos animales. Una de estas pruebas es la **autoadministración de sacarina** donde se observó que GAL(1-15) y no GAL, produjo una fuerte reducción en el número de refuerzos de sacarina (Millón et al., 2019a).

El papel diferencial de GAL(1-15) frente a GAL también se observó en el test de preferencia de sacarosa, donde las ratas administradas con GAL(1-15) disminuyeron el consumo y preferencia de sacarosa a las 2, 8 y 24 horas, tras su administración, indicando una disminución del valor reforzante de la sacarosa, mientras que la administración de GAL careció de efecto. En otras pruebas que evalúan anhedonia, GAL(1-15) demostró una disminución del efecto reforzante de la comida tras un periodo de ayuno y una disminución del refuerzo sexual (Millón et al., 2019a). Se ha demostrado que los efectos observados similares a la anhedonia inducidos por GAL(1-15) fueron bloqueados por el antagonista del receptor GALR2, M871, lo que sugiere que GAL(1-15) actuaría a través del heterodímero GALR1-GALR2 (Millón et al., 2019a).

Por otro lado, para conocer el efecto de GAL(1-15) en procesos metabólicos se realizaron estudios de neuroimagen mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET), donde GAL(1-15) indujo una disminución en la captación de 18F-fluorodesoxiglucosa (F-FDG) en el hipocampo, el tálamo y el cuerpo estriado así como un aumento de la captación de F-FDG en el córtex prefrontal y piriforme (Millón et al., 2019a).

En el sistema de recompensa mesocorticolímbico se analizaron los principales núcleos implicados en el refuerzo como, son el ATV y el NAc, y el efecto de la administración de GAL(1-15) sobre la expresión de genes que regulan la actividad dopaminérgica, y se observó que GAL(1-15) indujo una fuerte disminución de los transportadores de DA, DAT y Vmat2, en el ATV, y un aumento del autoreceptor D3 que modularía la síntesis y liberación de DA en esta área, por lo que, la GAL(1-15) estaría afectando a la producción y liberación de DA (Millón et al., 2019a). No solo en el ATV, sino que en el NAc, GAL(1-15) aumentó la expresión de los receptores de DA lo que sugiere un efecto compensatorio tras la reducción de la liberación de DA en el ATV (Millón et al., 2019a).

Por tanto, la administración de GAL(1-15) estaría afectando a la producción y liberación de dopamina en núcleos clave del sistema de recompensa cerebral como el ATV y el NAc, indicando que el principal efecto de este neuropéptido se encuentra sobre la vía mesolímbica, ya que se encuentra implicado en la reorganización funcional del sistema dopaminérgico, lo que probablemente conduce a su inhibición funcional cuyo efecto se manifiesta también a nivel conductual produciendo una pérdida de la motivación en distintas pruebas de conducta en roedores (Millón et al., 2019a).

Siguiendo la línea de estos resultados previos, se procedió a estudiar el papel de GAL(1-15) sobre otro reforzador artificial, como es el **alcohol**, en un **modelo no operante de consumo voluntario**. Los resultados de este trabajo indicaron la capacidad de GAL(1-15) de reducir tanto el consumo como la preferencia por el alcohol en un 90%, estando implicados los receptores GALR1 y GALR2 en dicho efecto y mostrando un papel diferencial con la GAL (Millón et al., 2019b).

En este modelo, GAL(1-15) aumentó la expresión de C-Fos y Rab5 en el cuerpo estriado, aumentando la activación neuronal y la internalización de receptores en este área (Millón et al., 2019b). Asociado a estos efectos, GAL(1-15) mostró una reducción de la actividad locomotora en rata inducida por la administración de alcohol intraperitoneal, lo que sugiere la modulación del sistema dopaminérgico por parte de GAL(1-15), con la participación del cuerpo estriado, objetivo crucial de las proyecciones dopaminérgicas (Millón et al., 2019b).

Tras estos antecedentes sobre GAL(1-15) en alcoholismo, en esta tesis doctoral se plantea el estudio de este fragmento en la búsqueda y motivación por el alcohol en un modelo de autoadministración. Además, debido a que la depresión es uno de los trastornos comórbidos más frecuentes en el alcoholismo, se analizará la combinación de GAL(1-15) con el antidepresivo ESC en pruebas que evalúan conductas depresivas y ansiogénicas en roedores durante un consumo de alcohol crónico.

Objetivos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Como se ha comentado anteriormente, la Galanina (GAL) es un péptido que se encuentra activo en el SNC (Lang et al., 2007). Además, se ha visto que existen fragmentos activos de GAL, como el fragmento de Galanina 1-15 [GAL(1-15)], que presentan actividad biológica en el SNC y que ha mostrado un papel específico y diferencial con respecto a la molécula completa GAL, en distintas funciones (Díaz-Cabiale et al., 2010; Millón et al., 2015; Flores-Burgess et al., 2017; Millón et al., 2017, 2019a,b). Específicamente en la anhedonia se ha demostrado que la administración de GAL(1-15) induce una pérdida de motivación en roedores en distintas pruebas como la autoadministración de sacarina o el test de preferencia de sacarosa entre otras, mientras que GAL no ha mostrado dicho efecto (Millón et al., 2019a). Estos resultados precedieron al estudio del papel de GAL(1-15) en otros reforzadores, como las drogas de abuso, en concreto el alcohol, donde se observó que en un modelo voluntario de dos biberones la administración de GAL(1-15) indujo una reducción tanto del consumo como la preferencia por el alcohol, siendo estos efectos específicos de GAL(1-15), con la implicación del sistema mesocorticolímbico, ya que la administración del fragmento 1-15 moduló la liberación de dopamina de núcleos relacionados con el sistema de recompensa, como el área tegmental ventral (ATV) o el núcleo accumbens (NAc) (Millón et al., 2019b).

Tras los antecedentes expuestos sobre el papel de GAL(1-15) en el trastorno por uso de alcohol y la gran importancia de este trastorno en la población mundial, la realización de la presente tesis doctoral pretende abordar los siguientes **objetivos generales**:

1. Analizar el efecto de GAL(1-15) en la búsqueda y motivación por el alcohol en un modelo operante de autoadministración, así como describir el posible mecanismo de actuación de este fragmento de Galanina.

2. Estudiar la combinación de GAL(1-15) y el antidepresivo escitalopram como una posible estrategia farmacológica para la comorbilidad depresión-alcoholismo.

Para poder desarrollar y llevar a cabo los objetivos generales, se propondrán los siguientes **objetivos específicos**:

- 1. Analizar el papel de GAL(1-15) en un modelo de autoadministración de alcohol.**

- 1.1 Para analizar el papel de GAL(1-15) en el consumo y la búsqueda de alcohol mediante la prueba de autoadministración, se estudiará:**

- a. El papel de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol.
- b. Los cambios en la expresión de genes producidos tras la administración de GAL(1-15) en el sistema mesocorticolímbico.
- c. La comparación del efecto de Galanina (GAL) y GAL(1-15).
- d. El papel de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto producido por la GAL(1-15).

- 1.2 Analizar el papel de GAL(1-15) en el grado de motivación por el alcohol mediante un programa de ratio progresivo.**

- 1.3 Estudiar el papel de GAL(1-15) en la recaída alcohólica por contexto.**

- 1.4 Evaluar el efecto de GAL(1-15) por una vía compatible con el uso en pacientes: la vía intranasal.**

- 1.5 Estudiar el efecto de GAL(1-15) en la cepa Marchigian Sardinian (msP), una cepa con alta preferencia por el alcohol.**

2. Para analizar el efecto de la combinación de GAL(1-15) y escitalopram (ESC) en la comorbilidad alcoholismo-depresión, se analizará:

2.1 La combinación de GAL(1-15) y ESC en el test de preferencia de sacarosa.

2.2 La combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

2.3 El efecto de la combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

a. Analizar el efecto de la combinación de GAL(1-15) y ESC en pruebas de ansiedad y depresión en animales bajo un consumo crónico de alcohol.

b. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol, mediante la realización de estudios inmunohistoquímicos del marcador de actividad neuronal C-Fos en los núcleos implicados en alcoholismo y depresión.

Material y métodos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Metodología animal.

1.1. Animales de experimentación.

1.1.1. Cepa Sprague – Dawley.

En el presente estudio se han utilizado ratas macho albinas de la cepa Sprague – Dawley, suministradas por la casa comercial Charles River Labs (CRIFFA, Barcelona), cuyo peso corporal ha oscilado entre los 200-250 gramos.

Los animales se alojaron en el centro de experimentación animal de los servicios centrales de la Universidad de Málaga bajo condiciones controladas. La temperatura media fue de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ con un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12 horas y 45-65 % de humedad (Romero-Fernandez et al., 2016). Los animales se alimentaron con una dieta estándar de mantenimiento ratón/rata (CRIFFA, Barcelona) y agua de la red general de mantenimiento, teniendo libre acceso (ad libitum) a comida y bebida. Una vez los animales se instalaron en el centro, permanecieron una semana en cuarentena para el control del estado sanitario, así como para minimizar los efectos del estrés provocados por el transporte y la habituación a las nuevas condiciones de estabulación.

Los animales de experimentación se trataron según la directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC y siguiendo las recomendaciones que se establecen en la Ley 6/2013 del 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, del 7 de noviembre y en el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero del estado español.

1.1.2. Cepa Marchigian Sardinian (msP)

Para la realización de los experimentos durante el período de estancia internacional en la Universidad de Camerino (Italia), se utilizó la cepa Marchigian Sardinian (msP). Esta cepa seleccionada genéticamente por su alta preferencia por el alcohol, surge a partir de la 13ª generación de ratas sardinians preferentes por el alcohol (sP) en el Departamento de Neurociencia de la Universidad de Cagliari (Italia). Posteriormente, tras 20 años de crianza selectiva en el Departamento de Medicina Experimental y Salud Pública de la Universidad de Camerino (Italia), estos animales se renombraron como msP (Ciccocioppo et al., 2006).

Se han utilizado ratas macho msP de 300-350 gramos y ratas hembras msP cuyo peso corporal ha oscilado entre los 200-250 gramos. Los animales se criaron en las instalaciones para animales de la Universidad de Camerino, Italia. Los animales se alojaron individualmente bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (luces apagadas a las 08:30 am) a una temperatura constante de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad del 45-55 %, con libre acceso a agua y comida.

Todos los procedimientos siguieron la Directiva de la UE para el cuidado y uso de animales de laboratorio y han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Camerino.

1.2. Cirugía estereotáxica con implantación de cánula crónica intracerebroventricular lateral.

Para la anestesia de los animales durante la cirugía de implantación de cánula crónica se empleó anestesia inhalatoria. Más específicamente, se utilizó el anestésico isoflurano, el cual permite una rápida inducción y recuperación posterior, además de ser un anestésico seguro ya que no altera el metabolismo hepático ni renal (Wright, 1997).

El aparato de anestesia está compuesto por una caja de inducción, donde inicialmente se coloca al animal para anestesiarlo con un nivel de isoflurano al 5 % (Romero-Fernandez et al., 2016). Pasados 2-3 minutos, se comprueban los reflejos para proceder al inicio de la cirugía. Una vez anestesiado, el animal se coloca en el aparato de estereotaxia (Kopf instruments, Tujunga, EEUU).



Máquina de anestesia inhalatoria



Puesto de cirugía



Material de cirugía

Figura 1. Material e instrumentos para cirugía estereotáxica.

El hocico se introduce en el aparato inductor de anestesia con un nivel de mantenimiento de isofluorano al 2-3 %. Para alinear los puntos craneométricos Bregma y Lambda en un plano horizontal, se ajusta la altura de la barra anterior del aparato estereotáxico. Se coloca una manta termostática para mantener la temperatura corporal del animal.

Una vez el animal está fijado correctamente y sin posibilidad de movimiento, se procede a rasurar la zona a operar. Con ayuda de un bisturí, se realiza una incisión desde la comisura anterior de los ojos hasta la parte posterior de la cabeza, apartamos la piel con ayuda de dos pinzas fórceps de punta curvada y se realiza una segunda incisión para retirar el periostio. Una vez la calota esté al descubierto, limpia y seca, localizamos el punto de confluencia entre el hueso frontal y los huesos parietales. Este punto es conocido como Bregma y lo tomamos como referencia para poder insertar la cánula guía en el ventrículo lateral. Para ello, seguimos las coordenadas estereotáxicas del atlas de rata de Paxinos y Watson (1997): Coordenada Antero Posterior: -1mm; Coordenada Lateral: 1.4 mm; Coordenada Vertical: 3.6mm.

Una vez tomadas las coordenadas, marcamos las referencias en la calota y con la ayuda de un taladro y las brocas adecuadas realizamos los agujeros sin llegar a tocar la duramadre. En concreto, se realiza un agujero para la cánula guía (0.8 mm) y dos agujeros paralelos para la implantación de los tornillos (1 mm). Una vez realizados los agujeros, los tornillos se implantan en los agujeros adecuados para ellos sin rebasar el grosor del cráneo y posteriormente implantamos la cánula guía C313G/Spc Guide 22GA (Plastic One, Roanoke, EEUU).

Para fijar la cánula guía y los tornillos, utilizamos un cilindro pequeño de plástico y lo rellenamos con cemento dental Dentalon® (Heraeus, Hanau, Alemania) sin cubrir la cánula guía. Una vez secado el cemento, procedemos a realizar la sutura con hilo de seda dejando libre el cilindro que contiene la cánula guía. Una vez finalizada la operación, los animales son administrados con 0.1 mg/Kg de metacam para el dolor y se devuelven a sus jaulas en la sala de estabulación. El postoperatorio tuvo una duración de una semana y su estado fue evaluado diariamente.

1.3. Administración de sustancias.

1.3.1. Inyección intracerebroventricular.

Para realizar las inyecciones intracerebroventriculares se usa una cánula de acero inoxidable (26G) (C313I, Plastic One) de 0.3 mm de longitud superior a la cánula guía para evitar la retrodifusión de la sustancia inyectada. Dicha cánula está unida a un tubo de polipropileno (P10) de 10 cm en cuyo extremo está unido a una jeringuilla Hamilton de 25 μ L de volumen. El volumen de la sustancia inyectada es de 5 μ L en todos los experimentos. Para la disolución de la sustancia se utiliza líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) ajustado a un pH de 7.4. La composición del LCRa es la siguiente: Cloruro sódico 120 mM, Carbonato monosódico 20 mM, Cloruro Potásico 2 mM, Fosfato monopotásico 0.5 mM, Cloruro cálcico 1.2 mM, Cloruro magnésico 1.8 mM, Sulfato bisódico 0.5 mM, D-glucosa 5.8 mM. Todas las sustancias se adquirieron en Panreac Química S.A., Barcelona, España.

Para realizar la inyección intracerebroventricular se inmoviliza al animal con ayuda de una bayeta y, posteriormente, se introduce la cánula de inyección por la cánula guía hasta el final. Seguidamente, inyectamos 5 μ L de forma constante y paulatina durante 2 minutos para evitar el reflujo de la sustancia por el aumento de la presión. Finalmente, se mantiene la cánula de inyección durante un minuto más para favorecer la difusión de la sustancia inyectada y se retira. Es conveniente realizar comprobaciones por si existieran signos de derrame de la sustancia inyectada o hidrocefalia en el animal tras la inyección. Para realizar el procedimiento correctamente, es necesario que el animal haya sido manipulado previamente, como se explicará en apartados posteriores.

1.3.2. Inyección intraperitoneal.

En primer lugar, es necesario pesar al animal para poder ajustar la dosis del fármaco a administrar. El volumen de administración a utilizar es de 2 mL/Kg. Con ayuda de una bayeta, cogemos al animal por debajo de las patas delanteras y las cruzamos para evitar movimientos laterales de la cabeza. Cogiendo la aguja con un ángulo de 45 grados, se inyecta al animal en la zona baja del abdomen asegurándonos que estamos en la cavidad peritoneal.

1.3.3. Administración intranasal.

Como vía de administración alternativa a la vía intracerebroventricular, se realizó la administración intranasal. Es necesario anestesiarse al animal con el anestésico inhalatorio isofluorano previo a la administración intranasal de sustancias.

Una vez el animal se encuentre dormido, inyectamos un volumen total de 20 μL de la sustancia, 10 μL por orificio nasal con ayuda de una pipeta y una punta de plástico desechable. Hay que tener especial cuidado para evitar el contacto con la mucosa. Tras la administración intranasal, la cabeza del animal se mantuvo en una posición inclinada hacia atrás durante aproximadamente 15 segundos para evitar la pérdida de solución por las fosas nasales. Para la disolución de la sustancia se utiliza agua destilada (Serova et al., 2013, 2019).

2. Procedimientos experimentales.

2.1 Condiciones de la sala de experimentación.

Las diferentes pruebas de comportamiento llevadas a cabo, así como los procedimientos y técnicas experimentales realizadas en el presente trabajo, tuvieron lugar en salas de conducta específicamente diseñadas para ello, tanto en el centro de experimentación animal de la Universidad de Málaga como en el centro de la Universidad de Camerino.

Las salas de conducta cuentan con un sistema de ventilación de presión positiva que evita la entrada de olores y ruidos externos que pudieran producir estrés en los animales y su posible alteración en la realización de los experimentos.

Los experimentos realizados para el estudio del consumo de alcohol se realizaron bajo ciclo de oscuridad (luces apagadas a las 8 pm), con uso de luz roja para mejorar la visibilidad del experimentador. El resto de pruebas de conducta se llevaron a cabo en salas iluminadas con una intensidad menor de 100 Lux. Los procedimientos experimentales se realizaron entre las 8:00 h y las 15:00 h coincidiendo con el período de mayor actividad nocturna en roedores.

Entre cada animal evaluado se procedió a la limpieza con alcohol al 70% de las señales olfatorias de territorialidad (orina y defecación) presentes en las diferentes pruebas de conducta, con el objetivo de no interferir en la conducta del siguiente animal.

2.2. Manipulación y habituación de los animales de experimentación.

Los animales se manipulan días previos antes del inicio del procedimiento experimental. Para ello las ratas se habitúan en la sala de conducta durante una hora, manteniendo las mismas condiciones que se seguirán el día del experimento. Posteriormente, los animales se manipulan durante unos minutos. El objetivo es evitar que el investigador se convierta en una amenaza para el animal, habituando su presencia y consiguiendo que el animal carezca de estrés durante todo el experimento. En los días de manipulación, se inserta una cánula de inyección a través de la cánula guía con el fin de limpiarla y evitar obstrucciones, consiguiendo así la habituación del animal a la inyección intracerebroventricular (icv).

2.3 Pruebas de comportamiento animal.

2.3.1 Test del campo abierto.

El test del campo abierto, en inglés Open Field Test (OFT), se realiza en un aparato (DZsur S.L) de superficie cuadrada de 100 cm x 100 cm y de 50 cm de altura. El objetivo de esta prueba es analizar la actividad exploratoria espontánea desarrollada por el animal en el interior del campo abierto. Para realizar el test, se coloca al animal de forma individual en el centro del campo abierto y se deja que explore libremente durante cinco minutos. La prueba es grabada a través de una videocámara situada sobre el campo abierto.



Figura 2: Test del Campo Abierto.

Mediante el programa informático Ethovision XT (Noldus, S.L.) se delimitan las diferentes zonas de análisis: *Zona 1*: Corresponde a la zona exterior del campo abierto; *Zona 2*: Corresponde a la zona interior o centro del campo abierto; *Arena*: Corresponde a la suma de la zona exterior y la zona interior.

Los parámetros utilizados para evaluar la actividad del animal son: Número de entradas en la zona interior o centro; Tiempo de permanencia en la zona interior (segundos); Distancia total recorrida en la arena (cm); Velocidad media en la arena (cm/seg). Distancia y velocidad son parámetros de actividad locomotora. El aumento en el número de entradas, así como del tiempo de permanencia del animal en la zona interior se correlacionan con un mayor efecto ansiolítico.

2.3.2 Test del laberinto elevado en cruz.

El test de laberinto elevado en cruz, Elevated Plus Maze (EPM), es una de las pruebas más ampliamente utilizadas para la evaluación de ansiedad incondicionada.

El EPM se realiza en una estructura de plástico formada por cuatro brazos perpendiculares de dimensiones iguales, dos de ellos son denominados brazos abiertos (42.5 cm x 15 cm) y los otros dos son denominados brazos cerrados (42.5 cm x 15cm x 40 cm), de forma que los brazos de cada tipo son opuestos uno al otro y permanecen conectados por una plataforma central (15 cm x 15 cm). El laberinto se encuentra elevado sobre el suelo 100 cm. El registro conductual consiste en analizar la actividad espontánea desarrollada por el animal en el laberinto elevado en cruz.

Para realizar el test, se coloca al animal de forma individual en el centro del laberinto, enfocando la cabeza hacia un brazo abierto y dejando que explore libremente durante cinco minutos. La prueba es grabada a través de una videocámara colocada encima del laberinto.

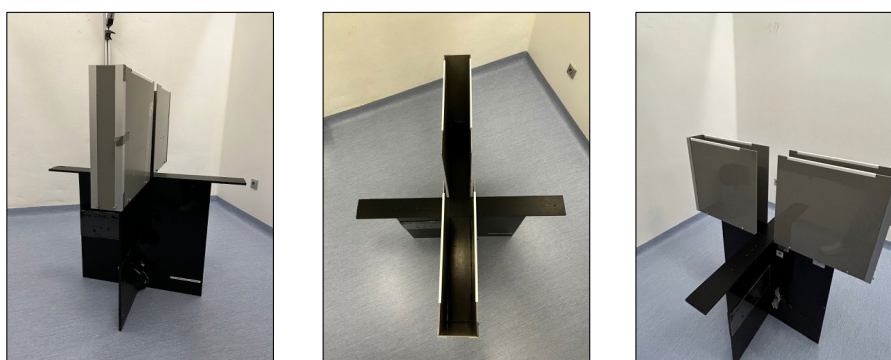


Figura 3. Aparato del laberinto elevado en cruz

Mediante el programa informático Ethovision XT (Noldus, S.L.) se delimitan las diferentes zonas de análisis: *Zona 1*: Corresponde a los brazos cerrados; *Zona 2*: Corresponde a los brazos abiertos; *Zona 3*: Corresponde a la zona central; *Arena*: Corresponde a la suma de las tres zonas anteriores.

Los parámetros a evaluar en esta prueba son los siguientes: Porcentaje de entradas en los brazos abiertos [$\text{Entrada brazos abiertos} / \text{Entradas (brazos abiertos + cerrados)} \times 100$]; Porcentaje de tiempo en los brazos abiertos [$\text{Tiempo brazos abiertos} / \text{Tiempo (brazos abiertos + cerrados)} \times 100$]; Velocidad media total (cm/seg) y Distancia recorrida total (cm). El aumento del porcentaje de entradas como del porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos se correlacionan con un mayor efecto ansiolítico.

2.3.3 Test de Natación Forzada.

En inglés, Forced Swimming Test (FST), es la prueba de comportamiento más ampliamente usada para la evaluación de la desesperanza, rango característico de la depresión, en modelos animales, así como para la evaluación de la eficacia en modelos preclínicos de los antidepresivos (Porsolt et al., 1977; Detke and Lucki, 1996; Bogdanova et al., 2013).

En el FST se utiliza un tubo de metacrilato de 50 cm de altura y 20 cm de diámetro que se llena de agua corriente a una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ (Detke and Lucki, 1996). La prueba se realiza en dos sesiones: En la primera sesión, también conocida como pre- test, los animales, de forma individual, se introducen en el agua dejándoles nadar de forma libre durante 15 minutos. 24 horas después se realiza la segunda sesión o test, donde los animales se introducen nuevamente en el agua en las mismas condiciones que durante el pre- test, pero esta vez con una duración de 5 minutos (Porsolt et al., 1977). En el test, la actividad de los animales es registrada con una videocámara durante el período que dura la prueba. La realización de la prueba se convierte en una fuente de estrés para los animales, lo que hace que adopten comportamientos pasivos que indican niveles de desesperanza (West et al., 1990).



Figura 4: Se representan las conductas de inmovilidad a la izquierda y swimming a la derecha en el FST. Ilustración gráfica creada con el programa Biorender.

La conducta del animal es analizada de forma manual por el investigador mediante el programa informático Raton Time 1.0 (Luis N. Coll, Fixma SL). Las conductas que se analizan son las siguientes (Kuteeva et al., 2007):

- Inmovilidad: El animal permanece fundamentalmente inmóvil, realizando sólo los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua.
- Natación: El animal nada de forma moderada moviendo las cuatro patas, con movimientos horizontales o bucea.
- Escalada: El animal realiza movimientos vigorosos de forma vertical, habitualmente contra las paredes del tubo.

Un aumento en el tiempo de inmovilidad y una disminución en el tiempo de escalada está asociado con efectos prodepresivos. Por el contrario, la disminución en el tiempo de inmovilidad y/o el aumento en el tiempo de natación y escalada se asocia con efectos antidepresivos (Porlsot et al., 1977; Kuteeva et al., 2007; Bogdanova et al., 2013).

2.3.4 Test de Suspensión de la Cola.

En el Test de Suspensión de la Cola o Tail Suspension Test (TST), se evalúan conductas depresivas y antidepresivas en roedores, evitando los problemas de hipotermia y estrés que se producen en el FST (Porsolt et al., 1977). Esta prueba, al igual que el FST, tiene su fundamento en la conducta de indefensión aprendida, en el que los animales, frente a una situación estresante y sin escapatoria, adoptan comportamientos pasivos, semejantes a la desesperanza (Steru et al., 1985; Chermat et al., 1986).

Este test consta de un aparato 60 cm de alto, 84.5 cm de ancho y 39 cm de profundidad, donde sujetamos con una cuerda y cinta adhesiva la cola de los animales a una armella a 55 cm altura.



Figura 5: Test de suspensión de la cola. Animal completamente inmóvil (izquierda). Animal intentando alcanzarse la cola (derecha); Modificado de Abelaira et al., 2013.

De forma individual, se grabó el comportamiento de los animales durante seis minutos con una videocámara y, posteriormente, los videos se analizaron de forma manual por el investigador mediante el programa informático Raton Time 1.0 (Luis N. Coll, Fixma SL).

Durante la prueba, las conductas que se analizan son inmovilidad y movilidad. Cuando el animal no realiza ningún tipo de movimiento de lucha o intento de morder la cinta adhesiva es considerado conducta de inmovilidad (Hinojosa et al., 2006; Yan et al., 2014). El incremento en el tiempo de inmovilidad en esta prueba se correlaciona con efectos pro-depresivos (Steru et al., 1985; Chermat et al., 1986).

2.3.5 Test de Preferencia de Sacarosa.

La Prueba de Preferencia de Sacarosa o Sucrose Preference Test (SPT), es una prueba utilizada para la evaluación de la anhedonia, la cual constituye uno de los síntomas centrales de la depresión (Marco et al., 2017, Höflich et al., 2019, Markov et al., 2022). Esta prueba evalúa la preferencia del animal hacia un reforzador natural, como es la sacarosa. Para ello, en primer lugar, se habitúan a los animales al consumo de sacarosa, colocando un biberón de sacarosa al 1% y un biberón de agua corriente en las jaulas de los animales durante tres días. La ingesta de agua y solución de sacarosa se miden diariamente, alternando las posiciones de las dos botellas para evitar preferencias de lugar. Al término del tercer día, los animales permanecen en privación de líquidos durante 18 horas. El día del test se colocan de nuevo ambos biberones y se evalúa el consumo tanto de agua como de sacarosa al 1% a las 2 horas y a las 24 horas (Millón et al., 2019a). Durante el procedimiento, las estimaciones de derrame de líquidos se calculan utilizando como control una jaula vacía con dos botellas, una de agua y la otra de sacarosa al 1%. Los parámetros que se analizan son los siguientes: Consumo de Agua (g/Kg); Consumo de Sacarosa 1% (g/Kg); Preferencia por la Sacarosa [$\text{Consumo de Sacarosa} / \text{Consumo total de fluidos (agua + sacarosa)} \times 100$]; Fluido total (Consumo de agua + Consumo de Sacarosa). Niveles bajos tanto en el consumo como en la preferencia de sacarosa correlacionan con una mayor anhedonia y viceversa.

2.3.6 Prueba de autoadministración.

Las pruebas de autoadministración han sido ampliamente utilizadas para el estudio de la motivación por las drogas de abuso. La prueba de autoadministración es un modelo de condicionamiento operante, basado en la entrega de un refuerzo positivo o recompensa (como puede ser el alcohol) de manera contingente a la finalización de una determinada tarea (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006; Calleja-Conde et al., 2023). De esta forma, el animal vincula la realización de una conducta con la obtención de una recompensa (Yahyavi-Firouz-Abadi and See, 2009).

Las cajas operantes son el aparato más comúnmente utilizado para llevar a cabo un procedimiento de autoadministración de sustancias. En este estudio se han utilizado las cajas operantes de autoadministración de la empresa Panlab (Barcelona, España). Estas cajas se componen de diferentes módulos que, en función de nuestro objetivo de estudio, permiten configurar la obtención de refuerzos y estímulos discriminativos en respuesta a una determinada acción (Yahyavi-Firouz-Abadi and See, 2009).

Las cajas de autoadministración utilizadas en este trabajo de investigación constan de:

- Palanca activa. Corresponde a la palanca que está vinculada a la entrega de una recompensa. Está situada en la parte derecha de la caja.
- Palanca inactiva. Corresponde a la palanca que no está vinculada a la entrega de una recompensa. Carece de consecuencias programadas. Está situada en la parte izquierda de la caja.

- Luz. Estímulo discriminativo asociado a la entrega de la recompensa.
- Dispensador de líquidos. Presenta la recompensa obtenida tras pulsar la palanca activa. El volumen de la sustancia es de 0.1 mL.

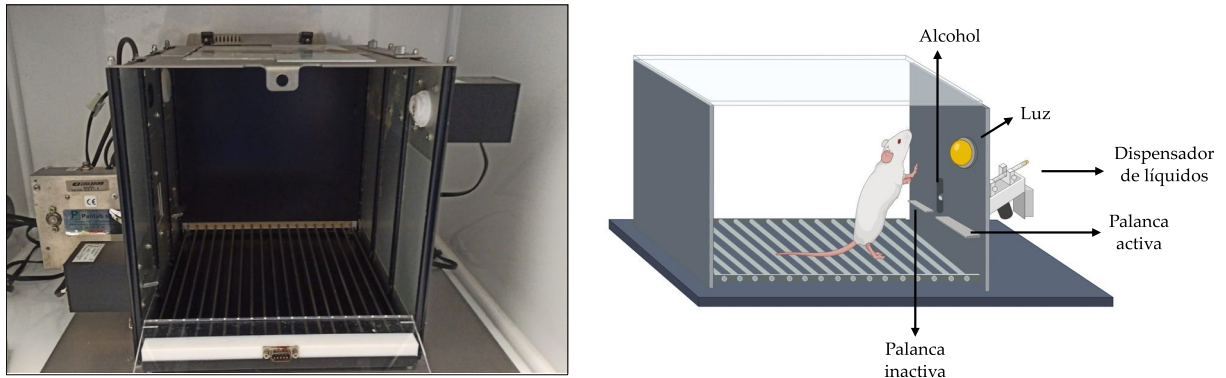


Figura 6. Caja de autoadministración operante (imagen 1). Representación gráfica de los componentes de la caja de autoadministración (imagen 2; ilustración creada con el programa Biorender).

En la presente tesis doctoral se han utilizado programas de razón fija, donde el refuerzo se entrega cada vez que se complete un número determinado de respuestas y programas de razón variable, donde el número de respuestas necesarias para obtener el refuerzo es variable (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006; Calleja-Conde et al., 2023). Los programas de razón fija utilizados en este trabajo son los siguientes:

- Ratio Fijo 1 (FR1). Para conseguir un refuerzo, es necesario pulsar la palanca activa una vez.
- Ratio Fijo 3 (FR3). Para conseguir un refuerzo es necesario pulsar la palanca activa tres veces consecutivas.

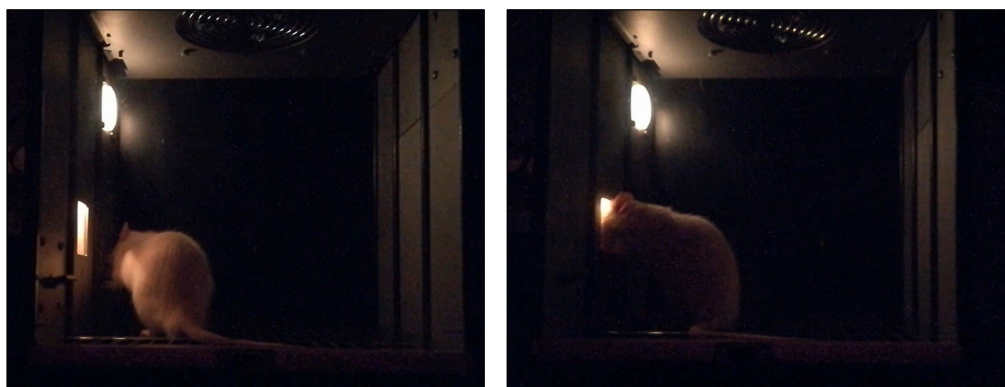


Figura 7. Imágenes tomadas durante una sesión de autoadministración de alcohol. Imagen de una rata pulsando la palanca activa para recibir una recompensa (imagen de la izquierda). Imagen de una rata bebiendo la recompensa obtenida (imagen de la derecha).

Las cajas de autoadministración están conectadas en serie unas a otras, y a su vez, están conectadas a un ordenador que contiene el software informático necesario para su funcionamiento. El programa informático utilizado para la elaboración de protocolos experimentales, recuento y análisis de datos es Packwin 2.0 RS (PanLab, Barcelona, España). Los parámetros que se analizan en la prueba de autoadministración son los siguientes:

- Pulsaciones palanca activa (PA). Corresponde al número de veces que el animal presiona la palanca activa.
- Pulsaciones palanca inactiva (PI). Corresponde al número de veces que el animal presiona la palanca inactiva. El indicador de PI es un índice de discriminación entre pulsaciones a la palanca activa y pulsaciones a la palanca inactiva.
- Número de Refuerzos (NR). Corresponde al número total de refuerzos que el animal ha obtenido durante la sesión de autoadministración.

2.3.6.1 Autoadministración de sacarina.

El protocolo realizado en el presente estudio para la prueba de autoadministración de sacarina ha sido el siguiente (Millón et al., 2019a):

Dos días previos al inicio del entrenamiento en autoadministración, los animales tuvieron restricción de agua durante 1-2 días para facilitar el aprendizaje en las cajas operantes. Los animales se entrenaron para autoadministrarse sacarina al 0.2% en un Ratio Fijo (FR1) en sesiones de 30 minutos diarias de lunes a viernes. Al pulsar la palanca activa se enciende una luz asociada con la entrega del refuerzo, el cual estará disponible 3 segundos. El entrenamiento en autoadministración continuó hasta que los animales tuvieron un consumo estable de sacarina al 0.2%. El programa informático Packwin 2.0 RS (PanLab, Barcelona, España) registró el número de veces que los animales presionaron tanto la palanca activa como la inactiva, así como el número de refuerzos. Un menor número de refuerzos correlaciona con una mayor anhedonia y viceversa.

2.3.6.2 Autoadministración de alcohol.

En los procedimientos de autoadministración de alcohol se han llevado a cabo distintos protocolos que se exponen a continuación.

- Protocolo de entrenamiento en autoadministración de alcohol al 10%.

Para favorecer la adquisición de alcohol al 10%, en algunos objetivos experimentales del presente estudio, se ha utilizado un modelo de consumo intermitente de dos biberones previo al entrenamiento en las cajas de autoadministración. Este modelo consiste en colocar durante tres días alternativos a la semana un biberón con sacarina 0.2% + alcohol 10% y un biberón de agua corriente en las jaulas de los animales durante 24 horas, alternando las posiciones de las dos botellas para evitar preferencias de lugar (Lebourgeois et al., 2018 modificado).

Días previos a la prueba de autoadministración, los animales son sometidos a un programa de restricción de agua durante 1 o 2 días para facilitar el entrenamiento de presión de palanca. Las ratas se entrenaron para autoadministrarse alcohol al 10%. Se sigue un programa de Ratio Fijo FR1, en el cual, cada vez que el animal pulse la palanca activa una vez, se encenderá una luz y se obtendrá 0.1 mL de solución, estando este refuerzo disponible durante 3 segundos. Presionar la palanca inactiva no se asociará con la obtención de ninguna recompensa. Las sesiones de autoadministración se realizan diariamente de lunes a viernes durante aproximadamente tres semanas, con una duración de 30 minutos.

Para facilitar el entrenamiento en autoadministración de alcohol al 10% se han seguido dos tipos de desvanecimientos o fading:

Desvanecimiento 1. El porcentaje de sacarina va disminuyendo mientras que el porcentaje de alcohol va aumentando a lo largo de las sesiones (Alén et al., 2019):

- Sacarina 0.16% y alcohol 2%: 3 sesiones
- Sacarina 0.12% y alcohol 4%: 3 sesiones
- Sacarina 0.08% y alcohol 6%: 5 sesiones
- Sacarina 0.04% y alcohol 8%: 5 sesiones
- Sacarina 0.02% y alcohol 10%: 3 sesiones
- Alcohol 10%: Hasta estabilización

Desvanecimiento 2: El porcentaje de sacarina va disminuyendo mientras que el porcentaje de alcohol se mantiene a lo largo de las sesiones.

- Sacarina 0.2% y alcohol 10%: 3 sesiones
- Sacarina 0.16% y alcohol 10%: 3 sesiones
- Sacarina 0.12% y alcohol 10%: 5 sesiones
- Sacarina 0.08% y alcohol 10%: 5 sesiones
- Sacarina 0.04% y alcohol 10%: 3 sesiones
- Alcohol 10%: Hasta estabilización

En los experimentos en los que se usó el modelo de cepa alcohólico (cepa msP), no se necesitó ningún tipo de desvanecimiento previo al entrenamiento en autoadministración de alcohol debido a su alta preferencia por esta sustancia (como se detallará más adelante en el apartado de grupos experimentales).

- **Protocolo para la evaluación de la motivación por el alcohol: Ratio Progresivo.**

En este protocolo se evalúa el número máximo de respuestas que es capaz de realizar el animal para obtener un solo refuerzo. Esto se conoce como punto de ruptura o *Breaking Point*, evaluando así la motivación del animal por obtener una recompensa. El número de veces para alcanzar el refuerzo se verá aumentado de manera lineal (1,2,3,4,5,etc) (Wilson et al., 2018). Los animales son entrenados en las cajas de autoadministración bajo un programa de proporción fija FR1 y, posteriormente, en un programa FR3 durante aproximadamente cinco semanas hasta conseguir un nivel estable de alcohol al 10% (Alaux-Cantin et al., 2013). Posteriormente, se evalúa la motivación del animal durante una hora con el test Ratio Progresivo.

- **Protocolo de recaída alcohólica por contexto**

EXTINCIÓN ALCOHÓLICA

Para la evaluación de la recaída alcohólica primero es necesario extinguir la conducta aprendida, es decir, que no aparezcan las consecuencias esperadas tras la realización de una determinada conducta. En este caso además de extinguir la conducta de la búsqueda de alcohol se pretendió que la recaída estuviera asociada al contexto donde se aprendió que la realización de la conducta de pulsar la palanca activa estaba asociada con la obtención de una recompensa (alcohol). Este contexto es denominado contexto A.

El protocolo de extinción consistió en un cambio de contexto, contexto B, donde el suelo de rejilla se sustituyó por un suelo de plástico liso. Además, cuando el animal pulsara la palanca activa, no se obtendrían consecuencias, es decir, no se encendería la luz ni estaría disponible la recompensa de alcohol al 10% (Lebourgeois et al., 2018, Wilson et al., 2018). Este protocolo se mantuvo diariamente durante una hora hasta que los animales alcanzaron dos sesiones consecutivas con un número de pulsaciones a la palanca activa inferior al 20% de la línea base de cada animal (Lebourgeois et al., 2018). Una vez que todos los animales extinguieron la conducta, ya estaban listos para poder realizar el test de recaída alcohólica.

RECAÍDA ALCOHÓLICA

Una vez alcanzando el criterio de extinción en el contexto B, este protocolo de recaída alcohólica vuelve a reinstaurar los valores iniciales de manera que se reestablecen las consecuencias programadas (alcohol al 10%) asociadas a estímulos discriminativos (luz, rejilla) tras la realización de la tarea (pulsar la palanca activa) en un programa de Ratio Fijo FR1 en el contexto donde los animales aprendieron inicialmente la tarea (contexto A). El protocolo de recaída alcohólica tiene una duración de una hora.

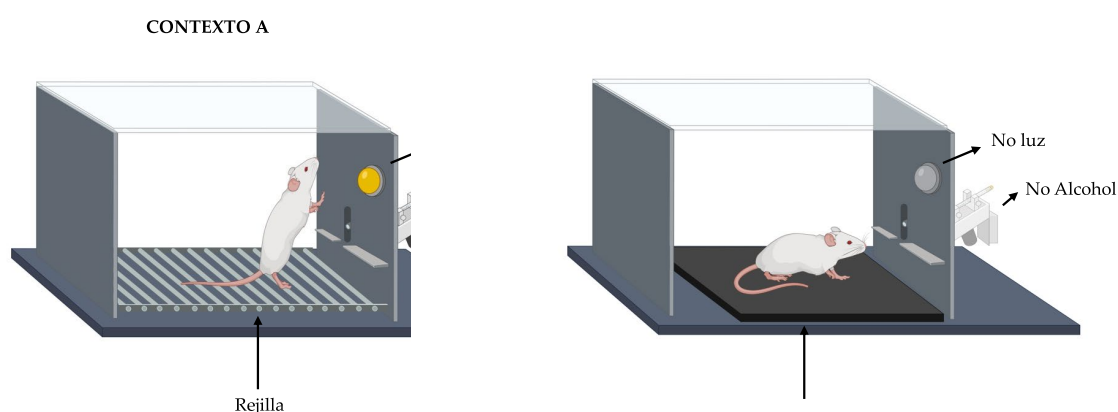


Figura 8. Ilustración creada con el programa Biorender sobre el contexto A y contexto B en extinción y recaída alcohólica.

2.4 Obtención y procesamiento del tejido cerebral.

En el presente estudio se realizaron una serie de procedimientos para el procesamiento del material biológico obtenido de los diferentes estudios experimentales. Para ello, el tejido cerebral se procesó de distintas formas en función de las técnicas a utilizar:

- **Tejido cerebral sin fijar.** La extracción de tejido cerebral sin fijar o fresco se ha realizado para el desarrollo de la técnica de q-PCR. Para ello, con la ayuda de una guillotina (Leica, Wetzlar, Alemania) los animales se sacrifican rápidamente por decapitación. Los cerebros extraídos se sumergieron en isopentano a -40°C enfriados con nieve carbónica para evitar la formación de cristales de hielo. Los cerebros se etiquetaron y se almacenaron en un congelador a -80°C hasta su posterior procesamiento.
- **Tejido cerebral fijado.** Este tipo de tejido se ha utilizado para los experimentos inmunohistoquímicos de este estudio. Para obtener este tipo de tejido, el animal se sacrificó mediante perfusión cardíaca, procedimiento que se explica a continuación.

2.4.1 Perfusión intracardíaca.

Para la perfusión cardíaca, los animales se anestesiaron de forma intraperitoneal con Dolethal (Pentobarbital sódico) (FarmaHigiene S.L., Fuente Alamo, Murcia) a una concentración de 50 mg/Kg. Una vez comprobada la ausencia de reflejos del animal, se coloca dentro de una campana de extracción adecuada para absorber los líquidos y vapores derivados del procedimiento.

Las extremidades del animal se fijaron con cinta adhesiva a la rejilla dentro de la campana y se realizó una incisión para separar la piel a lo largo del esternón, dejando expuesto el corazón con una toracotomía. Se inyectó 0.1 mL de heparina al 5% (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) en el ventrículo izquierdo del corazón para evitar posibles coágulos. Mediante un pequeño corte en el ventrículo izquierdo, se introdujo una cánula conectada a una bomba de perfusión (Masterflex, modelo 7518. Cole Palmer Instrument, EEUU) hasta el principio de la aorta. Con la ayuda de unas pinzas fórceps, se fijaron la cánula y el corazón para facilitar el procedimiento. Posteriormente y de forma simultánea se accionó la bomba de perfusión y se accionó el circuito mediante un corte en la aurícula derecha permitiendo la salida de líquidos. En un primer lugar, se pasan 300 mL de una solución de líquido de lavado: PBS 0.1M a pH 7.4 cuya composición es de 17.8gr/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2gr/L de NaH_2PO_4 2gr/L y 9gr/L de NaCl. Posteriormente, se añaden 300 mL del líquido de perfusión, Paraformaldehído (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1M pH 7.4 (PAF 4%).

Llevada a cabo la perfusión, los cerebros se extrajeron y se sumergieron en la solución fijadora durante 12-16 horas a 4º C. Finalizado este tiempo, el tejido se sumergió en una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1M durante 24 - 48 horas a 4º C para su criopreservación. Finalmente, el tejido fue congelado usando isopentano a -40º C y almacenado en un congelador a -80º C hasta su posterior procesamiento.

2.4.2 Procesamiento del tejido cerebral perfundido.

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron con secciones coronales de cerebro de rata fijado con Paraformaldehído 4% utilizando como guía el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1997). Las secciones tuvieron un grosor de 30 μm y se obtuvieron en un criostato HM 550 (Microm International GmbH, Dreieich, Alemania) con temperatura constante de -20°C .

Previo a la realización de los cortes, los cerebros se atemperaron en un congelador a -20°C . Posteriormente, mediante una resina especial Tissue-Tek® (Sakura, Leiden, Holanda), los cerebros se fijaron a un soporte del criostato que permitió que las secciones tisulares se realizaran perpendiculares a un plano rostro-caudal. Los cortes de tejido se depositaron en placas de 24 pocillos, con un 1 mL cada uno de la solución Hoffman, cuya composición es la siguiente: 250 mL de Tampón fosfato (PB) 0.4M, 300 mL de Etilenglicol (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU), 300 gr de sacarosa (Panreac Química S.A., Barcelona, España), 10 gr de Polovinilpirrolidona (Sigma- Aldrich, San Luis, EEUU) y 9 gr de NaCl (Panreac Química S.A., Barcelona, España), quedando la solución tamponada en PBS 0.1M para 1 litro de solución.

2.4.3 Procesamiento del tejido cerebral fresco.

Para la realización de la técnica experimental q-PCR se utilizaron cerebros frescos obtenidos mediante decapitación. Los cerebros se cortaron inicialmente en una matriz cerebral de 1 mm bajo una temperatura de -20°C , para la obtención de cortes coronales. Posteriormente, utilizando un dispositivo de perforación (sacabocados) con un diámetro interno de 2 mm, se diseccionaron las áreas de interés.

Para el análisis del área tegmental ventral (ATV), se obtuvo una sección coronal de cerebro de 1 mm de bregma -6.04 mm. Para el estudio del núcleo accumbens (NAc), se realizaron dos cortes coronales consecutivos de 1 mm correspondientes a un bregma aproximado de +1.2 mm. Para el estudio de la corteza prefrontal (CPF) se realizaron dos cortes coronales consecutivos de 1 mm correspondientes a un bregma aproximado de +3.20 mm. Las áreas bilaterales de ATV, NAc y CPF se recogieron en tubos Eppendorf, almacenándose a -20º C hasta su posterior análisis (García-Pérez et al., 2016).

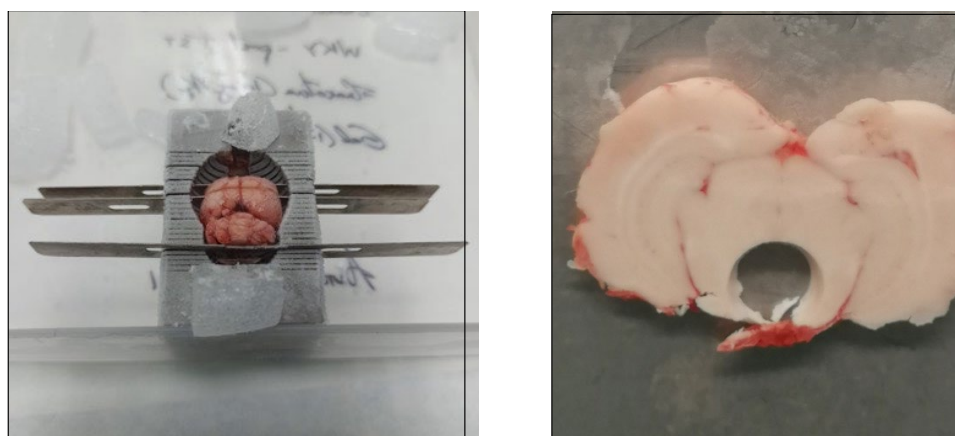


Figura 9. Imagen de un cerebro fresco en la matriz cerebral (izquierda). Imagen de un corte de cerebro con punción en ATV (derecha).

2.4.4 Técnicas Inmunohistoquímicas.

Para las técnicas inmunohistoquímicas, se han utilizado cerebros perfundidos de animales bajo distintos tratamientos. Todas las inmunohistoquímicas de este estudio han sido realizadas con secciones en suspensión (free-floating) para facilitar la penetración de los anticuerpos en el tejido. Las secciones procedentes de cada animal y de su grupo experimental correspondiente se procesaron simultáneamente.

2.4.4.1 Inmunohistoquímica simple.

- Inmunohistoquímica simple de C-Fos

Las secciones y tampones se atemperaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. En primer lugar, las secciones se pasaron de la placa de 24 pocillos a tubos de plástico que contenían PBS (solución salina tamponada con fosfato) 0.01 M (pH 7.4) y se realizaron dos lavados de 5 minutos en agitación continua. La actividad de la peroxidasa endógena se eliminó incubando las secciones con H₂O₂ al 10% y metanol al 10% durante 30 minutos en oscuridad. Se realizaron dos lavados más de 10 minutos con PBS y una incubación de 10 minutos con una dilución de Tritón X-100 al 0.5 % y albúmina de suero bovino al 0.2 % (Sigma, España) en PBS (PBS*). Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti C-Fos (1/200) producido en ratón (sc-271243, Santa Cruz Biotech, EEUU). La incubación de los cortes se prolongó toda la noche a temperatura ambiente en agitación muy suave.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados en PBS y un lavado en PBS* y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario, Goat Anti-Mouse biotinilado (Dako E 0433) (1/600) durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados más de 10 minutos en PBS y un lavado en PBS* de 10 minutos. Los cortes se incubaron con estreptavidina peroxidasa (SIGMA E2886) (1/1000) en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en PBS, se realizó el revelado añadiendo a cada tubo una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB) al 0.05% (Sigma, España), intensificado con 0.02 gr de cloruro de níquel hexahidratado (Sigma, España) en PBS 0.01 M añadiendo H₂O₂ antes de relevar, dando una tinción de núcleos de color negro más oscuro.

Esta reacción fue mantenida durante 10 minutos y tras añadir 2 mL de PBS, se detuvo. La omisión del anticuerpo primario dio como resultado una tinción no detectable, siendo usado como control negativo de la inmunohistoquímica. Después de montar las secciones en portaobjetos superfrost plus (Fisher Scientific), las secciones se deshidrataron y cubrieron con DPX (Panreac, Barcelona, España).

- Inmunohistoquímica simple de pCREB

Tras atemperar y seleccionar los cortes, se realizó la recuperación de epítomos: el tejido de la placa Hoffman se pasó a tubos con tampón citrato (Ácido Cítrico 10mM en H₂O_d pH6) en baño a 70°C durante 30 minutos. Se eliminó la actividad de peroxidasa endógena incubando las secciones con H₂O₂ al 10% y metanol al 10% durante 30 minutos en oscuridad. Se realizaron dos lavados más de 10 minutos con PBS y una incubación de 10 minutos con una dilución de Tritón X-100 al 0.5 % y albúmina de suero bovino al 0.2 % (Sigma, España) en PBS (PBS*). Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-CREB (1/500) generado en conejo (Milipore 06-519, EEUU). La incubación de los cortes se prolongó toda la noche a temperatura ambiente en agitación muy suave.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados en PBS y un lavado en PBS* y los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-Rabbit biotinilado (Amersham, RPN 1004) (1/200) durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados de 10 minutos en PBS y un lavado en PBS* de 10 minutos. Los cortes se incubaron con estreptavidina peroxidasa (SIGMA E2886) (1/1000) en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente.

Tras 3 lavados en PBS, se realizó el revelado añadiendo a cada tubo 500 μ l de una solución de DAB al 0.05% (Sigma, España), intensificado con 0.02 gr de cloruro de níquel hexahidratado (Sigma, España) en PBS 0.01 M añadiendo 100 μ l de H₂O₂ antes de relevar, dando una tinción de núcleos de color negro más oscuro. Esta reacción fue mantenida durante 3 minutos y tras añadir 2 mL de PBS, se detuvo. Después de montar las secciones en portaobjetos superfrost plus (Fisher Scientific), las secciones se deshidrataron y cubrieron con DPX (Panreac, Barcelona, España).

2.4.4.2 Inmunohistoquímica doble.

Se han realizado inmunohistoquímicas dobles de 5-hidroxitriptamina (5-HT)/C-Fos para estudiar la activación de células serotoninérgicas específicas en rafe dorsal (RD) e inmunohistoquímicas dobles de tirosina hidroxilasa (TH)/C-Fos para estudiar la activación de células dopaminérgicas específicas en el ATV. El procedimiento seguido para la realización de la inmunohistoquímica doble ha sido el utilizado para la inmunohistoquímica simple de C-Fos, explicado anteriormente, seguido de los protocolos que se describen a continuación:

- Inmunohistoquímica doble C-Fos/5-HT

Tras el revelado del anticuerpo C-Fos, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y un lavado de 10 minutos de Borax 1% en PBS 0.2%. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 10 minutos en TBS (solución salina taponada de Tris) y un lavado en TBS* (Tritón X100 0.2% + BSA 2%) de 10 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-5-HT producido en conejo (20080, INCSTAR, EEUU) (1/20000) durante 1h en agitación a temperatura ambiente. Los cortes con el anticuerpo se dejaron toda la noche a 4° C en la nevera.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS y un lavado en TBS* de 10 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario Donkey Anti-Rabbit biotinilado (Amersham, RPN 1004) (1/200) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados en TBS de 10 minutos y un lavado de 10 minutos en TBS* para incubar con estreptavidina peroxidasa (SIGMA E2886) (1/1000) en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en TBS y un lavado en TRIS-HCL, se realizó el revelado añadiendo a cada tubo 500 µl de DAB al 0.05% (Sigma, España) en TRIS-HCL añadiendo 100 µl de H₂O₂ antes de relevar, obteniéndose una marca citoplasmática de color marrón. Esta reacción fue mantenida durante 13 minutos y tras añadir 2 mL de TBS, se detuvo. Después de montar las secciones en portaobjetos superfrost plus (Fisher Scientific), las secciones se deshidrataron y cubrieron con DPX (Panreac, Barcelona, España).

- Inmunohistoquímica doble C-Fos/TH

Se realizaron 3 lavados en PBS durante 10 minutos y un lavado de 10 minutos en PBS*. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-TH generado en ratón (T1299, Sigma, EEUU) (1/2500) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes con el anticuerpo se dejaron toda la noche a 4º C en la nevera.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y un lavado en PBS* de 10 minutos. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse biotinilado (Dako E 0433) (1/600) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados en PBS de 10 minutos y un lavado de 10 minutos en PBS* para incubar con estreptavidina peroxidasa (SIGMA E2886) (1/1000) en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente.

Tras 3 lavados en PBS se realizó el revelado añadiendo a cada tubo 500 µl de DAB al 0.05% (Sigma, España) en PBS 0.01M añadiendo 100 µl de H₂O₂ antes de revelar, dando como resultado una marca citoplasmática de color marrón. Esta reacción fue mantenida durante 6 minutos y tras añadir 2 mL de PBS, se detuvo. Después de montar las secciones en portaobjetos superfrost plus (Fisher Scientific), las secciones se deshidrataron y cubrieron con DPX (Panreac, Barcelona, España).

En ambas inmunohistoquímicas dobles se empleó en primer lugar el cromógeno DAB intensificado con 0.02 gr de cloruro de níquel hexahidratado para el revelado del anticuerpo C-Fos obteniendo una marca nuclear de color negro. Además, se utilizó el cromógeno DAB para el revelado de los anticuerpos 5-HT y TH dando lugar a una marca citoplasmática de color marrón. El uso de los dos cromógenos, DAB + cloruro de níquel y DAB permite diferenciar ambas marcas, nuclear y citoplasmática en las mismas áreas cerebrales, permitiendo distinguir entre el anticuerpo C-Fos y los anticuerpos 5-HT, así como TH.

2.4.4.3 Análisis de las técnicas inmunohistoquímicas.

En las inmunohistoquímicas simples, las imágenes se tomaron con un microscopio Olympus VS120 con un objetivo PLAN AP 10x. Las áreas de interés se recortan manualmente siguiendo el atlas de Paxinos y se les aplica un filtro gaussiano. Se utiliza una función Find_Maxima que localiza las marcas de C-Fos y de pCREB para la imagen resultante con el programa FIJI (Schindelin et al., 2012).

En las inmunohistoquímicas dobles, las imágenes se toman con el microscopio Olympus VS120 con un objetivo PLAN AP 10x. Las áreas de interés se recortan siguiendo el atlas de Paxinos y se cuentan manualmente las marcas dobles de C-Fos/5HT, así como las marcas dobles de C-Fos/TH con la herramienta contador de células del programa FIJI (Schindelin et al., 2012). El procedimiento llevado para el análisis de las inmunohistoquímicas doble fue el que sigue a continuación: desde el programa FIJI se seleccionó la imagen previamente recortada del área de interés y se accedió a la herramienta “Cell Counter”. A continuación, con un clic se seleccionó cada célula doble observada para su conteo, actualizándose el contador con cada clic realizado y obteniendo finalmente un número total de células dobles en el área cerebral seleccionada.

2.4.5 rt-qPCR.

En la presente tesis doctoral se han analizado los niveles de expresión de ARN de los siguientes genes: C-Fos, receptores de dopamina (D1, D2, D3, D5), transportadores de dopamina (DAT, Vmat2), receptores GALR1 y GALR2 y el receptor 5-HT1A. La expresión de estos genes se ha analizado en los núcleos cerebrales ATV, NAc y CPF. Los transportadores de dopamina DAT y Vmat2 sólo se han analizado en el ATV.

La extracción de ARN se realizó de forma manual. En primer lugar, se añadieron 250 µL de Qiazol al tejido hasta romperlo con el sonicador con pulsos (Ciclo 0.5; Amplitud 60) hasta no observar tejido. Seguidamente, se añadieron otros 500 µL de Qiazol y se centrifugó a 13000 rpm 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se añadió a otro tubo y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µL de cloroformo para separar ARN, ADN y Proteínas, se agitó vigorosamente 15 segundos en el vórtex y se dejó incubar 2-3 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, el tejido se centrifugó durante 15 min a 4°C en 13000 rpm. El sobrenadante se añadió a un tubo nuevo. Tras la centrifugación se obtuvieron tres fases, el sobrenadante (contiene ARN), una interfase (contiene DNA) y la última fase que contiene proteínas.

Después se añadieron 500 µL de Isopropanol (2-propanol) para precipitar el material genético y se incubó 10 min a temperatura ambiente. El tejido se centrifugó durante 10 min a 4° C y se descartó el sobrenadante con cuidado. Se realizó la siguiente secuencia de lavado 3 veces: 500 µL de etanol 75% y posterior centrifugación a 11000 rpm durante 5' a 4° C con descarte de sobrenadante. Finalmente se dejó secar el precipitado durante 15 min en una estufa a 60°C. Se añadieron 20-25 µL de agua libre de RNAsas y se vortió hasta su resuspensión total. Las muestras se hidrataron durante 10 min en una estufa a 60°C y se alicuotaron en eppendorfs para su posterior cuantificación en nonodrop one (Thermo Scientific, Waltham, EEUU), con ratio 240/260 para ver la pureza del ARN.

Posteriormente, generamos el cDNA utilizando el kit de retrotranscripción Reverse Transcriptase Core kit (Eurogentec, Lieja, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante y con un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystem, California, EEUU) programado con la siguiente secuencia de tiempos y temperaturas: 10 minutos a 25° C para la hibridación de las sondas, 30 minutos a 48° C para la actuación de la transcriptasa y 5 minutos a 95° C para la inactivación enzimática.

La rt-qPCR se realizó en un termociclador Roche LightCycler 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) disponible en los servicios centralizados de apoyo a la investigación de la Universidad de Málaga. En placas de 96 pocillos medimos por triplicado los niveles de expresión en cada muestra biológica del ARN mensajero, usando GAPDH como gen de referencia. La cantidad inicial de cDNA por pocillo fue de 40 ng y el volumen final de 20 μ l. Empleamos el kit comercial FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para detectar los niveles de amplificación del cDNA en cada ciclo de la PCR.

El protocolo de amplificación fue el siguiente: 2 minutos a 50° C y 10 minutos a 95° C. 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C. Al terminar los 40 ciclos se obtuvo una curva de fusión (melting) para comprobar que la presencia de un solo producto de amplificación por pocillo y que la temperatura de fusión de los productos amplificados, correspondían a la temperatura teórica del fragmento de cDNA amplificado. En cada placa también se colocaron dos tipos de controles. Un control sin cDNA para descartar contaminaciones del kit Master Mix y posibles emparejamientos no deseados de los primers, y un control con muestras de ARN previas al paso de retrotranscripción para descartar la contaminación de ADN genómico.

Los datos se analizaron con el programa informático LightCycler 96 versión 1.1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) por el método comparativo de Ct ($\Delta\Delta$ Ct), realizando una curva de cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes analizados respecto del gen de referencia GAPDH y normalizando las medidas a la expresión de los distintos genes analizados en animales controles.

Las secuencias de primers empleadas en este estudio experimental fueron las siguientes:

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados para la realización de la rt-qPCR

Genes	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
DAT	ACGGTGGCATCTACGTCTTC	TCACTGAATTGCTGGACGGCC
Vmat2	GGATGGGGCTATTCAGCTCTT	AAAGCAGATGGAGCCTGCA
C-Fos	AAACGGAGAATCCGAAGG	CGTCTTCAAGTTGATCTGTC
D1	AAACAAATAGGCCAAGAGTC	CTTTCCAATCTGAAAACCTGC
D2	AAGCGCCGAGTTACTGTCAT	GACCACAAAGGCAGGGTTG
D3	CATCTACATAGTCCTGAGGC	CTGGCCCTTATTGAAAACCTG
D5	AACTGTATGGTTCCTTTCTG	AATATGTCTGAAGGTGGTCTC
GALR1	AAAACCTGGACAAAACCTTAGCC	GGATACCTTTGTCTTTGCTC
GALR2	AACAGGAATCCACAGACC	CCCTTTGGTCCTTTAACAAG
5-HT1A	AACTATCTCATCGGCTCC	ACATCCAGGGCGATAAAC

2.4.6 Modelo animal knockdown.

Para el estudio de la posible implicación de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto producido por el fragmento GAL(1-15) en autoadministración de alcohol, se ha empleado un modelo knockdown para GALR1 y un modelo knockdown para GALR2 in vivo. La obtención y comprobación de este modelo animal ha sido previamente descrita en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015; Flores-Burgess et al., 2018).

La generación del modelo animal knockdown tiene su base en el fenómeno de interferencia del ARN en el cual moléculas pequeñas de ARN, alrededor de 20 nucleótidos, se unen por complementariedad a moléculas de ARN mensajero y activan mecanismos moleculares (RISC) degradando los ARNs de doble cadena en el citoplasma (Akhtar and Benter, 2007; Kole et al., 2012). Para la comprobación del modelo, mediante qPCR cuantitativa en tiempo real, en nuestro laboratorio, analizamos la curva de tiempo de ARNm de GALR1 o GALR2 en el hipocampo dorsal, y una curva de tiempo de la expresión de la proteína GALR1 o GALR2 utilizando la cuantificación de la tinción inmunohistoquímica para GALR1 o GALR2 en el hipocampo. La curva de tiempo indicó una reducción máxima de la expresión de la proteína receptora GALR1 o GALR2 8 días después de la inyección (Flores-Burgess et al., 2018).

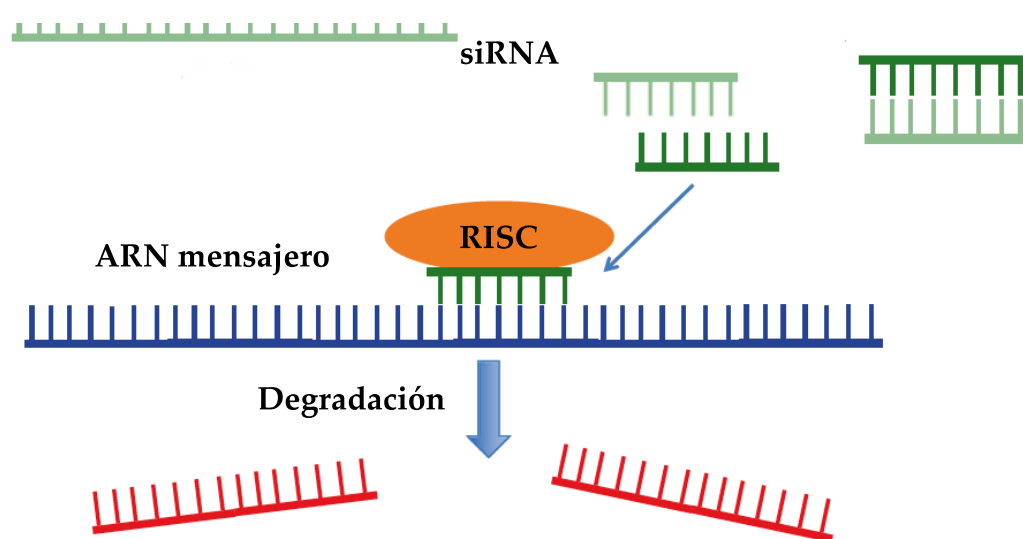


Figura 10. Representación gráfica del mecanismo molecular de interferencia de ARN, donde se produce la activación de mecanismos moleculares de degradación intracelular debido a la degradación de ARN mensajeros (Flores-Burgess et al., 2018).

El silenciamiento génico por ARN de interferencia constituye un nuevo enfoque para la inhibición de la expresión génica in vivo donde el siRNA Accell se ha utilizado en animales mediante inyecciones intracerebroventriculares (icv) únicas, ya que habitualmente, el silenciamiento génico se ha realizado exclusivamente en estudios de cultivo celular in vitro (Flores-Burguess et al., 2018).

El procedimiento seguido en este estudio para la reducción de la expresión de los receptores GALR1 o GALR2 fue el siguiente. Los animales recibieron una inyección intracerebroventricular (icv) de 5 µg (0.35 nmol) de Accell Smart pool siRNA para GALR1 (Dharmacon, Lafayette, EEUU) o 5 µg (0.35 nmol) de Accell Smart pool siRNA para GALR2 (Dharmacon, Lafayette, EEUU). Se administró Delivery Media como control siRNA. El reactivo siRNA GALR1 y el reactivo siRNA GALR2 consisten en una mezcla de 4 secuencias cortas de ARN complementarias a la secuencia del ARN mensajero de los receptores GALR1 o GALR2. Los animales tuvieron un período de recuperación de 8 días antes de la prueba de comportamiento, el tiempo requerido para reducir los niveles de receptores de GAL como se ha descrito previamente.

3. Grupos experimentales.

A continuación, se detallarán los experimentos y grupos experimentales creados con el fin de lograr los objetivos expuestos anteriormente en esta tesis doctoral.

3.1 GAL(1-15) EN UN MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL.

3.1.1 Papel de GAL(1-15) en el consumo y búsqueda de alcohol.

3.1.1.1 Curva dosis-respuesta de GAL(1-15).

3.1.1.2 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de genes en el sistema mesolímbico.

3.1.1.3 Comparación del efecto de Galanina (GAL) y GAL(1-15).

3.1.1.4 Papel de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto producido por GAL(1-15).

3.1.2 Modulación de GAL(1-15) sobre el grado de motivación por el alcohol: Ratio Progresivo.

3.1.3 Efecto de GAL(1-15) en recaída alcohólica por contexto.

3.1.3.1 Extinción.

3.1.3.2 Recaída.

3.1.4 Efecto de GAL(1-15) por la vía de administración intranasal.

3.1.5 GAL(1-15) en la cepa Marchigian Sardinian (msP): un modelo animal con alta preferencia por el alcohol.

3.2 GAL(1-15) EN COMBINACIÓN CON EL ANTIDEPRESIVO ESCITALOPRAM (ESC) EN LA COMORBILIDAD ALCOHOLISMO Y DEPRESIÓN.

3.2.1 Efecto de GAL(1-15) y ESC en la Prueba de Preferencia de Sacarosa (SPT).

3.2.1.1 Curva dosis-respuesta de ESC en el SPT.

3.2.1.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en el SPT.

3.2.2 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

3.2.2.1 Curva dosis-respuesta de ESC en autoadministración de sacarina.

3.2.2.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

3.2.3 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

3.2.3.1 GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

3.2.3.2 GAL(1-15) y ESC en pruebas de desesperanza: Test de Natación Forzada (FST) y Test de Suspensión de la Cola (TST).

3.2.3.3 GAL(1-15) y ESC en pruebas de ansiedad: Test del Campo Abierto (OFT) y Test del laberinto Elevado en Cruz (EPM).

3.2.3.4 GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en los núcleos implicados en alcoholismo y depresión.

3.2.3.5 GAL(1-15) y ESC en la expresión de pCREB en el núcleo accumbens (NAc).

3.1 GAL(1-15) EN UN MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL.

En este apartado se desarrollarán los epígrafes relativos a los grupos experimentales utilizados en este primer bloque experimental.

3.1.1 Papel de GAL(1-15) en el consumo y búsqueda de alcohol.

En los experimentos realizados para estudiar el efecto de la GAL(1-15) en la prueba de autoadministración de alcohol, se ha seguido el siguiente procedimiento: los animales se entrenaron en las cajas de autoadministración en un Ratio Fijo FR1 para autoadministrarse inicialmente sacarina 0.2% para posteriormente realizar el desvanecimiento el porcentaje de sacarina y aumentar el porcentaje de alcohol hasta conseguir un nivel estable de respuesta al 10% de alcohol (Alen et al., 2009). Posteriormente, los animales se implantaron con una cánula fija mediante cirugía estereotáxica y, tras un período de recuperación, comenzaron las pruebas experimentales. Los tratamientos se administraron en los mismos animales dejando 7 días entre tratamientos.

3.1.1.1 Curva dosis-respuesta de GAL(1-15).



Figura 11. Diagrama del diseño experimental para el estudio del papel de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol.

Se realizó una curva dosis-respuesta del fragmento GAL(1-15) en autoadministración de alcohol. Grupos de ratas recibieron vía icv GAL(1-15) 0.3 nmol, 1 nmol, 3 nmol o líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) 15 minutos antes de la prueba.

Tabla 2. Grupos experimentales para el estudio de la curva dosis-respuesta de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	LCRa	13
GAL(1-15)	GAL(1-15) 0.3 nmol	6
	GAL(1-15) 1 nmol	11
	GAL(1-15) 3 nmol	9

3.1.1.2 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de genes en el sistema mesolímbico.

Los animales del test de autoadministración de alcohol se sacrificaron por decapitación una hora después de la administración icv de GAL(1-15) 3 nmol o LCRa. Se agregó un grupo experimental de animales basales sin consumo previo de alcohol que no habían recibido ningún tratamiento previo.

- GAL(1-15) en la expresión de C-Fos en ATV, NAc y CPF.

Tabla 3. Grupos experimentales para el estudio del efecto de GAL(1-5) en la expresión de C-Fos en ATV, NAc y CPF.

Grupo experimental	Condición previa	Tratamiento	Nº de animales
Basal	-	-	5
Control	EtOH	LCRa	5-6
GAL(1-15)	EtOH	GAL(1-15) 3nmol	5-6

- GAL(1-15) en la expresión de ARNm de los receptores de dopamina D1, D2, D3, D5, DAT y Vmat2, los receptores GALR1 y GALR2 y el receptor 5-HT1A, en ATV, NAc y CPF.

Tabla 4. Grupos experimentales para el estudio del efecto de la GAL(1-15) en la expresión de los receptores de Dopamina, DAT y Vmat 2, los receptores GALR1 y GALR2 y el receptor 5-HT1A en VTA, NAc y CPF.

Grupo experimental	Condición previa	Tratamiento	Nº de animales
Basal	-	-	4-5
Control	EtOH	LCRa	4-8
GAL(1-15)	EtOH	GAL(1-15) 3nmol	5-7

3.1.1.3 Comparación del efecto de Galanina (GAL) y GAL(1-15).

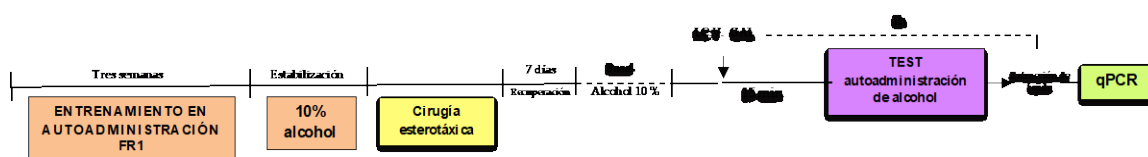


Figura 12. Diseño experimental para el estudio de la comparación de GAL(1-15) y GAL en autoadministración de alcohol.

En este experimento se compararon los efectos de la molécula completa de Galanina (GAL) y el fragmento GAL(1-15). Para ello, grupos de ratas recibieron vía icv GAL 3 nmol, GAL(1-15) 3 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba.

Tabla 5. Grupos experimentales para el estudio de la comparación de GAL(1-15) y GAL en autoadministración de alcohol.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	LCRa	13
GAL	GAL 3 nmol	9
GAL(1-15)	GAL(1-15) 3 nmol	11

3.1.1.4 Papel de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto producido por GAL(1-15).

- Antagonista del receptor GALR2, M871.

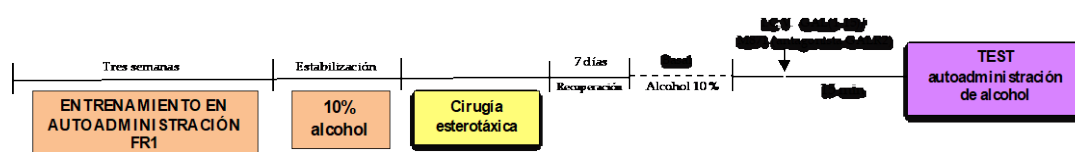


Figura 13. Diagrama del diseño experimental en el estudio del antagonista GALR2, M871, en autoadministración de alcohol.

En primer lugar se estudió la implicación del receptor GALR2 en el efecto de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol mediante el uso del antagonista específico M871. Grupos de ratas recibieron vía icv: GAL(1-15) 3 nmol, el antagonista M871 3 nmol, GAL(1-15) 3 nmol combinado con el antagonista de GALR2 mientras que a los animales controles se les administró LCRa 15 minutos antes de la prueba.

Tabla 6. Grupos experimentales para el estudio del efecto del antagonista de GALR2 en autoadministración de alcohol.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	LCRa	15
GAL(1-15)	GAL(1-15) 3 nmol	10
M871	M871 3 nmol	6
GAL(1-15) + M871	GAL(1-15) 3 nmol + M871 3 nmol	6

- Generación de animales knockdown para el estudio de los receptores GALR1 y GALR2.

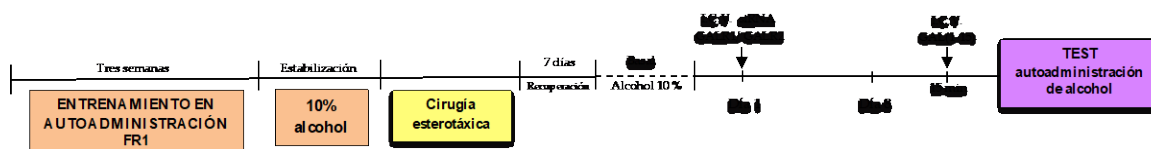


Figura 14. Diagrama del diseño experimental en el estudio de un modelo animal knockdown para el estudio de los receptores GALR1 o GALR2 en autoadministración de alcohol.

El modelo animal knockdown fue utilizado para el estudio de los receptores de Galanina GALR1 o GALR2 en la prueba de autoadministración de alcohol. Grupos de ratas se administraron intracerebroventricularmente con siRNA GALR1, siRNA GALR2 o Delivery Media (DM) ocho días antes de la prueba de autoadministración de alcohol. Se administró vía icv GAL(1-15) o LCRa 15 minutos antes de la prueba.

Tabla 7. Grupos experimentales para el estudio de los receptores GALR1 y GALR2 en un modelo animal knockdown.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
DM	LCRa	10
siRNA GALR1	GAL(1-15) 3nmol	5
siRNA GALR2	GAL(1-15) 3nmol	6

3.1.2 Modulación de GAL(1-15) sobre el grado de motivación por el alcohol: Ratio Progresivo.

El procedimiento general que se ha seguido para el entrenamiento en autoadministración de alcohol al 10% para los diferentes objetivos experimentales de los siguientes apartados 3.1.2, 3.1.3 y 3.1.4 ha sido el expuesto a continuación. Los animales tuvieron acceso intermitente a una solución de sacarina 0.2% + alcohol 10% mediante un modelo de dos biberones. Posteriormente, los animales se entrenaron en las cajas de autoadministración bajo un programa FR1 con desvanecimiento inicial de sacarina y mantenimiento del porcentaje de alcohol hasta conseguir un refuerzo final de alcohol al 10%. Tras varios días de consumo estable, se realizó la cirugía a los animales y tras un período de recuperación, se realizaron las diferentes pruebas experimentales.

Se analizó el punto de ruptura o *breaking point* en el Test de Ratio Progresivo y fue considerado un índice de motivación.

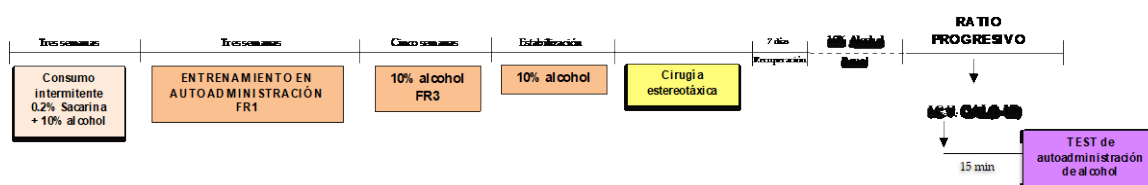


Figura 15. Diseño experimental seguido para el estudio del efecto de GAL(1-15) sobre la motivación por el alcohol.

Para el estudio del Ratio Progresivo, grupos de animales se inyectaron vía icv con GAL(1-15) 3 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba de autoadministración de alcohol. Los grupos experimentales se equilibraron teniendo en cuenta la media del número de refuerzos en días previos al test. Los tratamientos se administraron en los mismos animales, con período de siete días entre tratamientos.

Tabla 8. Grupos experimentales para el estudio del efecto de GAL(1-15) en un Ratio Progresivo.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	LCRa	14
GAL(1-15)	GAL(1-15) 3nmol	11

3.1.3 Efecto de GAL(1-15) en recaída alcohólica por contexto.

Se analizó el efecto de la administración de GAL(1-15) en extinción y recaída alcohólica por contexto. En primer lugar, los animales aprendieron la tarea de autoadministración en un contexto A (Figura 16): al pulsar la palanca activa, se obtendría una recompensa de alcohol al 10% acompañado de la iluminación de una luz. Además, la plataforma de la caja de autoadministración estaba compuesta por una rejilla con base de serrín. Los animales continuaron autoadministrándose alcohol al 10% y se les realizó la cirugía estereotáctica. Tras un período de recuperación, los animales volvieron a la tarea de autoadministración de alcohol.

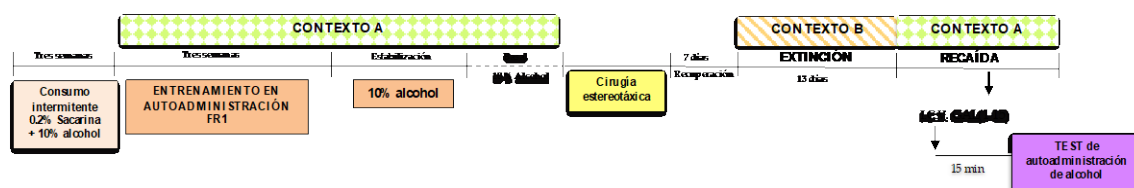


Figura 16. Diseño experimental seguido para el estudio de GAL(1-15) en extinción y recaída alcohólica por contexto

3.1.3.1 Extinción.

La extinción alcohólica se llevó a cabo en el contexto B. El primer día de extinción, 15 minutos antes de la sesión de autoadministración, se inyectó a los animales vía icv con GAL(1-15) 3nmol y LCRa. Los grupos experimentales se equilibraron teniendo en cuenta la media de las pulsaciones a la palanca activa en días previos al test.

Tabla 9. Grupos experimentales para el estudio de GAL(1-15) en extinción alcohólica.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	LCRa	11
GAL(1-15)	GAL(1-15) 3nmol	12

3.1.3.2 Recaída.

Los animales continuaron realizando diariamente las sesiones de extinción hasta alcanzar el criterio de extinción: dos sesiones consecutivas con un número de pulsaciones a la palanca activa inferior al 20% de la línea base de cada animal (Lebourgeois et al., 2018). La recaída alcohólica fue realizada en el contexto A, reinstaurando los estímulos y recompensas asociadas a ese contexto. El día de la prueba, 15 minutos antes del test, se inyectó vía icv GAL(1-15) 3 nmol y LCRa. Los grupos experimentales se equilibraron teniendo en cuenta la media de las pulsaciones a la palanca activa en días previos al test.

Tabla 10. Grupos experimentales para el estudio de GAL(1-15) en recaída alcohólica.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	LCRa	11
GAL(1-15)	GAL(1-15) 3 nmol	12

3.1.4 Efecto de GAL(1-15) por la vía de administración intranasal.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la GAL(1-15) en autoadministración de alcohol a través de una vía alternativa a la administración intracerebroventricular, se estudió su efecto a través de la vía nasal.

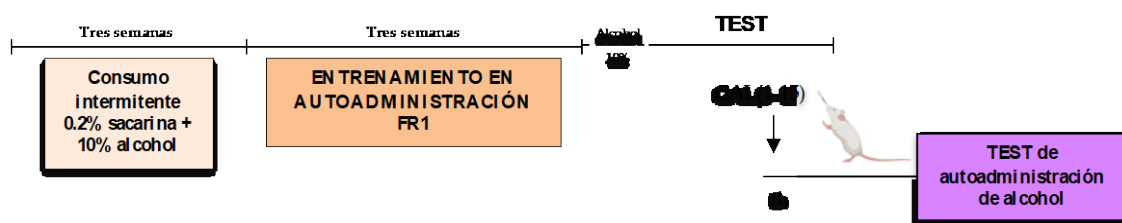


Figura 17. Diseño experimental seguido para el estudio de la administración de GAL(1-15) por vía intranasal en autoadministración de alcohol.

Grupos de animales, se anestesiaron con isoflurano y se inyectaron vía nasal con GAL(1-15) 75 μ g y agua destilada una hora antes de la prueba de autoadministración.

Tabla 11. Grupos experimentales para el estudio de administración nasal de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Agua destilada	10
GAL(1-15)	GAL(1-15) 75 μ g	9

3.1.5 GAL(1-15) en la cepa Marchigian Sardinian (msP): un modelo animal con alta preferencia por el alcohol.

Durante el período de estancia internacional en la Universidad de Camerino (Italia), se llevaron a cabo los experimentos para el estudio de GAL(1-15) en el modelo de rata preferente por el alcohol.

Desde el primer momento los animales se entrenaron en las cajas de autoadministración con alcohol al 10%. Tras 25 sesiones, los animales tuvieron un consumo estable y se procedió a realizar la cirugía estereotáxica. Tras la cirugía, los animales continuaron con las sesiones de autoadministración hasta conseguir un número de refuerzos estable de alcohol al 10%.

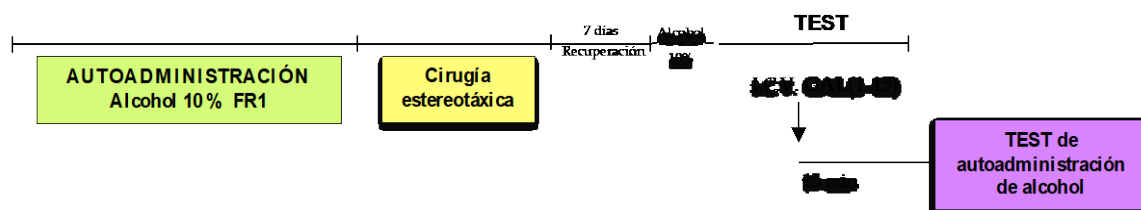


Figura 18. Diseño experimental seguido para el estudio de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol en la cepa alcohólica msP.

Grupos de animales se inyectaron vía icv con GAL(1-15) 3 nmol, 6 nmol y LCRa 15 minutos antes de la prueba de autoadministración. En esta prueba se utilizaron ratas macho y ratas hembra. Se dejó un periodo de 7 días entre tratamientos.

Tabla 12. Grupos experimentales para el estudio de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol en ratas msP.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales macho	Nº de animales hembra
Control	LCRa	10	8
GAL(1-15)	GAL(1-15) 3 nmol	10	5
	GAL(1-15) 6 nmol	9	4

3.2 GAL(1-15) EN COMBINACIÓN CON EL ANTIDEPRESIVO ESCITALOPRAM (ESC) EN LA COMORBILIDAD ALCOHOLISMO Y DEPRESIÓN.

En este apartado se desarrollarán los epígrafes relativos a los grupos experimentales utilizados en este segundo bloque experimental.

3.2.1 Efecto de GAL(1-15) y ESC en la Prueba de Preferencia de Sacarosa (SPT).

3.2.1.1 Curva dosis-respuesta de ESC en el SPT.

El patrón de inyección de ESC es subcrónico, atendiendo a la bibliografía (Reed et al., 2008). Se inyectó de forma intraperitoneal las dosis correspondientes de ESC a las 23, 5 y 1h antes del test.

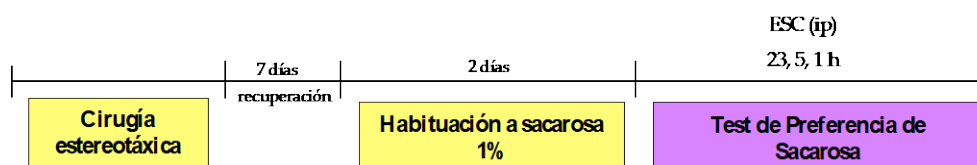


Figura 19. Diagrama del diseño experimental seguido para estudiar el efecto de ESC a distintas dosis en el SPT.

Tabla 13. Grupos experimentales utilizados para la curva dosis- respuesta de ESC en el SPT.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino	12
ESC	ESC 7.5 mg/Kg	7
	ESC 10 mg/Kg	9

3.2.1.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en el SPT.

GAL(1-15) 1nmol o LCRA se administraron vía icv 15 minutos antes del test mientras que ESC 10mg/Kg o suero salino se inyectaron de forma subcrónica 23, 5 y 1 hora antes del test.

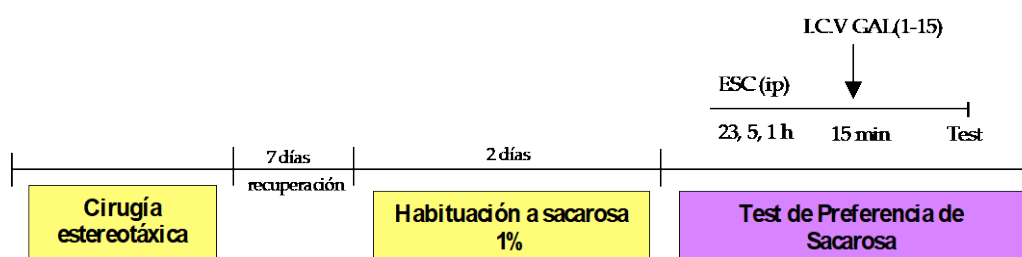


Figura 20. Diseño experimental seguido para la realización del SPT.

Tabla 14. Grupos experimentales utilizados para el estudio del efecto de la combinación de GAL(1-15) y ESC en el SPT.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRA	9
ESC	ESC 10 mg/Kg + LCRA	10
GAL(1-15) + ESC	ESC 10 mg/Kg + GAL(1-15) 1 nmol	7

3.2.2 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

3.2.2.1 Curva dosis-respuesta de ESC en autoadministración de sacarina.

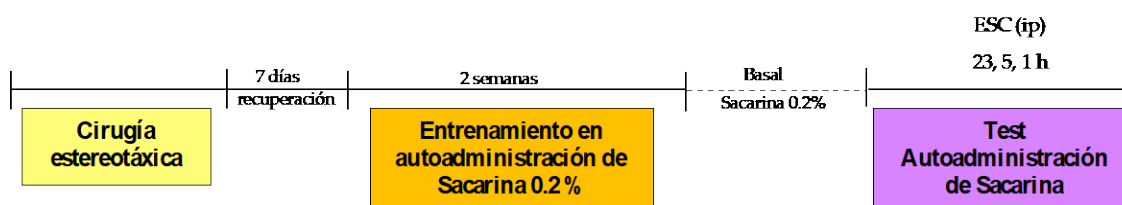


Figura 21. Diseño experimental del estudio de ESC en autoadministración de sacarina.

Los animales se entrenaron para autoadministrarse sacarina 0.2 % en la tarea de autoadministración y tras un consumo estable, se procedió a realizar el test. Los diferentes grupos de animales se administraron con ESC 2.5 mg/Kg, 5 mg/Kg y 7.5 mg/Kg de forma subcrónica 23, 5 y 1 h antes del test de forma intraperitoneal.

Tabla 15. Grupos experimentales para la curva dosis-respuesta de ESC en autoadministración de sacarina.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino	14
ESC	ESC 2.5 mg/Kg	14
	ESC 5 mg/Kg	8
	ESC 7.5 mg/Kg	14

3.2.2.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

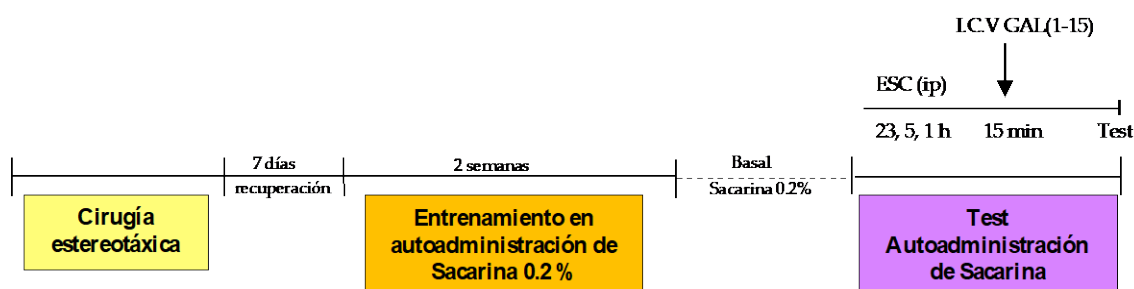


Figura 22. Diseño experimental del estudio de GAL(1-15)+ESC en autoadministración de sacarina.

Los animales se entrenaron para autoadministrarse sacarina 0.2 % y tras un consumo estable, se procedió a realizar el test. En primer lugar, se estudió el efecto de la coadministración de ESC con una dosis de ESC de 7.5 mg/Kg y GAL(1-15) (1 nmol). ESC 7.5mg/Kg o suero salino se inyectaron de forma subcrónica 23, 5 y 1h antes del test. GAL(1-15) o LCRA se inyectaron 15 minutos antes de la prueba de autoadministración de sacarina.

Tabla 16. Grupos experimentales para el estudio de la combinación de GAL(1-15) 1 nmol y ESC 7.5 mg/Kg en el test de autoadministración de sacarina.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRA	8
ESC	ESC 7.5 mg/Kg + LCRA	8
GAL(1-15) + ESC	ESC 7.5 mg/Kg + GAL(1-15) 1 nmol	7

En segundo lugar, se estudió el efecto de la coadministración de ESC con una dosis de 2.5 mg/Kg y la dosis de 1nmol de GAL(1-15). ESC 2.5mg/Kg o suero salino se inyectaron de forma subcrónica antes del test. El fragmento GAL(1-15) o LCRa se inyectaron 15 minutos antes de la prueba de autoadministración de sacarina.

Tabla 17. Grupos experimentales de la combinación de GAL(1-15) 1 nmol y ESC 2.5mg/Kg en el test de autoadministración de sacarina.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRa	8
ESC	ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	9
GAL(1-15) + ESC	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 1 nmol	7

3.2.3 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

El diseño experimental de este experimento se resume en la figura 23.

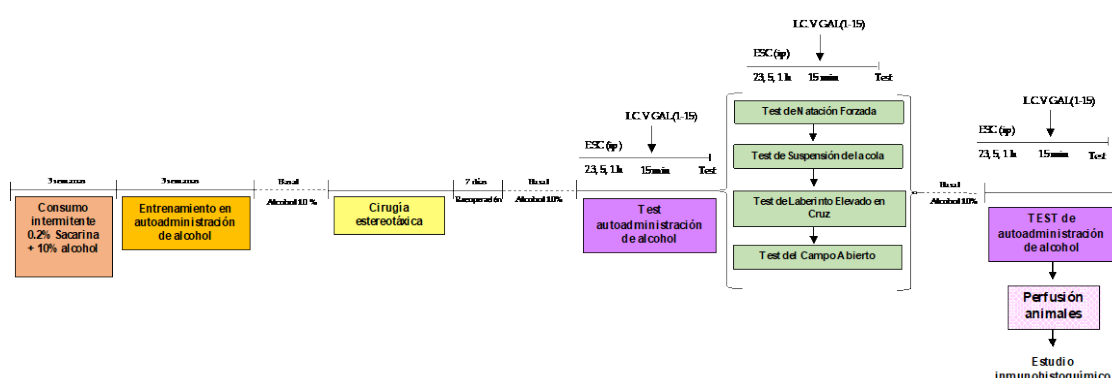


Figura 23: Diseño experimental del estudio de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

3.2.3.1 GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

Grupos de animales con un consumo estable de alcohol al 10% en autoadministración, se inyectaron con ESC 2.5 mg/Kg o suero salino inyectaron 23, 5 y 1h antes del test. Se administró una dosis subumbral de GAL(1-15) (0.3 nmol) o LCRA 15 minutos antes de la prueba. Los grupos experimentales se equilibraron teniendo en cuenta la media de las pulsaciones a la palanca activa en días previos al test.

Tabla 18. Grupos experimentales de la combinación de GAL(1-15) y ESC en el test de autoadministración de alcohol.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRA	7
ESC	ESC 2.5 mg/Kg + LCRA	8
GAL(1-15) + ESC	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3 nmol	7

3.2.3.2 GAL(1-15) y ESC en pruebas de desesperanza: Test de Natación Forzada (FST) y Test de Suspensión de la Cola (TST).

Animales que se autoadministraban alcohol al 10% de forma crónica, realizaron el FST. Los animales se administraron con la dosis de ESC de 7.5 mg/Kg inyectado de forma intraperitoneal y la dosis de GAL(1-15) de 1 nmol inyectado icv 15 minutos antes de la prueba (García-Durán et al., 2021).

Tabla 19. Grupos experimentales del estudio de la combinación de GAL(1-15) 1 y ESC en el FST.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRa	8
ESC	ESC 7.5 mg/Kg + LCRa	7
GAL(1-15) + ESC	ESC 7.5 mg/Kg + GAL(1-15) 1 nmol	7

Estos animales con consumo crónico de alcohol, realizaron también el TST y se utilizaron las dosis de ESC de 7.5 mg/Kg inyectado de forma intraperitoneal y la dosis de GAL(1-15) de 1 nmol inyectado vía icv 15 minutos antes de la prueba.

Tabla 20. Grupos experimentales de la combinación de GAL(1-15) y ESC en el TST.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRa	8
ESC	ESC 7.5 mg/Kg + LCRa	8
GAL(1-15) + ESC	ESC 7.5 mg/Kg + GAL(1-15) 1 nmol	8

3.2.3.3. GAL(1-15) y ESC en pruebas de ansiedad: Test del Campo Abierto (OFT) y Test del laberinto Elevado en Cruz (EPM)

En el OFT, ESC (2.5 mg/Kg) o suero salino se administraron intraperitonealmente con un patrón de inyección subcrónico, mientras que GAL(1-15) 0.3 nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes del test (Millón et al., 2017, 2019).

Tabla 21. Grupos experimentales de la combinación de GAL(1-15) 1 y ESC en el OFT.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRa	8
ESC	ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	8
GAL(1-15) + ESC	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3 nmol	8

En el EPM, se administró de forma intraperitoneal ESC (2.5 mg/Kg) o suero salino bajo un patrón de inyección subcrónico, mientras que GAL(1-15) 0.3 nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes del test.

Tabla 22. Grupos experimentales de la combinación de GAL(1-15) y ESC en el EPM.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRa	8
ESC	ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	8
GAL(1-15) + ESC	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3 nmol	8

3.2.3.4 GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en los núcleos implicados en alcoholismo y depresión.

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para estudiar el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en distintos núcleos implicados en la depresión y el trastorno por uso de alcohol, como son los núcleos: núcleo tegmental rostromedial (RMTg), habénula medial (HbM), habénula lateral (HbL), núcleo accumbens (NAc) y corteza prefrontal (CPF).

Además, se realizó una doble inmunohistoquímica de C-Fos/5HT en rafe dorsal (RD) y una doble inmunohistoquímica de C-Fos/TH en el área tegmental ventral (ATV).

Para ello, se administró ESC o suero salino 23, 5 y 1h antes del test mientras que GAL(1-15) o LCRA se administraron 15 minutos antes del test de autoadministración de alcohol, y 90 minutos tras la inyección del fragmento GAL(1-15), los animales se sacrificaron por perfusión.

Tabla 23. Grupos experimentales para el estudio inmunohistoquímico de C-Fos en distintos núcleos implicados en la depresión y el trastorno por consumo de alcohol.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRA	5
ESC	ESC 2.5 mg/Kg + LCRA	5
GAL(1-15) + ESC	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3 nmol	5

3.2.3.5 GAL(1-15) y ESC en la expresión de pCREB en el núcleo accumbens (NAc).

La expresión del marcador pCREB en NAc también se analizó, inyectando GAL(1-15) y ESC previo a la realización del test de autoadministración y perfundiendo los animales 90 minutos después de la inyección para poder disponer de material biológico y realizar el estudio inmunohistoquímico.

Tabla 24. Grupos experimentales para el estudio inmunohistoquímico de pCREB en NAc.

Grupo experimental	Tratamiento	Nº de animales
Control	Suero salino + LCRa	5
ESC	ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	5
GAL(1-15) + ESC	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3 nmol	5

4. Análisis estadístico.

En el presente estudio se ha utilizado el estadístico t de Student para la comparación de dos grupos experimentales, considerando los grados de significación de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$. Cuando se han comparado tres o más grupos experimentales, se ha empleado el análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de un test post hoc de Fisher (LSD) para comparar las diferencias entre los distintos grupos experimentales. Del mismo modo los grados de significación que se establecieron fueron $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$. Todos los datos se analizaron usando el software de GraphPad 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales con rotación varimax para extraer las dimensiones independientes o factores de los datos obtenidos de la inmunohistoquímica de C-Fos tras la administración de alcohol (apartado 3.2.3.3). Un valor > 1 fue elegido como criterio para la extracción de componentes. La puntuación factorial, es decir, el valor estandarizado que indica la posición de cada animal en cada factor, se calculó por el método de regresión utilizando el programa estadístico SPSS (SPSS Estadísticas 20, IBM Corporation, Armonk, NY, EEUU).

Solo aquellas medidas con una saturación mayor de 0.5 en valor absoluto se incluyeron en un factor. La capacidad de cada factor para predecir el comportamiento de búsqueda de alcohol se probó mediante las correlaciones de Pearson entre la puntuación factorial y la puntuación de comportamiento de la rata.

Resultados



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. GAL(1-15) EN UN MODELO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL.

1.1 Papel de GAL(1-15) en el consumo y búsqueda de alcohol.

1.1.1 Curva dosis-respuesta de GAL(1-15).

Se administró GAL(1-15) mediante vía intracerebroventricular (icv) a las dosis de 0.3, 1 y 3 nmol. Se observó que la dosis de GAL(1-15) 3 nmol indujo una reducción significativa en el número de refuerzos en un 50% ($F_{3,35}=4.11$, $p=0.01$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$; Figura 1A) y en las pulsaciones de palanca activa en un 48% ($F_{3,35}=4.29$, $p=0.01$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$; Figura 1B) en comparación con el grupo control.

La dosis de GAL(1-15) 1 nmol indujo un efecto menos potente pero significativo tanto en la reducción del número de refuerzos ($p < 0.05$) como en las pulsaciones de la palanca activa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control (Figura 1). La dosis de GAL(1-15) 0.3 nmol no tuvo efecto en ninguno de los parámetros evaluados en la prueba de autoadministración de alcohol, situándose a nivel de los animales controles (Figura 1).

Estos resultados indicarían que el fragmento GAL(1-15) tiene un papel fundamental en la búsqueda de alcohol en un modelo operante de autoadministración.

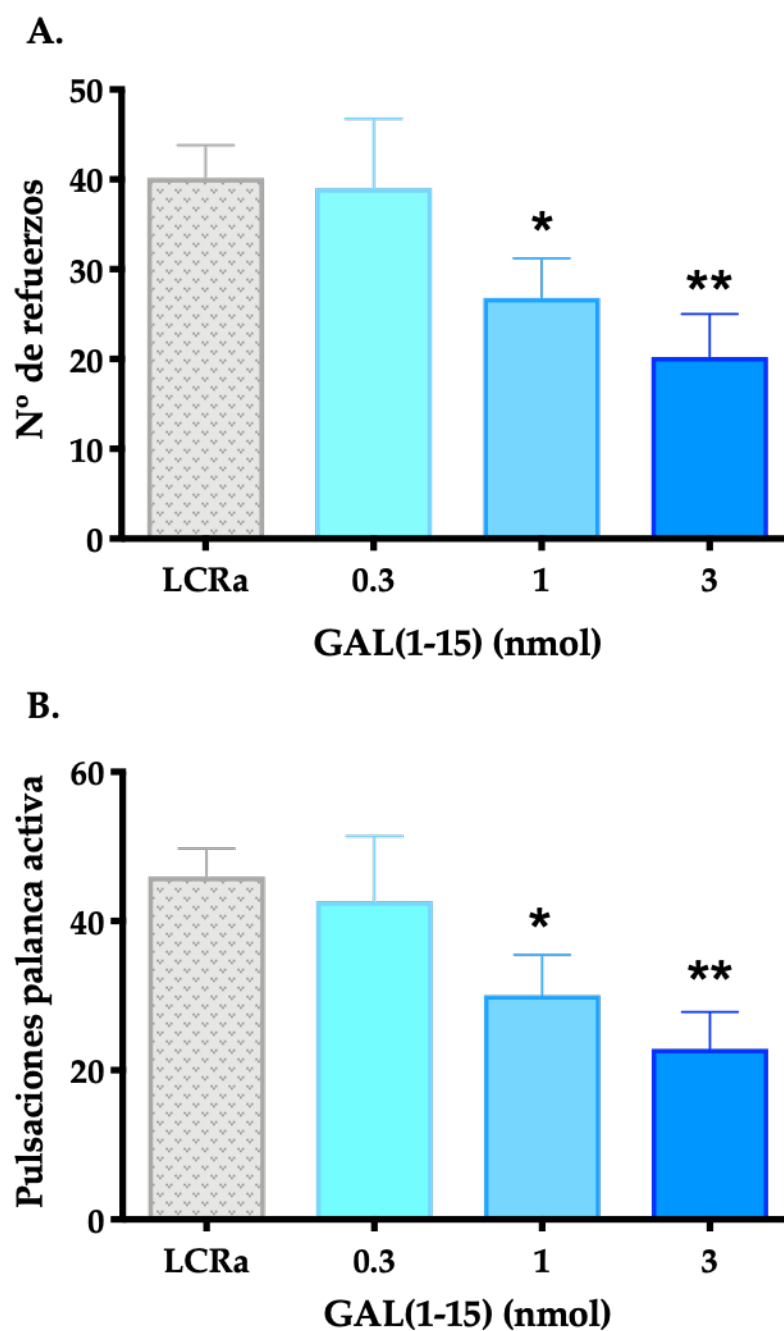


Figura 1. Curva dosis-respuesta de GAL(1-15) en la prueba de autoadministración de alcohol. GAL(1-15) 0.3 nmol, 1 nmol, 3 nmol o líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) se administraron icv 15 min antes de la prueba. Las barras verticales representan la media $\pm$ error estándar de la media del número de refuerzos y de las pulsaciones a la palanca activa. **A, B.** * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto al grupo control; según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

No se observaron diferencias en las pulsaciones de palanca inactiva en ninguna de las dosis administradas de GAL(1-15) (Tabla 1).

Tabla 1. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol

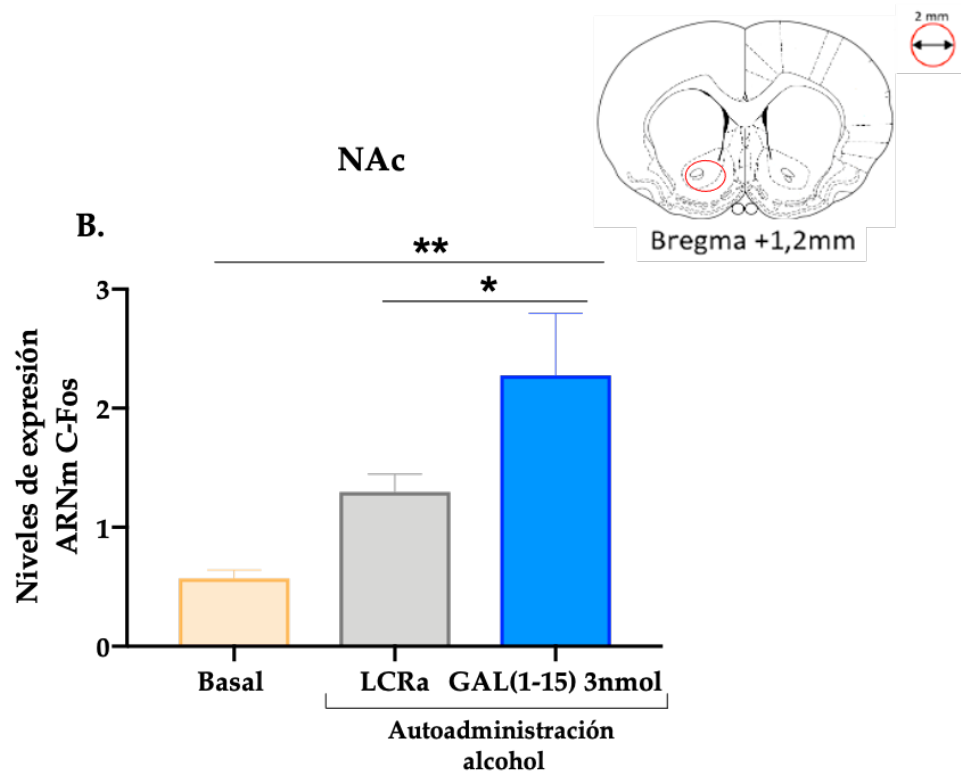
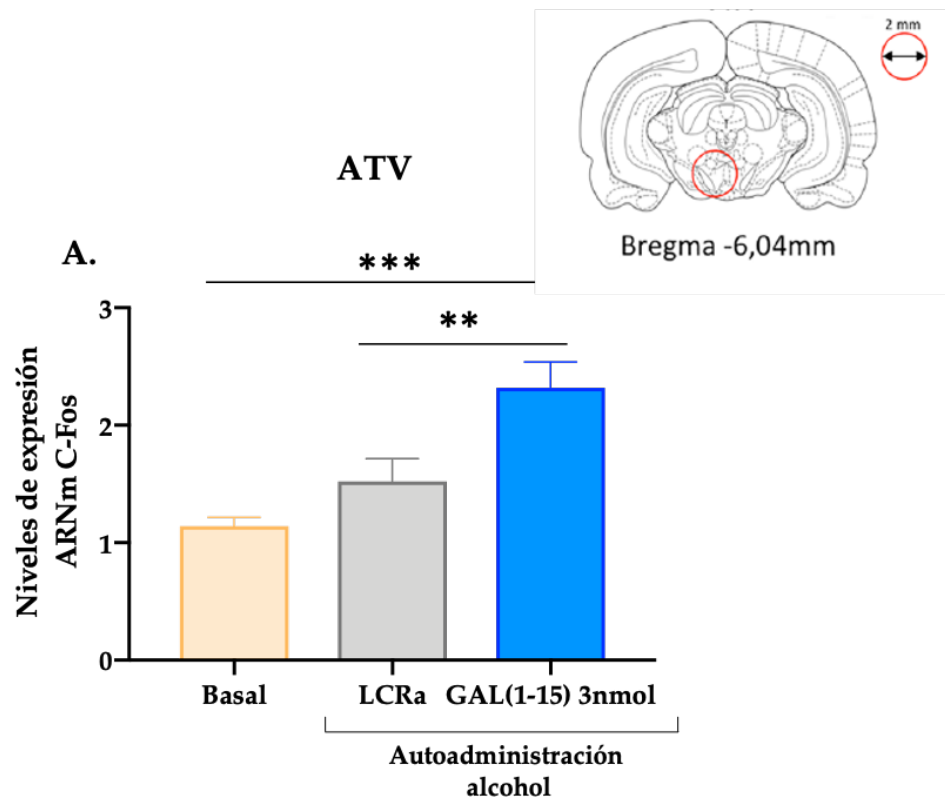
	LCRa	GAL(1-15) (nmol)		
		0.3	1	3
Pulsaciones				
palanca inactiva	3.3 ± 1.3	1.2 ± 0.6	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.4

Tabla 1. Pulsaciones de palanca inactiva en la curva dosis-respuesta de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol. GAL(1-15) 0.3 nmol, 1 nmol, 3 nmol o LCRa se administraron icv 15 min antes de la prueba. No existen diferencias significativas según el análisis de varianza (ANOVA) entre ninguno de los grupos experimentales en las pulsaciones a la palanca inactiva.

1.1.2 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de genes en el sistema mesolímbico.

1.1.2.1 GAL(1-15) en la expresión de ARNm de C-Fos en ATV, NAc y CPF

Animales bajo consumo crónico de alcohol mediante un modelo de autoadministración, se inyectaron con GAL(1-15) o LCRa y una hora después se sacrificaron para la obtención de tejido. Además, se añadió un grupo de animales basales que no habían consumido alcohol previamente. Se observó que la dosis de GAL(1-15) 3 nmol produjo un aumento significativo en los niveles de ARNm de C-Fos en ATV ($F_{2,13}= 11.1$, $p=0.001$; Fisher's LSD post hoc: $p <0.01$), en NAc ($F_{2,12}= 7.38$, $p=0.008$; Fisher's LSD post hoc: $p <0.05$) y en CPF ($F_{2,14}=5.18$, $p=0.02$; Fisher's LSD post hoc: $p <0.05$; Figura 2), en comparación con el grupo control.



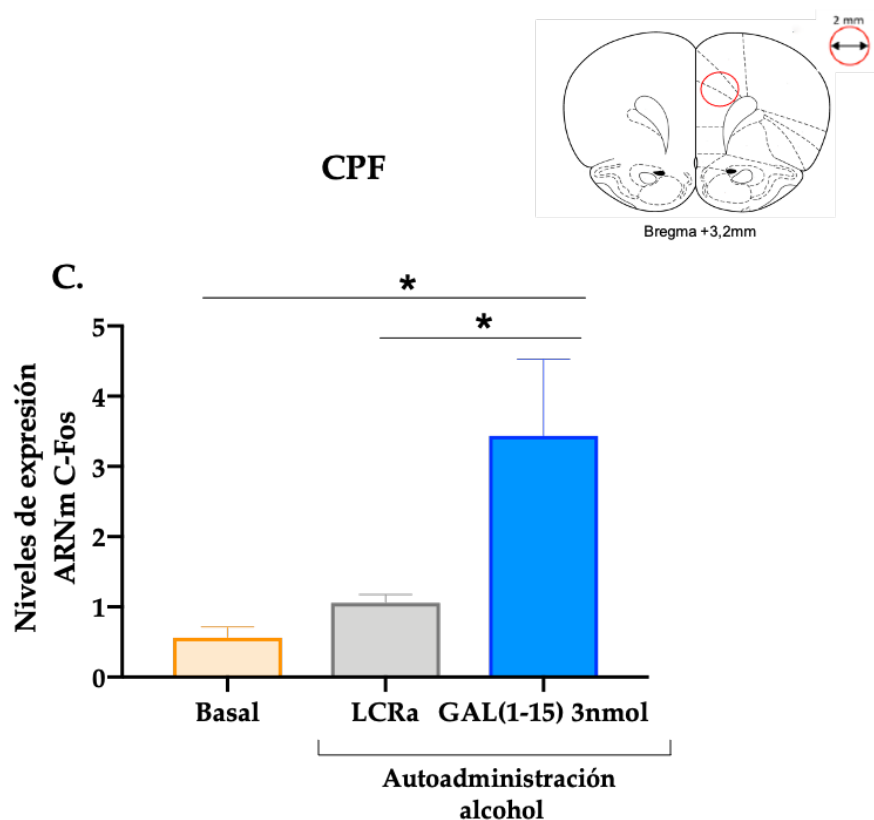


Figura 2. Efecto de GAL(1-15) en los niveles de expresión de ARNm de C-Fos en el Área Tegmental Ventral (ATV), Núcleo Accumbens (NAc) y Corteza Prefrontal (CPF). GAL(1-15) 3nmol se administró icv una hora antes de las medidas. Animales sin un consumo previo de alcohol mediante autoadministración fue considerado como grupo basal. Animales inyectados con LCRA se consideraron grupo control. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media de la expresión de ARNm de C-Fos **A.** ** $p < 0.01$ con respecto a LCRA; *** $p < 0.001$ con respecto al grupo basal. **B.** * $p < 0.05$ respecto a LCRA; ** $p < 0.01$ respecto al grupo basal. **C.** * $p < 0.05$ frente a LCRA, basal; según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

A la vista de estos resultados, podemos decir que la administración de GAL(1-15) 3nmol en animales con consumo de alcohol, modula la actividad de regiones del sistema corticomesolímbico relacionadas con la recompensa y la motivación

1.1.2.2 GAL(1-15) en la expresión de ARNm de los receptores de dopamina D1, D2, D3, D5, DAT, Vmat2, el receptor 5-HT1A y los receptores GALR1 y GALR2 en ATV, NAc y CPF.

Receptores D1, D2, D3 y D5 y transportadores DAT y Vmat2

Como se observa en la Tabla 2, la administración de GAL(1-15) modificó la expresión del receptor D3 en ATV y NAc. En ATV, GAL(1-15) 3nmol produjo un aumento significativo en los niveles de ARNm de D3 en comparación con animales basales ($F_{2,14} = 4.16$, $p = 0.04$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$; Tabla 2) mientras que en NAc, GAL(1-15) 3 nmol ($p < 0.01$) y LCRa ($p < 0.01$) indujeron una disminución significativa de la expresión del receptor de dopamina D3 en comparación con el grupo basal ($F_{2,11} = 11.41$, $p = 0.002$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$; Tabla 2).

En CPF, la administración del fragmento GAL(1-15) aumentó la expresión del receptor D1 en comparación con el grupo basal ($p < 0.001$) y el grupo control ($p < 0.01$) ($F_{2,12} = 12.83$, $P = 0.001$; Fisher's LSD; Tabla 2).

GAL(1-15) careció de efecto sobre los receptores de dopamina D2 y D5 en las tres áreas analizadas.

También se analizó la expresión de ARNm de los transportadores de dopamina, Vmat2 y DAT, en el ATV. Observamos que ratas bajo autoadministración de alcohol, mostraron una mayor expresión de Vmat2 en comparación con animales basales carentes de consumo previo de alcohol ($F_{2,12} = 7.03$, $p = 0.009$; Figura 3), sin observarse diferencias por los tratamientos, mientras que no hubo diferencias entre los grupos experimentales en los niveles de expresión de DAT en el ATV (Figura 3).

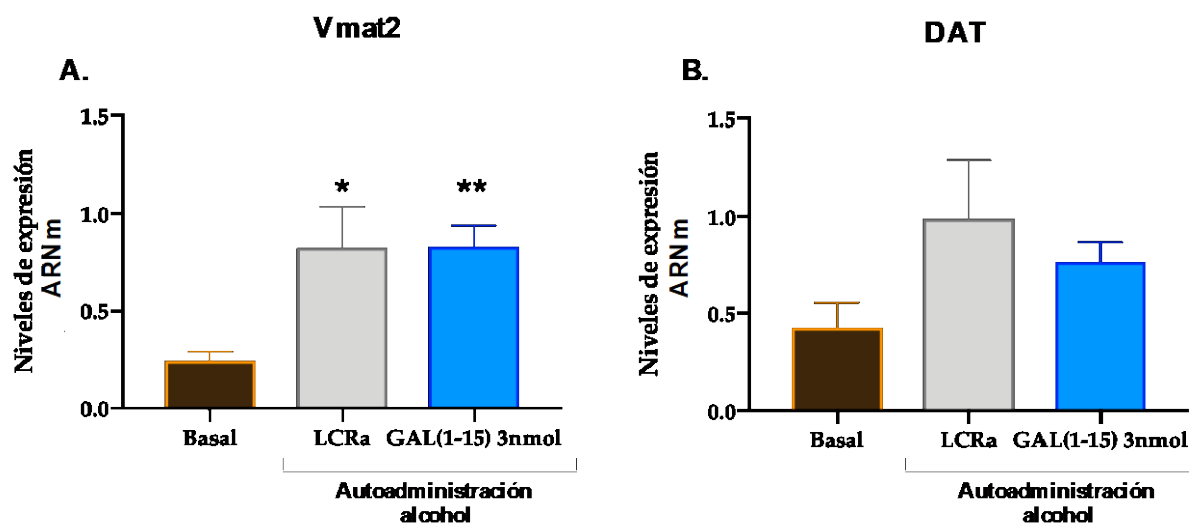


Figura 3. Efecto de GAL(1-15) en los niveles de expresión de ARNm de Vmat2 y DAT en el **Área Tegmental Ventral (ATV)**. Se inyectó GAL(1-15) (3 nmol) o LCRA icv una hora antes de las medidas. Se consideró como grupo basal a los animales sin consumo previo de alcohol en autoadministración. Se usaron ratas inyectadas con líquido cefalorraquídeo (LCRa) como grupo control. Las barras verticales representan una media $\pm$ error estándar de la media de la expresión de ARNm de DAT y Vmat2. **A.** * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto al grupo basal, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la diferencia mínima significativa de Fisher. **B.** No hay diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

Tabla 2. Efecto de GAL(1-15) en la expresión de ARNm de los receptores D1,D2,D3,D5, GALR1 y GALR2 en el ATV, NAc y CPF

	ATV			NAc			CPF		
	Autoadministración de alcohol			Autoadministración de alcohol			Autoadministración de alcohol		
	Basal	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol	Basal	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol	Basal	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol
D1	1.23 ± 0.31	1.70 ± 0.29	1.73 ± 0.50	2.15 ± 0.11	1.42 ± 0.12	2.72 ± 0.64	0.88 ± 0.17	0.93 ± 0.03	2.12 ± 0.2 ^{◇, **}
D2	3.33 ± 0.53	4.96 ± 1.09	4.38 ± 0.61	1.99 ± 0.21	1.47 ± 0.24	1.95 ± 0.35	0.97 ± 0.43	0.87 ± 0.19	0.93 ± 0.28
D3	0.35 ± 0.05	0.95 ± 0.42	2.11 ± 0.57*	5.26 ± 1.32	1.17 ± 0.12 [#]	1.17 ± 0.29*	1.71 ± 0.40	3.74 ± 2.02	2.08 ± 0.58
D5	1.00 ± 0.17	1.05 ± 0.17	1.01 ± 0.24	1.97 ± 0.44	1.22 ± 0.14	2.93 ± 1.07	2.12 ± 0.32	1.28 ± 0.34	1.53 ± 0.20
GALR1	0.59 ± 0.15	1.29 ± 0.25	0.90 ± 0.28	0.72 ± 0.17	0.79 ± 0.09	1.42 ± 0.36	2.77 ± 0.59	2.73 ± 0.68	4.71 ± 0.93
GALR2	2.54 ± 0.41	4.24 ± 0.99	3.72 ± 0.60	0.35 ± 0.02	0.72 ± 0.18	0.69 ± 0.15	1.81 ± 0.47	1.06 ± 0.14	1.16 ± 0.16
5-HT1A	0.57 ± 0.15	0.93 ± 0.07 ^z	1.19 ± 0.09**	1.62 ± 0.29	0.83 ± 0.05	1.58 ± 0.45	2.50 ± 0.44	1.30 ± 0.28 ^z	1.46 ± 0.15*

Tabla 2. Efecto de GAL(1-15) en D1,D2,D3,D5,GALR2 y 5-HT1A en los niveles de ARNm en ATV, NAc y CPF. GAL(1-15) o LCRa se administraron vía icv una hora antes de las medidas. Animales sin consumo previo de alcohol en autoadministración se consideraron el grupo basal. Animales inyectados con LCRa se consideraron el grupo control. **ATV.** D3: *p<0.05 con respecto al grupo basal; 5-HT1A: # p<0.05 con respecto al grupo basal; ** p<0.01 con respecto al grupo basal; NAc. D3 ## p<0.01 con respecto al grupo basal; ** p<0.01 con respecto al grupo basal; **CPF.** D1: ** p<0.01 con respecto al grupo basal; * p<0.05 con respecto al grupo basal; según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del tesdt post hoc de Fisher.

Receptor 5-HT1A

Respecto a la expresión del receptor 5-HT1A, en el área tegmental ventral, se observó que en aquellos animales que consumían alcohol de forma crónica la expresión de este receptor se mostraba incrementada, observándose una subida mayor en los animales tratados con GAL(1-15) ($F_{2,12}=8.59$, $p=0.005$; Fisher's LSD; $p < 0.01$) en comparación con el grupo control ($p < 0.05$). En la corteza prefrontal, tanto la administración de GAL(1-15) ($p < 0.05$) como la administración de LCRA ($p < 0.05$) produjo una disminución de los niveles de 5-HT1A en comparación con el grupo basal ($F_{2,13} = 4.63$, $p = 0.03$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$). Sin embargo, en el núcleo accumbens no se observaron diferencias en la expresión del receptor 5-HT1A entre los grupos experimentales (tabla 2).

Receptores GALR1 y GALR2

Al analizar la expresión de los receptores de Galanina GALR1 y GALR2 tras un período de autoadministración de alcohol, se observó que la administración de GAL(1-15) a la dosis de 3 nmol no tuvo efecto sobre la expresión de los receptores GALR1 y GALR2 en ninguna de las áreas analizadas (tabla 2).

1.1.3 Comparación del efecto de Galanina (GAL) y GAL(1-15).

Se administró una dosis efectiva de GAL(1-15) (3 nmol) y la molécula completa de GAL a una dosis de 3 nmol por vía icv. Se observó que el fragmento de GAL(1-15) a la dosis de 3 nmol redujo significativamente el número de refuerzos de alcohol ($F_{2,30} = 3.59$, $p=0.04$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$; Figura 4A) así como el número de pulsaciones a la palanca activa ($F_{2,30} = 3.15$, $p=0.06$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$; Figura 4B) en comparación con la molécula completa de GAL en la prueba de autoadministración de alcohol.

Además, se demostró que la molécula de GAL carece de efecto en el número de refuerzos y en las pulsaciones de palanca activa en comparación con los animales controles (Figura 4). Por tanto, GAL(1-15) y no la molécula completa GAL, presenta un papel específico en la reducción de la búsqueda de alcohol en un modelo operante de autoadministración.

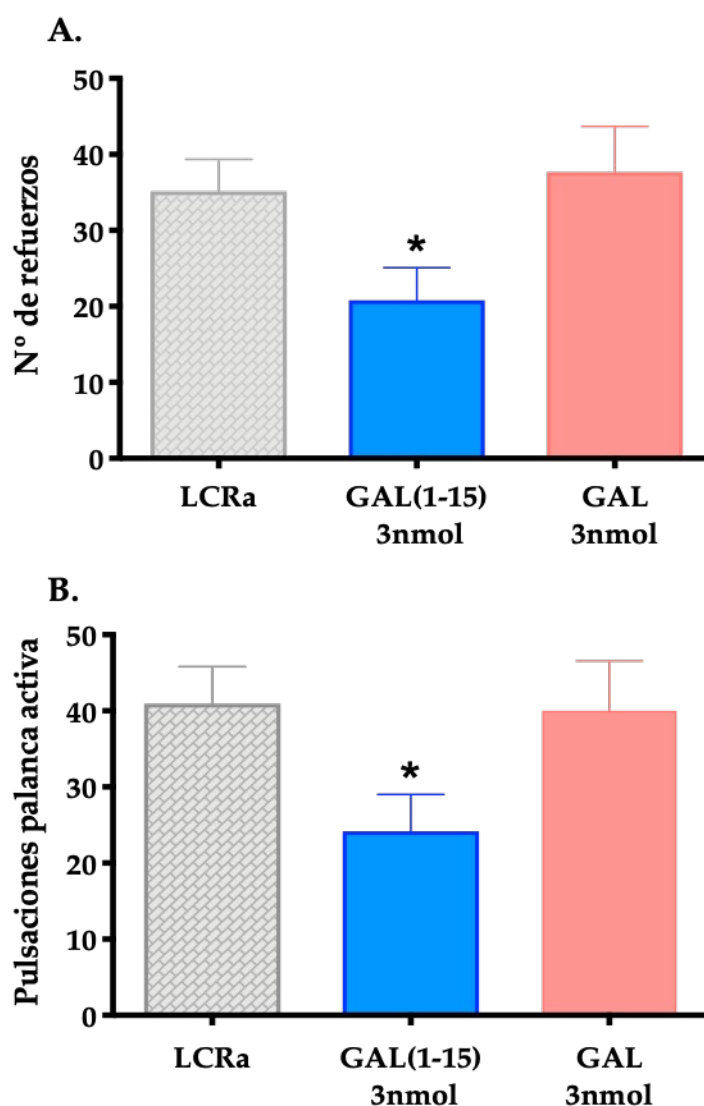


Figura 4. GAL y GAL(1-15) en la prueba de autoadministración de alcohol. Se administró GAL(1-15) 3 nmol, GAL 3 nmol o LCRa por vía icv 15 min antes de la prueba de autoadministración. Los animales administrados con LCRa se consideraron el grupo control. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media del número de refuerzos de alcohol y pulsaciones a la palanca activa durante la sesión de autoadministración. **A, B.** * $p < 0.05$ frente al resto de grupos, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

No se observaron diferencias entre los grupos experimentales sobre las pulsaciones a la palanca inactiva en la prueba de autoadministración de alcohol (Tabla 3).

Tabla 3. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol.

	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol	GAL 3 nmol
Pulsaciones palanca inactiva	2.2 ± 0.9	0.9 ± 0.3	1.4 ± 0.5

Tabla 3. Pulsaciones de palanca inactiva en la comparación de GAL y GAL(1-15) en autoadministración de alcohol Se administró GAL(1-15) 3 nmol, GAL 3 nmol o líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) por vía icv 15 min antes de la prueba. No existen diferencias significativas según el análisis de varianza (ANOVA) entre ninguno de los grupos experimentales en las pulsaciones a la palanca inactiva.

1.1.4 Papel de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto producido por GAL(1-15).

1.1.4.1 Antagonista del receptor GALR2, M871.

Para estudiar la implicación del receptor GALR2 en los resultados de GAL(1-15) en un modelo de autoadministración de alcohol, se administró por vía icv el antagonista del receptor GALR2, M871, a una dosis de 3 nmol junto el fragmento GAL(1-15) 3 nmol.

Se observó que la administración única del antagonista M871 a la dosis de 3 nmol, careció de efecto en el número de refuerzos y en el número de pulsaciones a la palanca activa en comparación con los animales controles en la prueba de autoadministración (Figura 5). Sin embargo, el antagonista M871 3 nmol, bloqueó de forma significativa la reducción producida por GAL(1-15), tanto en el número de refuerzos ($F_{3,33}= 3.03$; $p=0.04$ Fisher's LSD post hoc: $p <0.05$; Figura 5A) como en el número de pulsaciones a la palanca activa ($F_{3,33}=2.78$, $p=0.05$, Fisher's LSD post hoc: $p <0.05$; Figura 5B) en el test de autoadministración de alcohol.

Estos resultados sugieren un papel fundamental del receptor GALR2 en el efecto producido por la GAL(1-15) en la reducción de la motivación por el alcohol en un modelo de autoadministración.

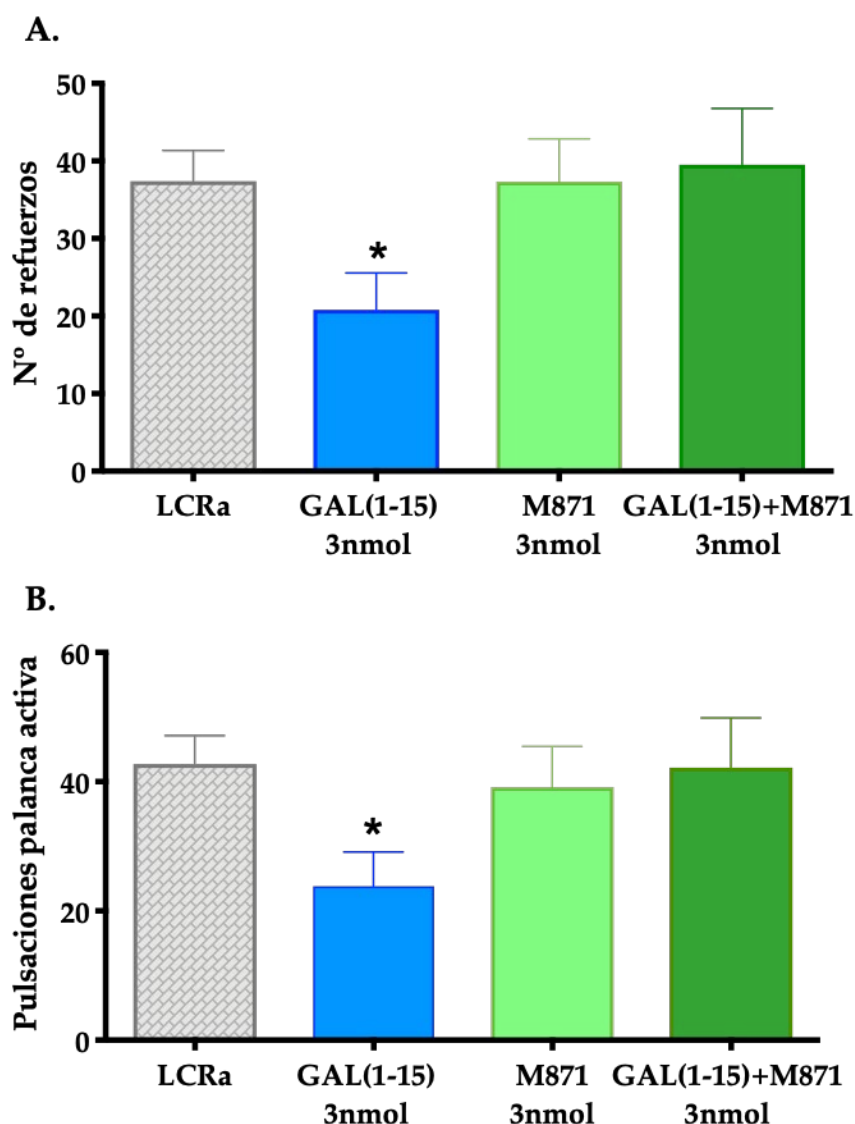


Figura 5. Administración del antagonista de GALR2, M871, en el estudio del efecto de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol. GAL(1-15) 3 nmol, antagonista de GALR2 M871 3 nmol, GAL(1-15) 3 nmol combinado con M871 3 nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba. Las barras verticales representan una media $\pm$ error estándar de la media del número de refuerzos de alcohol y de pulsaciones a la palanca activa durante la sesión de autoadministración. **A.** * $p < 0.05$ frente al resto de grupos experimentales **B.** * $p < 0.05$ frente a LCRa y GAL(1-15) + M871 3nmol; de acuerdo con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test post hoc de Fisher.

En cuanto a las pulsaciones de palanca inactiva, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura 4).

Tabla 4. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol.

	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol	M871 3 nmol	GAL(1-15) 3 nmol + M871 3 nmol
Pulsaciones palanca inactiva	2.3 ± 0.8	0.9 ± 0.3	1.8 ± 1.1	1.5 ± 0.6

Tabla 4. Pulsaciones de palanca inactiva en la administración del antagonista de GALR2 M871 en autoadministración de alcohol. GAL(1-15) 3 mol, el antagonista de GALR2 M871, GAL(1-15) 3 nmol combinado con el antagonista de GALR2 M871 3 nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba. No existen diferencias significativas según el análisis de varianza (ANOVA) entre ninguno de los grupos experimentales en las pulsaciones a la palanca inactiva.

1.1.4.2 Generación de animales knockdown para el estudio de los receptores GALR1 y GALR2 en el efecto inducido por GAL(1-15).

Una vez determinado el papel del receptor GALR2 en el efecto producido por GAL(1-15) en autoadministración de alcohol, comprobamos la implicación de dicho receptor y del receptor GALR1 mediante el uso de animales siRNA GALR1 o siRNA GALR2 en la prueba de autoadministración de alcohol. siRNA GALR1 o siRNA GALR2 se administraron de forma intracerebroventricular 8 días antes a la prueba de autoadministración, para obtener la mínima expresión de los receptores en el día del test. El grupo control fue administrado con el medio de cultivo Acell siRNA Delivery Media (Dharmacon, Lafayette, EE.UU), usado como vehículo, en las mismas condiciones.

Una vez inyectados, los animales realizaron las sesiones de autoadministración de alcohol al 10% diariamente y se monitorizó el efecto de la bajada de los receptores GALR1 y GALR2 en cada sesión de autoadministración hasta su mínima expresión, alcanzada a los 8 días (Figura 6).

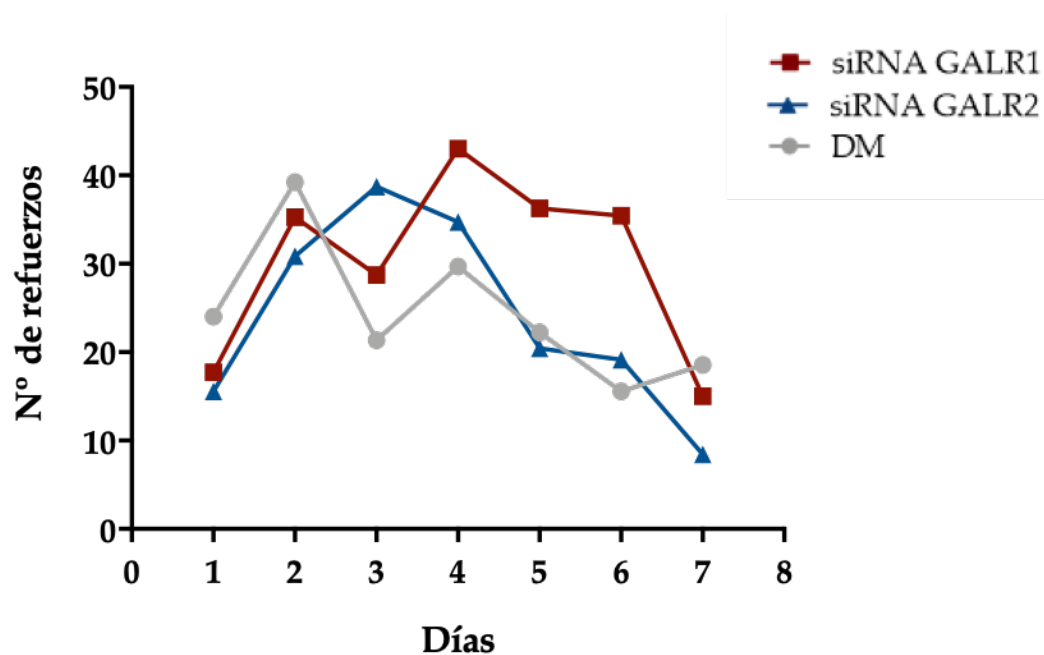


Figura 6. Representación gráfica del número de refuerzos obtenidos diariamente en las sesiones de autoadministración de alcohol en un modelo animal knockdown de los receptores GALR1 o GALR2. En el modelo animal knockdown se administró Delivery Media (DM), siRNA GALR1 o siRNA GALR2 por vía icv 8 días antes de la prueba. Se observa la evolución en el número de refuerzos obtenidos por los animales con el paso de los días.

El día 8, siendo el día de mínima expresión de los receptores GALR1 y GALR2 según estudios previos de nuestro grupo de investigación, GAL(1-15) se administró a la dosis de 3 nmol por vía intracerebroventricular 15 minutos antes de la prueba de autoadministración de alcohol. Se observó que la disminución de la expresión de los receptores GALR1 y GALR2 mediante siRNA no afectó a ningún parámetro evaluado en la prueba de autoadministración de alcohol (Figura 6). Sin embargo, la disminución de la expresión de los receptores GALR1 y GALR2 fue suficiente para bloquear el efecto de GAL(1-15) en la autoadministración de alcohol (Figura 6). Por tanto, GAL(1-15) a la dosis de 3 nmol careció de efecto en el número de refuerzos ($F_{2,18} = 0.34$, $p = 0.71$) así como en las pulsaciones a la palanca activa ($F_{2,18} = 0.52$, $p = 0.670$) e inactiva ($F_{2,18} = 1.07$, $p = 0.36$) (Tabla 5).

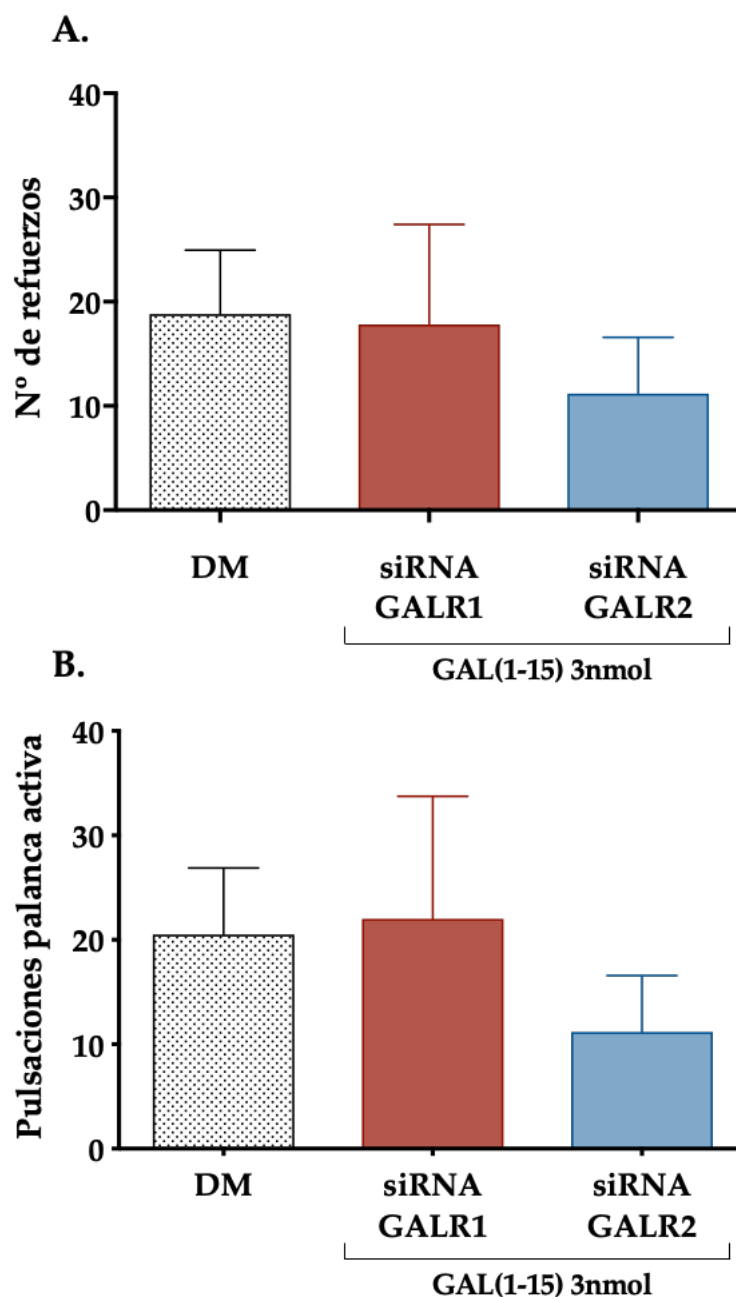


Figura 6. Efecto de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol en un modelo knockdown para los receptores GALR1 y GALR2. En el modelo animal knockdown se administró Delivery Media (DM), siRNA GALR1, siRNA GALR2 por vía icv 8 días antes de la prueba. GAL(1-15) o LCRA se administraron 15 minutos antes de la prueba de autoadministración. LCRA y DM se utilizaron como grupo control. Las barras verticales representan una media $\pm$ error estándar de la media del número de refuerzos de alcohol y de las pulsaciones a la palanca activa durante la sesión de autoadministración. **A, B.** No existen diferencias según un análisis de varianza de una vía (ANOVA) entre los grupos experimentales ni en el número de refuerzos ni en las pulsaciones de palanca activa.

Estos resultados indicarían que los receptores GALR1 y GALR2 tienen un papel fundamental en el efecto producido por la GAL(1-15) en autoadministración de alcohol.

Tabla 5. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol

	DM	siRNA GALR1	siRNA GALR2
Pulsaciones			
palanca inactiva	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.6	0.2 ± 0.2

Tabla 5. Pulsaciones de palanca inactiva en el modelo animal knockdown GALR1 y GALR2 en el estudio de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol. Valores correspondientes a las pulsaciones de palanca inactiva en un modelo animal Knockdown. Se administró Delivery Media (DM), siRNA GALR1, siRNA GALR2 por vía icv 8 días antes de la prueba. GAL(1-15) o LCRa se administraron 15 minutos antes de la prueba. No existen diferencias según un análisis de varianza de una vía (ANOVA) entre los grupos experimentales ni en el número de refuerzos ni en las pulsaciones a la palanca inactiva.

1.2 Modulación de GAL(1-15) sobre el grado de motivación por el alcohol: Ratio Progresivo.

En las sesiones de autoadministración, los animales mostraron una autoadministración de alcohol estable en FR3, tal y como se observa en la figura 7.

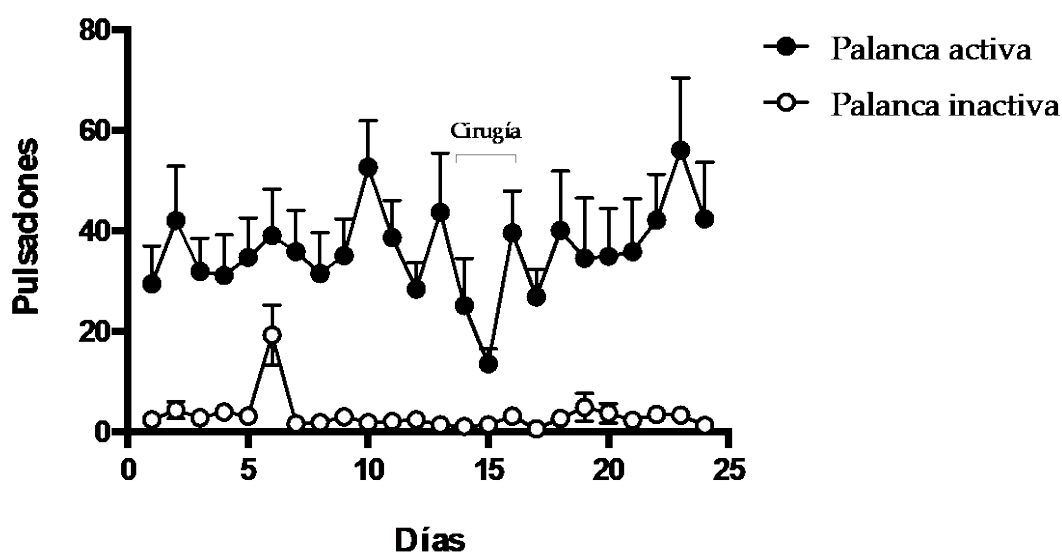


Figura 7. Entrenamiento operante en FR3 en autoadministración de alcohol. Los animales mostraron una autoadministración de alcohol estable durante la fase de respuesta operante FR3

En el test del Ratio Progresivo, se administró por vía intracerebroventricular GAL(1-15) 3 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba de autoadministración. Se observó que aquellos animales que habían sido inyectados con GAL(1-15) a la dosis de 3 nmol mostraron un punto de ruptura o *breaking point* más bajo en comparación con el grupo control ($t_{23} = 1.71$; $p < 0.05$; Figura 8). Estos animales manifestaron significativamente menos pulsaciones durante el test de Ratio Progresivo ($t_{23} = 1.72$; $p < 0.05$; Figura 8). Por tanto, el fragmento GAL(1-15) disminuyó la motivación de los animales en la búsqueda de alcohol.

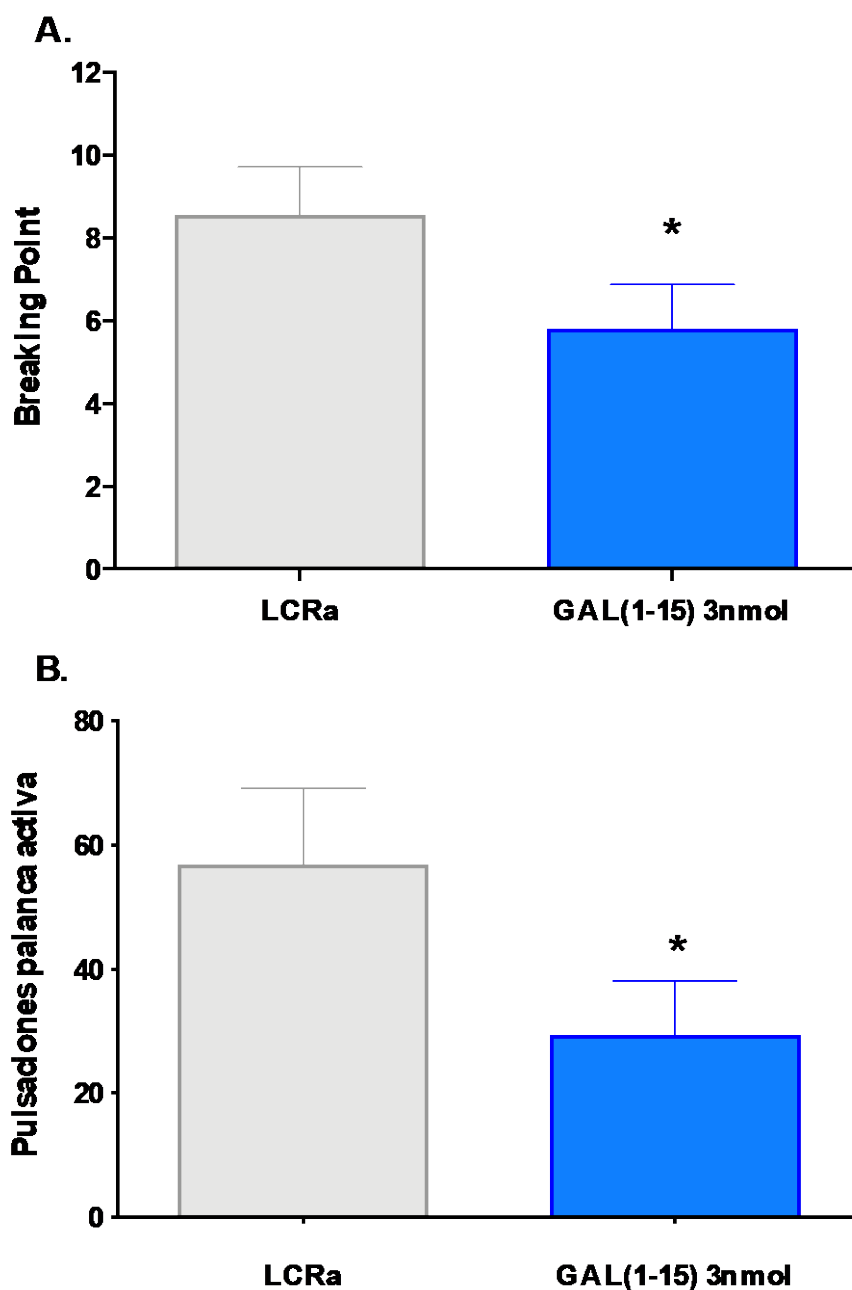


Figura 8. Efecto de la administración de GAL(1-15) sobre la motivación por la búsqueda de alcohol. GAL(1-15) 3 nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba. Se usaron ratas inyectadas con LCRa como grupo de control. Las barras verticales representan una media $\pm$ error estándar de la media del punto de ruptura o *breaking point* y de las pulsaciones a la palanca activa durante la hora del test. **A, B.** * $p < 0.05$ respecto al grupo control; según la prueba t de Student.

En cuanto a las pulsaciones de palanca inactiva en el Test del Ratio Progresivo, no se encontraron diferencias entre ambos grupos experimentales (tabla 6).

Tabla 6. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de ratio progresivo

	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol
Pulsaciones		
palanca inactiva	3.8 ± 2.1	2.5 ± 1.3

Tabla 6. Pulsaciones de palanca inactiva en el Test de Ratio Progresivo. GAL(1-15) 3 nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba. No existen diferencias significativas según el análisis de varianza (ANOVA) entre ninguno de los grupos experimentales en las pulsaciones a la palanca inactiva.

1.3 Efecto de GAL(1-15) en recaída alcohólica por contexto.

EXTINCIÓN ALCOHÓLICA

En el entrenamiento en las cajas de autoadministración en FR1 en el Contexto A, los animales mostraron una autoadministración de alcohol estable a lo largo de las 25 sesiones (figura 9).

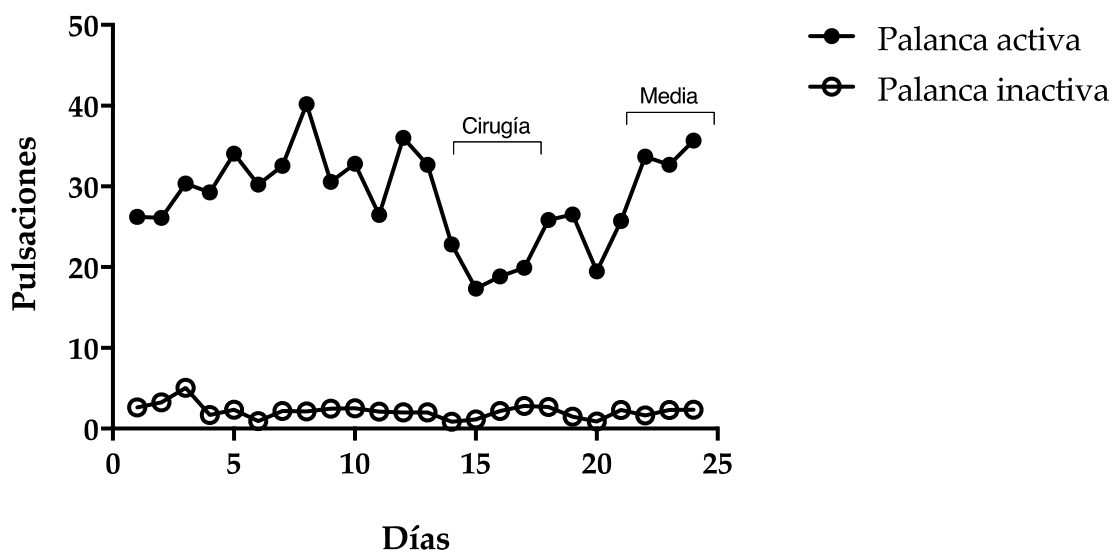


Figura 9. Representación de las pulsaciones activas e inactivas durante el período de autoadministración de alcohol al 10%. Los animales mostraron una autoadministración de alcohol estable durante la fase de respuesta operante FR1.

Posteriormente, se procedió a realizar la extinción de la conducta aprendida mediante la modificación del contexto original vinculado a la recompensa, así como a la modificación de los estímulos discriminativos asociados a la entrega de alcohol al 10% (Contexto B).

Se analizó el papel de GAL(1-15) en el primer día de extinción. Para ello, GAL(1-15) se administró a la dosis de 3 nmol así como el grupo control se inyectó LCRA, 15 minutos antes de la sesión de extinción. En este primer día de extinción no se observaron diferencias significativas tras la administración de los tratamientos en las pulsaciones a la palanca activa entre ambos grupos experimentales (tabla 7). Los animales inyectados con GAL(1-15) 3 nmol mostraron un ligero aumento en el número de pulsaciones de palanca inactiva comparado con el grupo control ($t_{21}=1.78$; $p < 0.05$; tabla 7).

Tabla 7. Pulsaciones de palanca activa e inactiva en el primer día de extinción

	LCRa	GAL(1-15) 3nmol
Palanca activa	13.4 ± 1.2	13.8 ± 1.6
Palanca inactiva	0.5 ± 0.2	1.5 ± 0.5 *

Tabla 7. Efecto de GAL(1-15) en el primer día de extinción alcohólica. Se administraron GAL(1-15) 3 nmol o LCRa icv 15 minutos antes de la prueba. Los datos representan una media ± error estándar de la media de las palancas activas e inactivas presionadas durante una hora. Palanca inactiva: *p <0.05 respecto a LCRa, según prueba t de Student. No hay diferencias en las pulsaciones a la palanca activa entre los grupos experimentales.

Tras el primer día de extinción, las sesiones continuaron diariamente y, como se puede observar en la figura 10, progresivamente los animales fueron disminuyendo las pulsaciones a la palanca activa hasta alcanzar el criterio de extinción: dos sesiones consecutivas con un número de pulsaciones a la palanca activa inferior al 20% de la línea base de cada animal (Lebourgeois et al., 2018). Los animales realizaron las sesiones de extinción diariamente hasta que en el día 13 (Figura 10) se alcanzó el criterio de extinción.

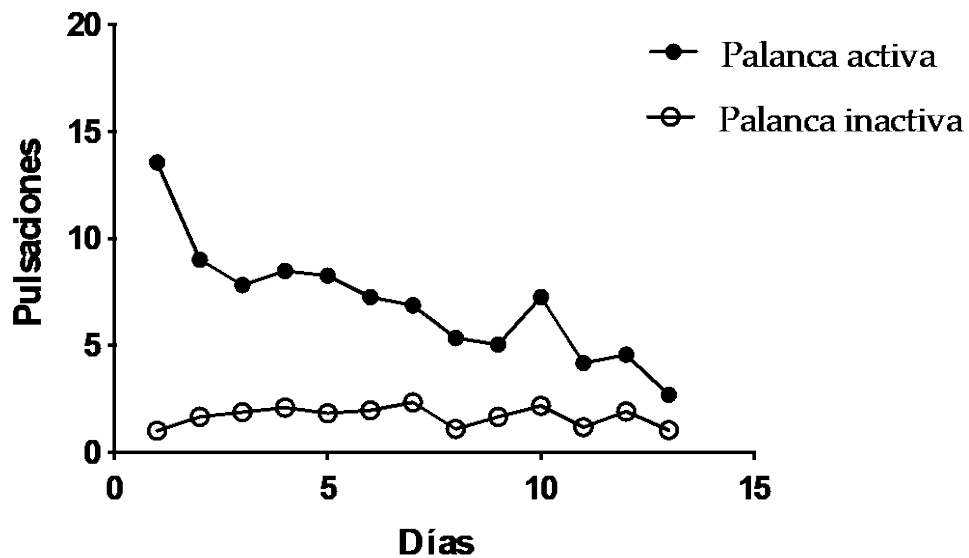


Figura 10. Pulsaciones a la palanca activa e inactiva durante el período de extinción. Los animales mostraron una reducción en las pulsaciones a la palanca activa durante el período de extinción.

RECAÍDA ALCOHÓLICA

Una vez alcanzado el criterio de extinción, se realizó el Test de Recaída Alcohólica. Este test tuvo una duración de una hora y se llevó a cabo en el Contexto A.

En la Figura 11 se muestran los resultados de esta prueba donde se puede observar como el grupo control, inyectado con LCRa, mostró un aumento de las pulsaciones de palanca activa comparadas con las pulsaciones registradas durante el período de extinción ($p < 0.001$), indicando por tanto una recaída.

Sin embargo, los animales inyectados con GAL(1-15) mostraron una reducción significativa en las pulsaciones a la palanca activa en comparación con el grupo control ($F_{2,43}=40.79$, $p < 0.0001$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$), de forma que estos animales tuvieron una menor recaída en la búsqueda de alcohol. A la vista de estos resultados, podemos sugerir que el fragmento GAL(1-15) tiene un papel específico en la recaída alcohólica por contexto.

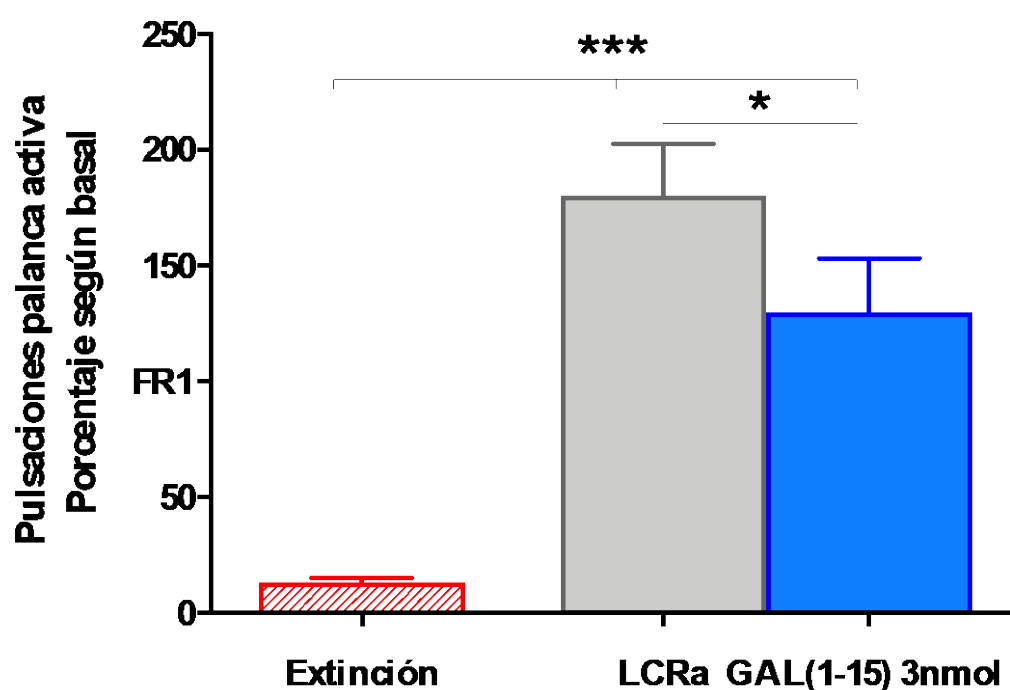


Figura 11. Efecto de GAL(1-15) en recaída alcohólica por contexto. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media de las pulsaciones a la palanca activa según el porcentaje con respecto al basal de cada animal en FR1. El período de extinción corresponde a la media de las pulsaciones de palanca activa de los tres días previos al test de Recaída Alcohólica en porcentaje con respecto al basal de cada animal en FR1. * $p < 0.05$ respecto al grupo control; *** $p < 0.001$ período de extinción respecto al grupo control, GAL(1-15); según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

1.4 Efecto de GAL(1-15) por la vía de administración intranasal.

Se analizó si la vía intranasal era compatible con el uso del fragmento de GAL(1-15). Para ello, grupos de animales se entrenaron para autoadministrarse alcohol al 10% en un Ratio Fijo FR1. Tras un consumo estable de alcohol al 10%, se administró por vía intranasal GAL(1-15) 75 μ g o agua destilada, si se trataba del grupo control, una hora antes del test de autoadministración.

Como se observa en la figura 12, la dosis de 75 μ g de GAL(1-15) redujo de forma significativa el número de refuerzos de alcohol ($t_{17}=2.69$; $p < 0.01$) así como las pulsaciones a la palanca activa ($t_{17}=2.82$; $p < 0.01$) en el test de autoadministración. Podemos observar que a través de la vía de administración intranasal, el fragmento GAL(1-15) también demuestra un efecto en la reducción de la búsqueda de alcohol en un modelo operante de autoadministración, lo que podría establecer una vía de administración de GAL(1-15) compatible para su uso futuro en humanos.

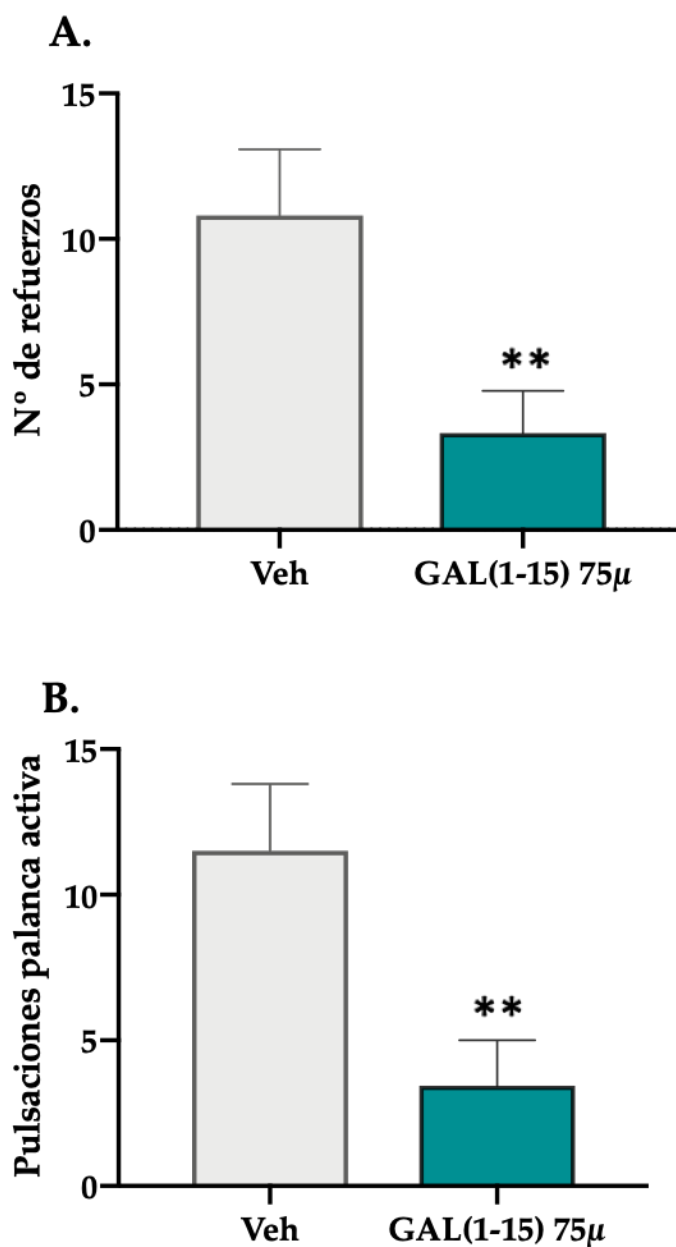


Figura 12. Administración intranasal de GAL(1-15) en un modelo operante de autoadministración de alcohol. GAL(1-15) 75 μ g o agua destilada se inyectaron una hora antes de la sesión de alcohol por vía intranasal, 10 μ l de sustancia por cada orificio nasal. Los animales inyectados con agua destilada se consideraron el grupo control. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de la media del número de refuerzos y pulsaciones de palanca activa durante la sesión de 30 minutos de autoadministración de alcohol. ** $p < 0.01$ respecto al grupo control según el estadístico t de Student.

No se observaron diferencias en las pulsaciones de palanca inactiva entre ambos grupos experimentales durante el test (Tabla 8).

Tabla 8. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol

	Veh	GAL(1-15) 75 µg
Pulsaciones palanca inactiva	0.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1

Tabla 8. Pulsaciones de palanca inactiva tras la administración intranasal de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol. GAL(1-15) 75 µg o agua destilada se inyectaron una hora antes de la sesión de alcohol por vía intranasal, 10 µl de sustancia por cada orificio nasal. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. No existen diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

1.5 GAL(1-15) en la cepa Marchigian Sardinian (msP): un modelo animal con alta preferencia por el alcohol.

Para este estudio se ha utilizado un modelo de rata alcohólica, la cepa msP, la cual tiene una alta preferencia por el alcohol. Para ello, ratas macho y ratas hembra se entrenaron en las cajas de autoadministración para obtener alcohol al 10% en un Ratio Fijo FR1. Tanto machos como hembras mostraron una alta tasa de respuestas a la recompensa de alcohol a lo largo de las sesiones, como se observa en la figura 13.

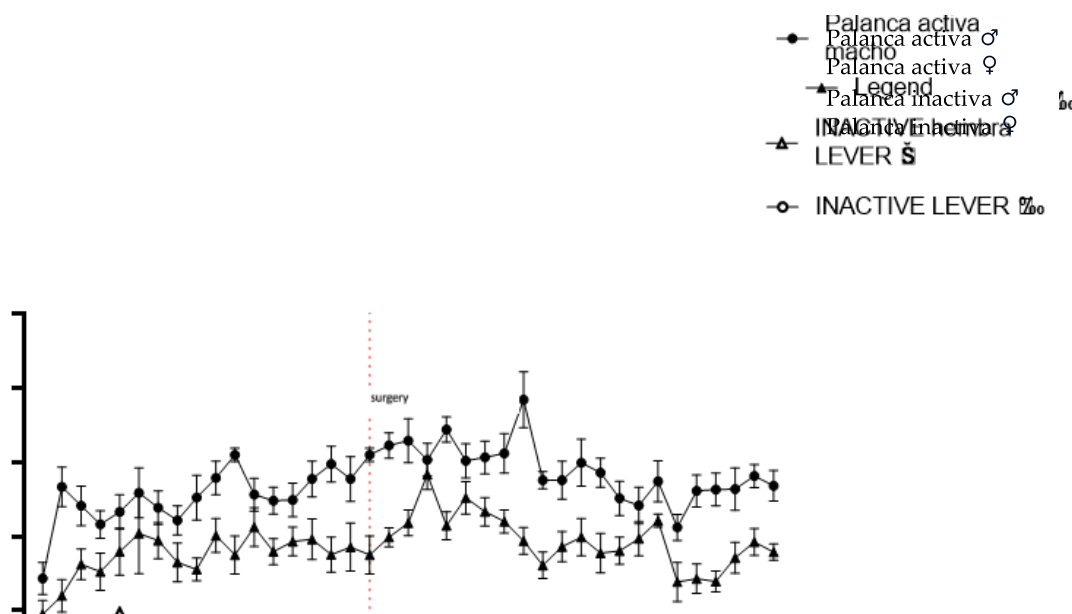


Figura 13. Representación de las pulsaciones a la palanca activa e inactiva durante el período de autoadministración de alcohol. Los animales mostraron una autoadministración de alcohol estable durante la fase de respuesta operante FR1.

GAL(1-15) 3 nmol, 6 nmol o LCRA se administraron intracerebroventricularmente 15 minutos antes de la prueba de autoadministración de alcohol. No se observaron diferencias entre el grupo inyectado con GAL(1-15) y el grupo control ni en el número de refuerzos ni en pulsaciones a la palanca activa en la sesión de treinta minutos de autoadministración. Tampoco se observaron diferencias en los parámetros evaluados en autoadministración de alcohol ni en machos ni en hembras (Figura 14).

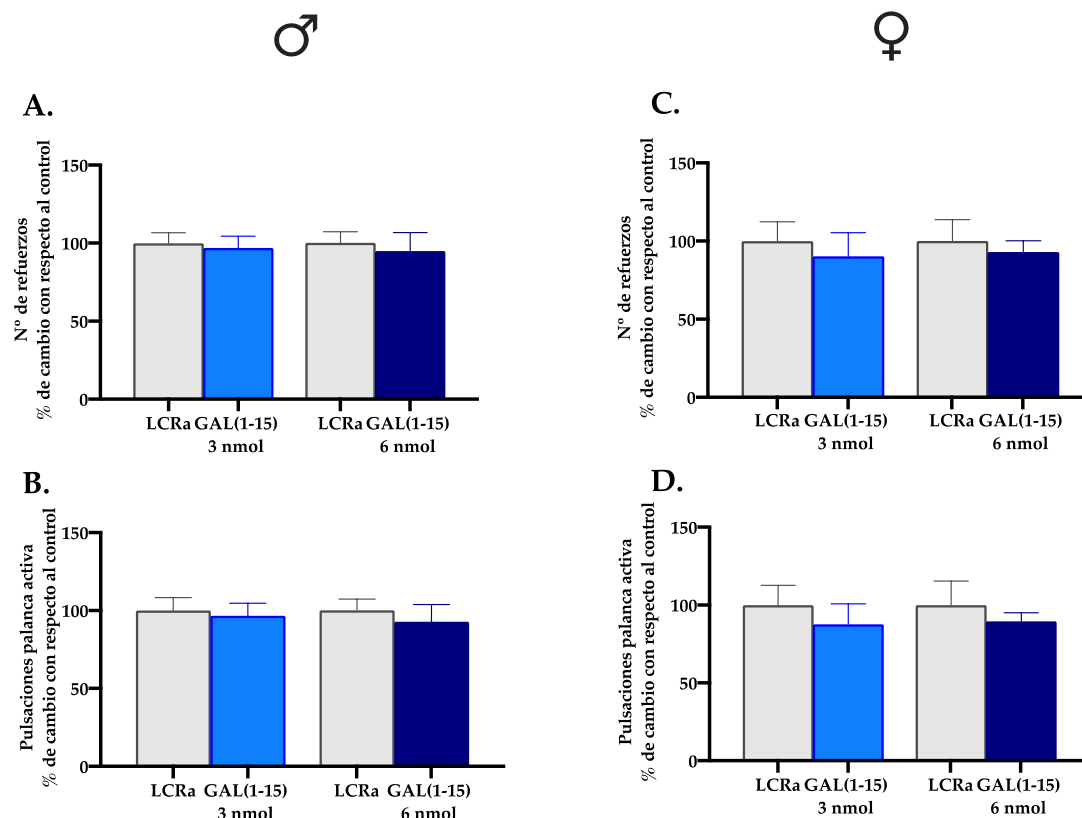


Figura 14. Efecto de GAL(1-15) en la cepa alcohólica msP. Ratas macho y ratas hembra se inyectaron con GAL(1-15) 3 nmol, 6 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba de autoadministración. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media del número de refuerzos y de las pulsaciones de palanca activa en función del % de cambio con respecto al grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ni en machos ni en hembras en el número de refuerzos ni en las pulsaciones a la palanca activa.

En relación con las pulsaciones de palanca inactiva, tampoco se observaron diferencias ni entre los grupos experimentales ni en machos ni en hembras (tabla 9).

Tabla 9. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol

Pulsaciones palanca inactiva	LCRa	GAL(1-15) 3 nmol	LCRa	GAL(1-15) 6 nmol
♂	100 ± 38.4	85.7 ± 33.5	100 ± 22.5	111.1 ± 41.5
♀	100 ± 28.0	57.6 ± 15.7	100 ± 26.7	66.7 ± 23.6

Tabla 9. Pulsaciones de palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol en la cepa alcohólica msP. Ratas macho y ratas hembra se inyectaron con GAL(1-15) 3 nmol, 6 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba de autoadministración. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de las pulsaciones de palanca inactiva en función del % de cambio con respecto al grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ni en machos ni en hembras en las pulsaciones de palanca inactiva.

2. GAL(1-15) EN COMBINACIÓN CON EL ANTIDEPRESIVO ESCITALOPRAM (ESC) EN LA COMORBILIDAD ALCOHOLISMO Y DEPRESIÓN.

Una vez analizado el papel de GAL(1-15) en la búsqueda y la motivación por el alcohol así como los núcleos implicados, se estudió el efecto de este fragmento en combinación con un antidepresivo, el ESC, en diferentes pruebas que evalúan anhedonia con reforzadores como la sacarosa o la sacarina y finalmente, dicha combinación se evaluó en el consumo crónico de alcohol en autoadministración.

2.1 Efecto de GAL(1-15) y ESC en la Prueba de Preferencia de Sacarosa (SPT).

2.1.1 Curva dosis-respuesta de ESC en el SPT.

Inicialmente, se realizó una curva dosis-respuesta del antidepresivo ISRS, ESC, en el Test de Preferencia de Sacarosa. Para esto, ESC o suero salino se administraron de forma intraperitoneal 23, 5 y 1 hora antes de comenzar la prueba. Las medidas se realizaron a las 2h y a las 24h del comienzo del test.

En el Test de Preferencia de Sacarosa, la administración de ESC 7.5 mg/Kg indujo una reducción significativa en el consumo de sacarosa ($F_{2,25}=4.46$, $p=0.02$, Fisher's LSD post hoc: $p<0.01$), tanto en la preferencia de sacarosa ($F_{2,25}=4.65$, $p=0.01$, Fisher's LSD post hoc: $p<0.05$) como en el consumo total de líquidos ($F_{2,25}=5.31$; $p=0.01$; Fisher's LSD post hoc: $p<0.01$) en comparación con el grupo control a las 2 horas (tabla 10). Sin embargo, la dosis de 10 mg/Kg de ESC a las 2 horas careció de efecto tanto en el consumo de sacarosa como en la preferencia comparado con los animales controles (tabla 10).

En la medida de los parámetros del test a las 24 horas, no se observaron diferencias significativas en las distintas dosis probadas de ESC (tabla 11).

Tabla 10. Parámetros del test de preferencia de sacarosa a las 2 horas

MEDIDA A LAS 2 HORAS				
Tratamiento	Consumo de sacarosa (g/Kg)	Preferencia de sacarosa (%)	Consumo de agua (g/Kg)	Consumo total de líquidos (mL)
Suero salino	0.4 ± 0.04	78.2 ± 4.8	12.2 ± 2.8	24.7 ± 2.1
ESC 7.5 mg/Kg	0.2 ± 0.1 **	62.7 ± 5.7 #	10.9 ± 1.8	13.9 ± 2.1**
ESC 10 mg/Kg	0.4 ± 0.05	84.2 ± 3.1 ##	6.1 ± 1.1	19.5 ± 2.5

Tabla 10. Curva dosis-respuesta de ESC en el Test de Preferencia de Sacarosa a las 2h. ESC o salino se administraron de forma intraperitoneal (ip) 23, 5 y 1 hora antes del test. El grupo inyectado con suero salino se consideró el grupo control. Los datos representan la media ± error estándar de la media del consumo de sacarosa (g/Kg), preferencia de sacarosa (%), el consumo de agua (g/Kg) y el consumo total de líquidos (mL). # p <0.05 frente al grupo control; ** p <0.01 frente al grupo control; ## p <0.01 frente a ESC 7.5 mg/Kg; según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

Tabla 11. Parámetros del test de preferencia de sacarosa a las 24 horas

MEDIDA A LAS 24 HORAS				
Tratamiento	Consumo de sacarosa (g/Kg)	Preferencia de sacarosa (%)	Consumo de agua (g/Kg)	Consumo total de líquidos (mL)
Suero salino	1.3 ± 0.1	85.9 ± 2.2	21.4 ± 3.5	73.2 ± 6.9
ESC 7.5 mg/Kg	1.2 ± 0.2	79.9 ± 4.4	26.0 ± 3.8	65.2 ± 10.8
ESC 10 mg/Kg	1.3 ± 0.2	87.5 ± 3.1	16.2 ± 2.9	66.9 ± 9.1

Tabla 11. Curva dosis-respuesta de ESC en el Test de Preferencia de Sacarosa a las 24 h. Los datos representan la media ± error estándar de la media del consumo de sacarosa (g/Kg), preferencia de sacarosa (%), el consumo de agua (g/Kg) y el consumo total de líquidos (mL). No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los parámetros evaluados en la medida de las 24h.

2.1.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en el SPT.

Con el objetivo de estudiar el efecto del fragmento GAL(1-15) junto el antidepresivo ESC en una prueba que evalúa anhedonia, se procedió a administrar esta combinación en el Test de Preferencia de Sacarosa. Para ello y en función de los resultados del apartado anterior, se eligió la dosis de ESC de 10 mg/Kg. ESC o suero salino se administraron ip 23, 5 y 1 hora antes de la prueba mientras que GAL(1-15) a la dosis de 1 nmol o LCRA se administraron por vía intracerebroventricular 15 minutos antes de la prueba, donde se evalúan distintos parámetros a las 2 horas y a las 24 horas del inicio de la prueba.

Como se observa en la figura 15, GAL(1-15) potencia la reducción de la capacidad de refuerzo mediada por el ESC en el Test de Preferencia de Sacarosa. La coadministración de ESC 10 mg/Kg junto con GAL(1-15) 1 nmol a las 2 horas indujo una disminución en el consumo de sacarosa ($F_{2,23}=6.89$, $P=0.004$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) así como en la preferencia de sacarosa ($F_{2,23}=4.80$, $p=0.01$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$) en comparación con el grupo administrado con ESC 10 mg/Kg, este efecto se mantiene a las 24 horas de la administración de los tratamientos, tanto en el consumo de sacarosa ($F_{2,23}= 2.57$; $p= 0.098$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) como en la preferencia ($F_{2,23}=5.60$; $p=0.01$; Fisher's post hoc: $p < 0.01$) (figura 16).

Con respecto al consumo de agua, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales en la medida de las 2 horas (figura 15). Sin embargo, a las 24 horas, se observa un aumento significativo en el consumo de agua en el grupo administrado con GAL(1-15) 1 nmol + ESC 10 mg/Kg frente al grupo control ($F_{2,23}=4.23$; $p=0.027$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) y frente al grupo administrado solo con ESC 10 mg/Kg ($p < 0.01$) (figura 16).

El grupo de coadministración presenta una disminución en el consumo total de líquidos ($F_{2,23}=7.364$; $p=0.003$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) así como el grupo de ESC 10 mg/Kg ($p < 0.01$) con respecto al grupo control (figura 15), efecto que desaparece a las 24 horas (figura 16).

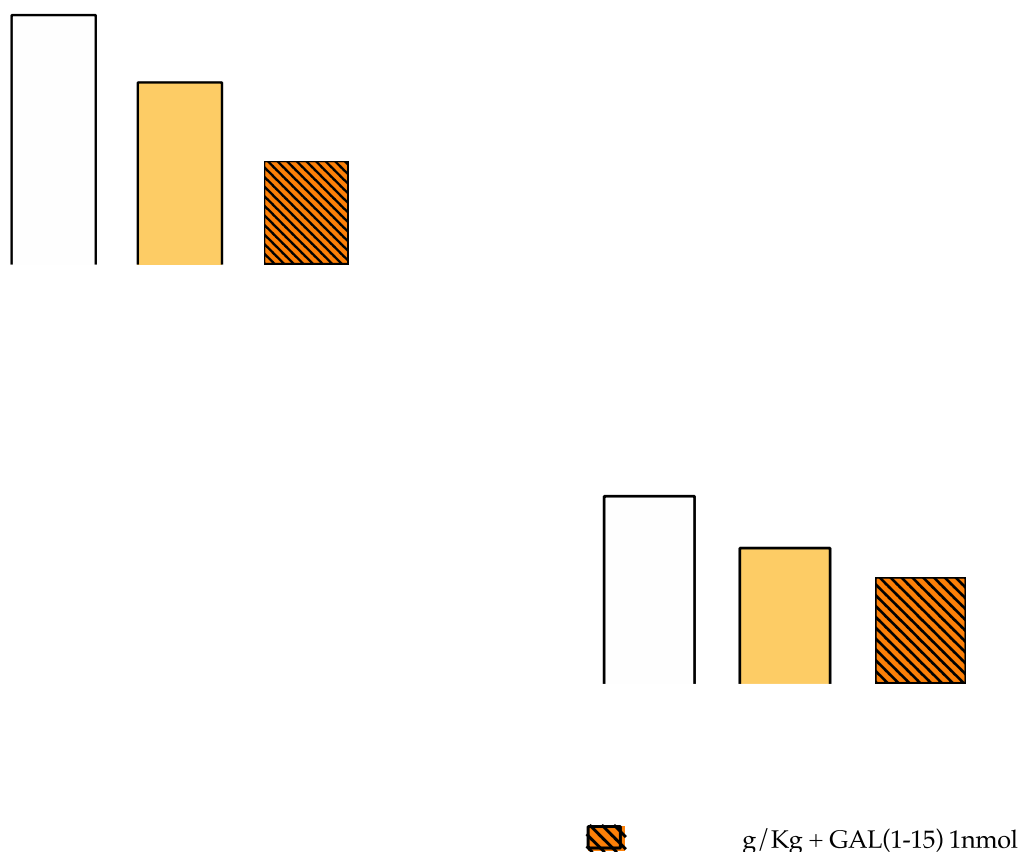


Figura 15. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en el Test de Preferencia de Sacarosa a las 2 horas. ESC o salino se administraron de forma ip 23, 5 y 1 hora antes del test. GAL(1-15) o LCRA se administraron 15 minutos antes de la prueba. Los animales inyectados con suero salino y LCRA se consideraron el grupo control. Las barras verticales representan la media $\pm$ el error estándar de la media del consumo de sacarosa (g/Kg), la preferencia de sacarosa (%), el consumo de agua (g/kg) y el fluido total (mL) medido a las dos horas. **A.** * $p < 0.05$ con respecto al grupo ESC 10 mg/Kg; ** $p < 0.01$ con respecto al control. **B.** * $p < 0.05$ con respecto al grupo control; ** $p < 0.01$ con respecto a ESC 10 mg/Kg. **C.** No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales en el consumo de agua. **D.** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; con respecto al grupo control, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

B.

C.

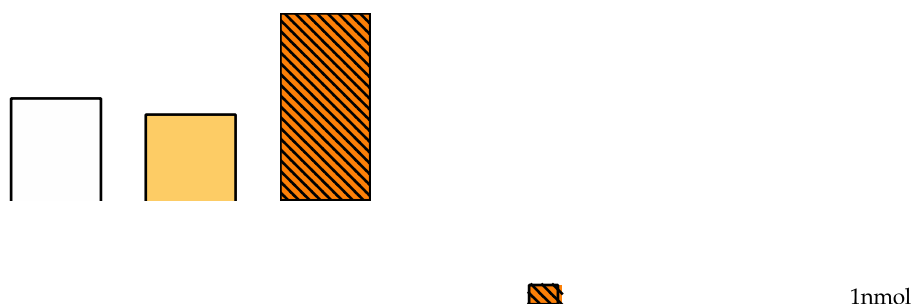


Figura 16. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en el Test de Preferencia de Sacarosa a las 24 horas. ESC o salino se administraron de forma ip 23, 5 y 1 hora antes del test. GAL(1-15) o LCRA se administraron 15 minutos antes de la prueba. Los animales inyectados con suero salino y LCRA se consideraron el grupo control. Las barras verticales representan la media $\pm$ el error estándar de la media del consumo de sacarosa (g/Kg), la preferencia de sacarosa (%), el consumo de agua (g/kg) y el fluido total (ml) medida a las 24 horas. **A.** * $p < 0.05$ con respecto al control. **B.** * $p < 0.05$ con respecto al grupo control; ** $p < 0.01$ con respecto a ESC 10 mg/Kg. **C.** * $p < 0.05$ con respecto a ESC 10 mg/Kg; grupo control; según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher. **D.** No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales en el consumo de líquido total a las 24 horas.

2.2 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

2.2.1 Curva dosis-respuesta de ESC en autoadministración de sacarina.

Una vez probada la combinación de GAL(1-15)+ESC en el Test de Preferencia de Sacarosa, el siguiente paso fue estudiar el efecto de la coadministración del fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo ESC en un modelo operante, como es la autoadministración. En primer lugar, se probó el efecto de esta combinación en el Test de autoadministración de sacarina. Para ello, los animales se entrenaron en las cajas de autoadministración con sacarina al 0.2 % de lunes a viernes en sesiones de 30 minutos durante aproximadamente tres semanas. Los animales se entrenaron en la tarea de autoadministración y alcanzaron un consumo estable de sacarina (figura 17).

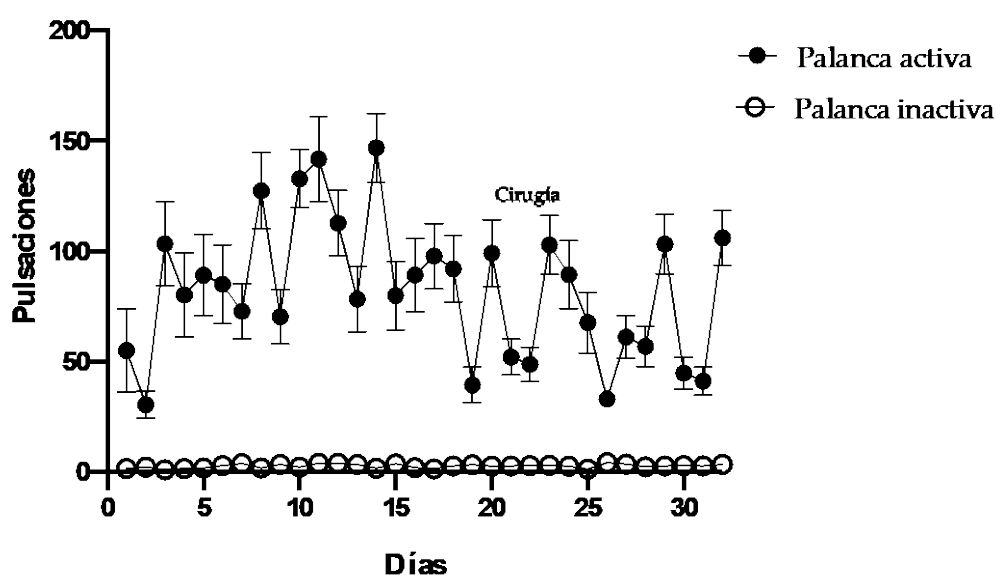


Figura 17. Representación de las pulsaciones a la palanca activa e inactiva durante en el entrenamiento en autoadministración de sacarina 0.2%.

Una vez realizada la cirugía a los animales y manteniendo un consumo estable de sacarina al 0.2%, se procedió a realizar la curva dosis-respuesta de ESC en autoadministración de sacarina. Las dosis de ESC utilizadas fueron 2.5, 5 y 7 mg/Kg inyectados de forma ip 23, 5 y 1 hora antes del test. Los animales inyectados con suero salino se consideraron el grupo control.

Tabla 12. Cuva dosis-respuesta de sacarina en autoadministración de sacarina

% con respecto al basal en FR1			
Tratamiento	Nº de refuerzos	Pulsaciones palanca activa	Pulsaciones palanca inactiva
Suero salino	203.6 ± 34.2	197.3 ± 33.7	90.2 ± 20.6
ESC 2.5 mg/Kg	123.4 ± 37.8	119.8 ± 37.6	100.7 ± 38.9
ESC 5 mg/Kg	80.2 ± 27.7 *	74.8 ± 25.0 *	45.9 ± 17.7
ESC 7.5 mg/kg	51.3 ± 10.6 ***	50.9 ± 10.5 ***	16.9 ± 6.2

Tabla 12. Curva dosis-respuesta de ESC en el test de autoadministración de sacarina. ESC o suero salino se administraron ip 23, 5 y 1 hora antes del test. Los datos representan la media ± error estándar de la media del número de refuerzos de sacarina, palancas activas y palancas inactivas según el porcentaje con respecto al basal en FR1. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ con respecto al control, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

En el test de autoadministración de sacarina (tabla 12), la dosis de ESC de 5 mg/Kg ($p < 0.05$) y 7.5 mg/Kg ($p < 0.001$) redujeron de forma significativa el número de refuerzos de sacarina ($F_{3,46}=5.05$, $p=0.004$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$, $p < 0.001$) en un 60% y un 75% respectivamente, así como en el número de pulsaciones a la palanca activa ($F_{3,46}=4.89$, $p= 0.004$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$, $p < 0.001$) en comparación con el grupo control.

Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de pulsaciones a la palanca inactiva en dichas dosis. La dosis de ESC 2.5 mg/Kg careció de efecto en todos los parámetros evaluados en el test de autoadministración de sacarina.

2.2.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

Se analizó ESC a distintas dosis junto con el fragmento GAL(1-15) a la dosis de 1 nmol para estudiar el efecto de esta combinación en el test de autoadministración de sacarina.

En primer lugar, los animales se inyectaron de forma ip con ESC 7.5 mg/Kg o suero salino 23, 5 y 1 hora antes del test. GAL(1-15) o LCRa se administraron intracerebroventricularmente 15 minutos antes del test de autoadministración.

La dosis de ESC (7.5 mg/kg) indujo una reducción significativa en el número de refuerzos ($F_{2,20}=10.2$, $p = 0.0009$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.001$ Figura 18A) y en las pulsaciones de palanca activa ($F_{2,20} = 9.25$, $p = 0.001$, LSD de Fisher post-hoc: $p < 0.01$; figura 18B) comparado con el grupo control. La coadministración de ESC 7.5mg/kg junto con GAL(1-15) 1 nmol, también indujo una fuerte reducción en el número de refuerzos ($p < 0.001$) y pulsaciones de palanca activa ($p < 0.01$) en comparación con los animales controles (Figura 18). La dosis de ESC 7.5 mg/Kg es demasiado potente para poder observar una potenciación del efecto en el grupo de coadministración. Aunque no se observa ninguna diferencia entre ESC y GAL(1-15) no podemos descartar que en las pulsaciones a la palanca inactiva, los animales inyectados con ESC 7.5 mg/Kg disminuyeron las pulsaciones sobre esta palanca con respecto al grupo control ($F_{2,20} = 4.70$; $p=0.02$; Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) mientras que el grupo de coadministración no mostró ningún tipo de respuesta en este parámetro ($p < 0.01$; Figura 18C).

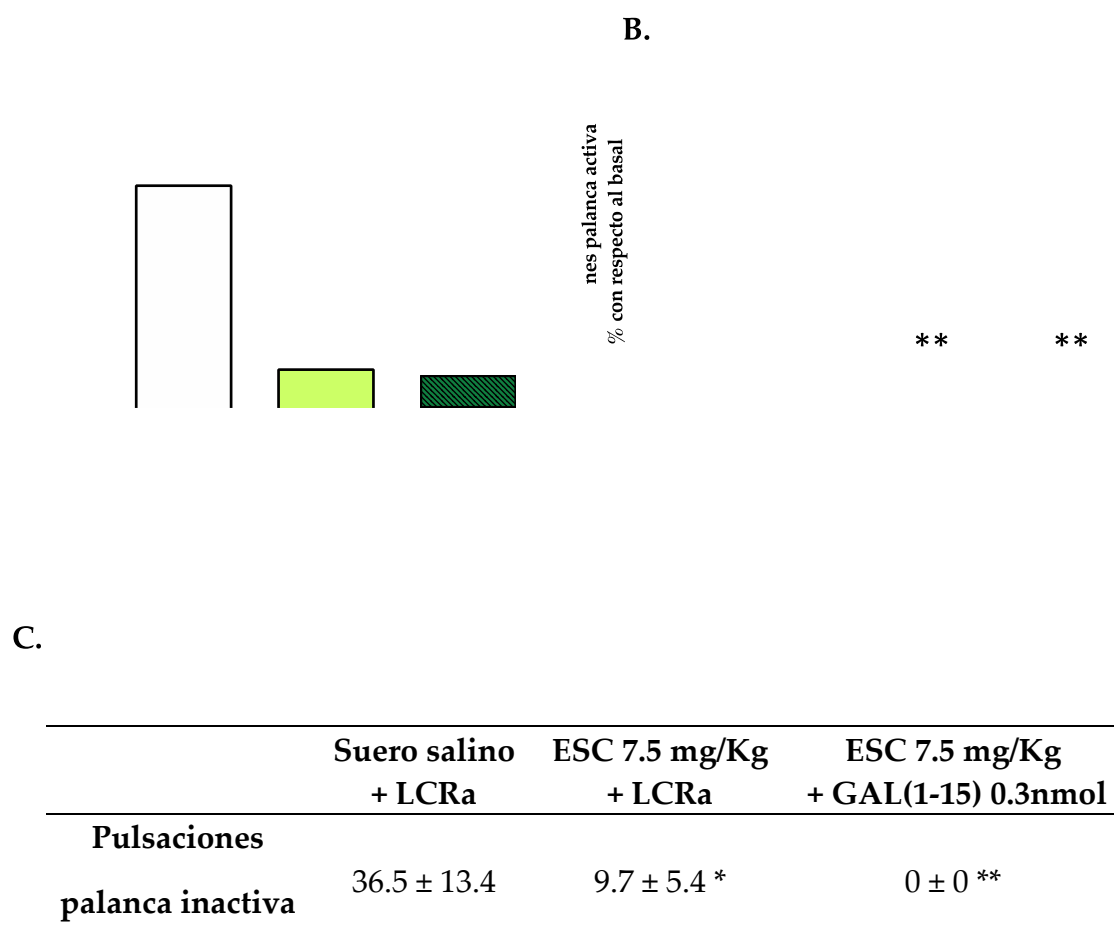


Figura 18. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC (7.5 mg/Kg) en autoadministración de sacarina. ESC o salino se administraron 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) o LCRA se administraron vía icv 15 minutos antes del test. Los animales inyectados con suero salino + LCRA se consideraron el grupo control. Las barras verticales representan la media ± del error estándar de la media del número de refuerzos (A), pulsaciones a la palanca activa (B) e inactiva (C) en porcentaje con respecto al basal de cada animal en la prueba de autoadministración. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al control, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

Posteriormente, se probó una dosis más baja de ESC, la dosis de 2.5 mg/Kg inyectada de forma ip 23,5 y 1h antes del test junto con GAL(1-15) 1 nmol administrado por vía icv 15 minutos antes del test.

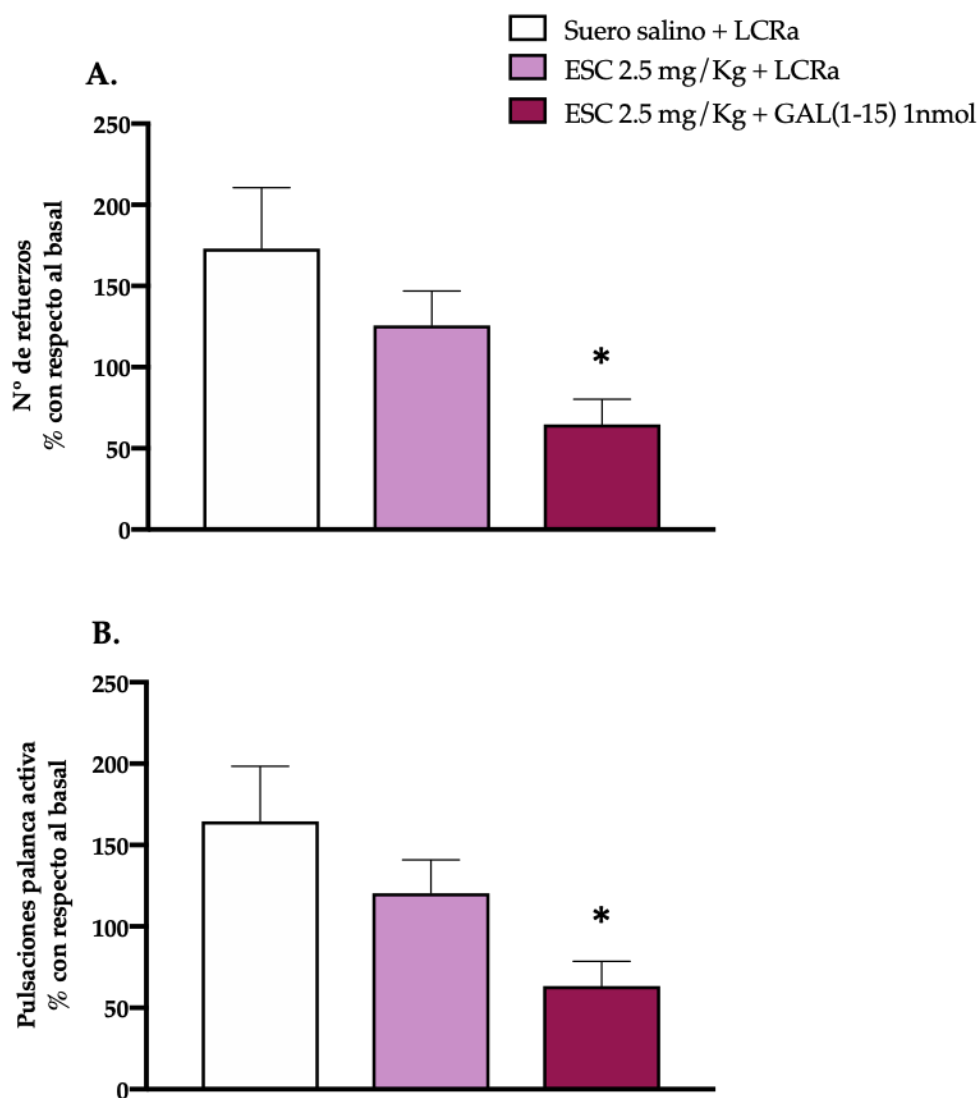


Figura 19. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC 2.5 mg/Kg en autoadministración de sacarina. ESC o salino se administraron 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) o LCRA se administraron vía icv 15 minutos antes del test. Los animales inyectados con suero salino + LCRA se consideraron el grupo control. Las barras verticales representan la media $\pm$ del error estándar de la media del número de refuerzos y pulsaciones a la palanca activa en porcentaje con respecto al basal de cada animal en la prueba de autoadministración. * $p < 0.05$ con respecto al control, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

Como se observa en la figura 19, en el test de autoadministración de sacarina, la coadministración de GAL(1-15) (1nmol) y ESC (2.5 mg/Kg), indujo una reducción significativa en la capacidad reforzante de la sacarina. Esta disminución se mostró tanto en el número de refuerzos de sacarina ($F_{2,21}=3.85$, $p=0.03$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$; figura 19A) como en el número de pulsaciones a la palanca activa ($F_{2,21}=3.86$, $p=0.04$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$; figura 19B).

Sin embargo, tal y como se muestra en la tabla 13, la coadministración de GAL(1-15) y ESC no tuvo efecto sobre las pulsaciones a la palanca inactiva en el Test de autoadministración de sacarina.

Tabla 13. Pulsaciones de la palanca inactiva en el test de autoadministración de sacarina

	Suero salino + LCRa	ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3nmol
Pulsaciones palanca inactiva	97.1 ± 29.9	128.9 ± 58.0	30.3 ± 16.5

Tabla 13. Pulsaciones de palanca inactiva en el Test de autoadministración de sacarina. ESC o salino se administraron 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes del test. Los animales inyectados con suero salino + LCRa se consideraron el grupo control. Los datos representan la media ± del error estándar de la media de las pulsaciones a la palanca inactiva en porcentaje con respecto al basal de cada animal en la prueba de autoadministración. No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales.

2.3 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

Una vez comprobado el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en reforzadores como la sacarosa o sacarina, probamos el efecto de dicha combinación en un modelo operante de autoadministración de alcohol. Estos animales se autoadministraron alcohol al 10% diariamente y se evaluaron distintos aspectos emocionales mediante pruebas de conducta que miden desesperanza o ansiedad, y así analizar si la reducción del consumo de alcohol estaría mediada por una modulación del circuito de recompensa o por una alteración en el estado emocional del animal.

2.3.1 GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

Para estudiar el papel del fragmento GAL(1-15) junto con el antidepresivo ESC en la comorbilidad alcohol-depresión, en primer lugar los animales se entrenaron para autoadministrarse alcohol al 10% en las cajas de autoadministración en un Ratio Fijo FR1, hasta que los animales tuvieron un consumo estable de alcohol al 10%, como se observa en la figura 20.

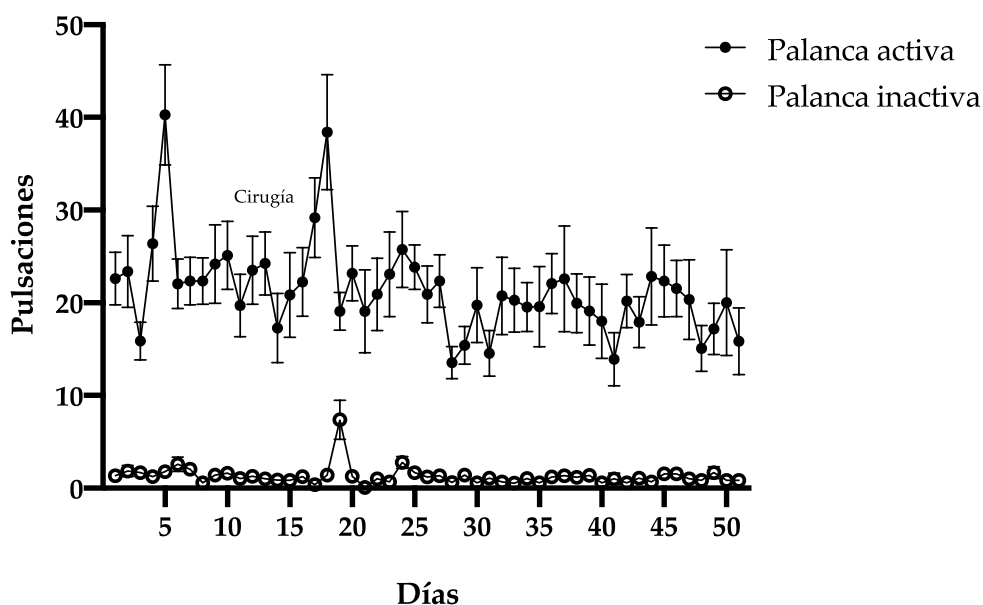


Figura 20. Representación de las pulsaciones a la palanca activa e inactiva durante el desarrollo del experimento de autoadministración de alcohol. Los animales alcanzaron un consumo estable de alcohol al 10% durante el entrenamiento operante en FR1.

ESC 2.5 mg/Kg (dosis subumbral en resultados de pruebas anteriores) o suero salino se administraron de forma ip 23, 5 y 1 hora antes del test mientras que GAL(1-15) 0.3 nmol, dosis subumbral, o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba de autoadministración.

En el test de autoadministración, la coadministración de GAL(1-15) 0.3 nmol y ESC 2.5 mg/Kg, potenció de forma significativa la reducción del consumo de alcohol mediado por ESC. La administración de GAL(1-15) junto con ESC disminuyó significativamente el número de refuerzos de alcohol en un 50% ($F_{2,19}=4.35$, $p=0.02$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$ Figura 21A) y el número de pulsaciones a la palanca activa alrededor de un 50% ($F_{2,19}=4.50$, $p=0.02$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$; Figura 21B) en comparación con el grupo control.

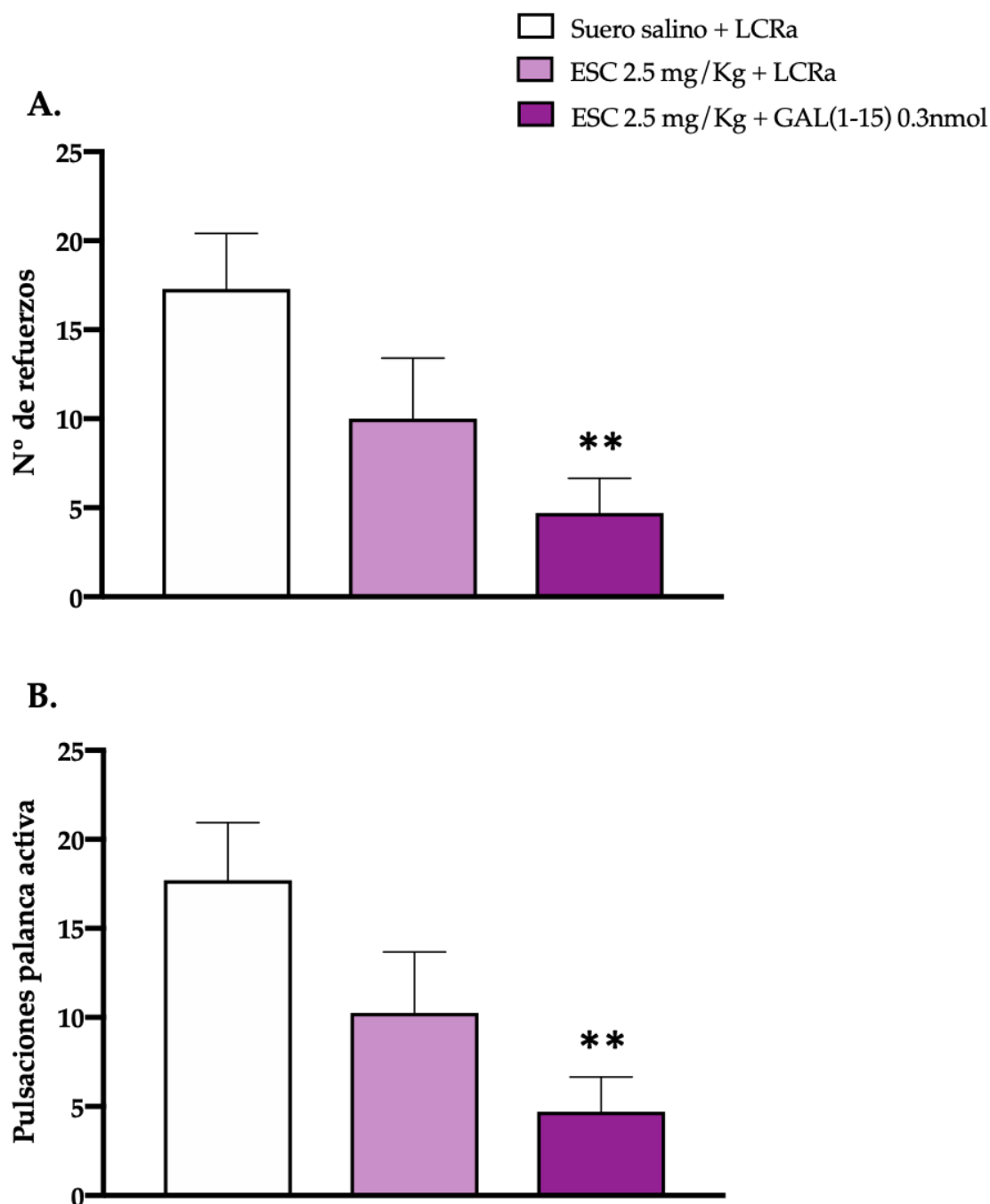


Figura 21. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

ESC o suero salino se administraron ip 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes del test. Las barras verticales representan la media $\pm$ el error estándar de la media del número de refuerzos y de las pulsaciones a la palanca activa durante el test de autoadministración. Los animales inyectados con suero salino y LCRa se consideraron el grupo control. ** $p < 0.01$ con respecto al control; según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

En las pulsaciones de palanca inactiva no se observaron efectos significativos en ninguno de los grupos experimentales (tabla 14).

Tabla 14. Pulsaciones de la palanca inactiva en el test de autoadministración de alcohol.

	Suero salino + LCRA	ESC 2.5 mg/Kg + LCRA	ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3nmol
Pulsaciones			
palanca inactiva	0.6 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1

Tabla 14. Pulsaciones de palanca inactiva durante el test de autoadministración de alcohol.

ESC o salino se administraron 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) o LCRA se administraron vía icv 15 minutos antes del test. Los datos representan la media ± el error estándar de las pulsaciones a la palanca inactiva durante el test de autoadministración. Los animales inyectados con suero salino y LCRA se consideraron el grupo control. No se observan diferencias entre los grupos experimentales.

2.3.2 GAL(1-15) y ESC en pruebas de desesperanza: Test de Natación Forzada (FST) y Test de Suspensión de la Cola (TST).

Se analizó la conducta de desesperanza en FST y el TST. Para ello, los animales se dividieron en grupos y se administraron con ESC 7.5 mg/Kg o suero salino, si se trataba del grupo control, 23, 5 y 1 hora antes del test. GAL(1-15) 1 nmol o LCRA se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba.

En el FST, la administración de ESC con la dosis de 7.5 mg/Kg en animales bajo un consumo crónico de alcohol, indujo un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad ($F_{2,19} = 5.86$, $p = 0.01$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$ Figura 22A) y una disminución en el tiempo de natación ($F_{2,19} = 5.21$, $p = 0.01$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$; Figura 22B) comparado con el grupo control, encontrándonos con un efecto adverso del antidepresivo ESC en esta prueba. La coadministración de GAL(1-15) 1 nmol y ESC 7.5 mg/Kg revirtió el efecto del ESC, dando como resultado una reducción en el tiempo de inmovilidad Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) y un aumento en el tiempo de natación (Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$; Figura 22) en comparación con el grupo inyectado solo con ESC.

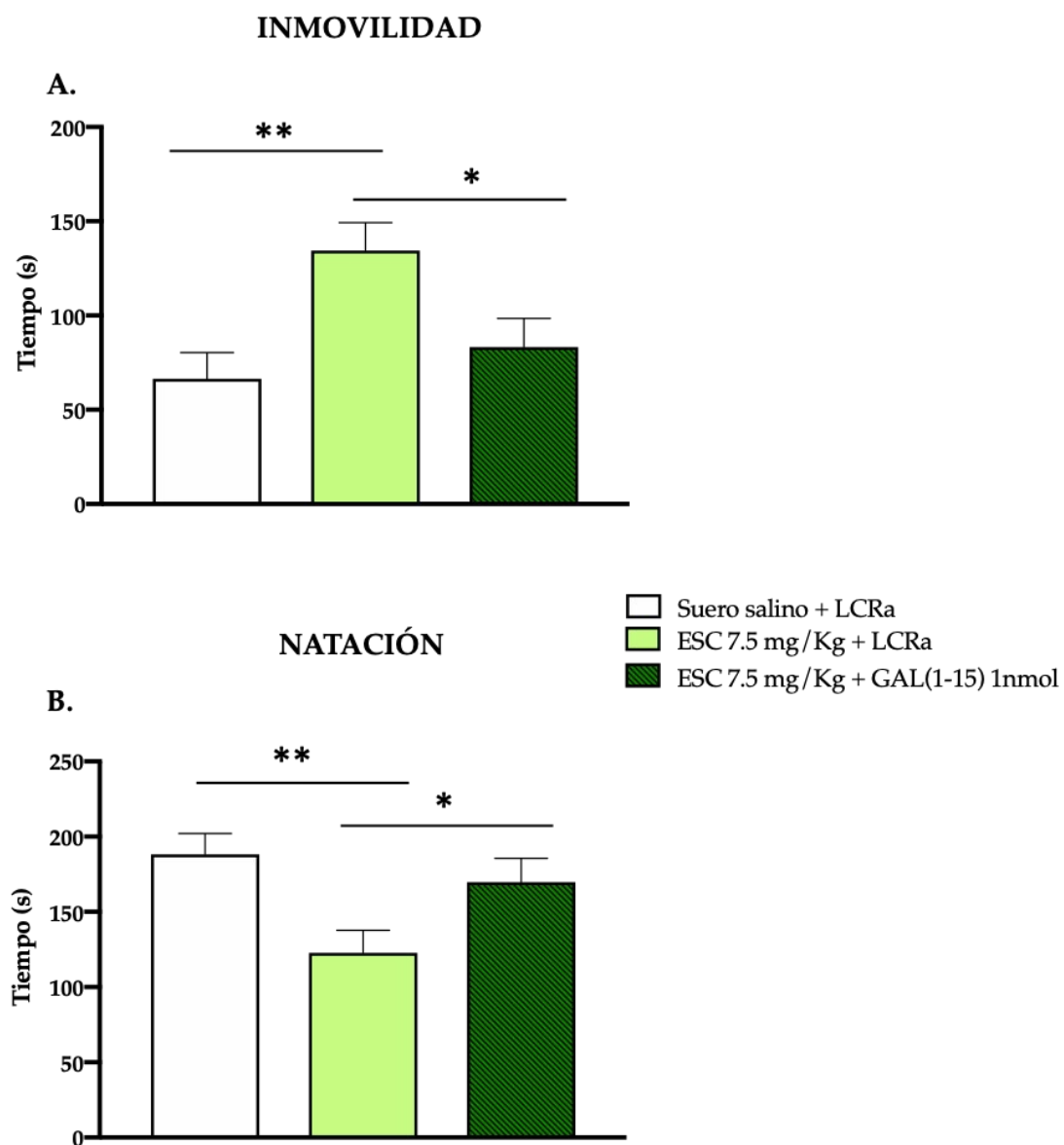


Figura 22. Efecto de GAL(1-15) y ESC en el FST en animales bajo consumo crónico de alcohol. ESC o suero salino se administraron ip 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) 1 nmol o LCRA se administraron icv 15 minutos antes del test. Los animales inyectados con suero salino y LCRA se consideraron el grupo control. **A, B.** Las barras verticales representan la media $\pm$ el error estándar de la media del tiempo de inmovilidad y natación en el Test de Natación Forzada. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher.

En el TST tanto la administración de ESC 7.5 mg/Kg administrada sola como la combinación de GAL(1-15) 1 nmol y ESC 7.5 mg/Kg no mostraron diferencias significativas ni en el tiempo de inmovilidad ni en el tiempo de movilidad en ratas expuestas a consumo de alcohol (tabla 15).

Tabla 15. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en el Test de Suspensión de la Cola

Tratamiento	Inmovilidad (s)	Movilidad (s)
Suero salino + LCRA	198.3 ± 7.2	122.1 ± 7.3
ESC 7.5 mg/Kg + LCRA	196.9 ± 12.9	121.4 ± 13.6
ESC 7.5 mg/Kg + GAL(1-15) 1 nmol	188.2 ± 14.2	131.6 ± 14.8

Tabla 15. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en el TST. ESC o suero salino se administraron ip 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) 1 nmol o LCRA se administraron icv 15 minutos antes del test. Los animales inyectados con suero salino y LCRA se consideraron el grupo control. Los datos representan la media ± el error estándar de la media del tiempo de inmovilidad y movilidad en el Test de Suspensión de la Cola.

2.3.3 GAL(1-15) y ESC en pruebas de ansiedad: Test del Campo Abierto (OFT) y Test del laberinto Elevado en Cruz (EPM).

Los animales bajo un consumo crónico de alcohol se inyectaron con el antidepresivo ESC a la dosis de 2.5 mg/Kg de forma ip 23, 5 y 1 hora antes del test. GAL(1-15) 0.3 nmol o LCRA se administraron 15 minutos antes del test por vía icv.

Como se observa en la tabla 16, la coadministración de GAL(1-15) y ESC no mostró ningún efecto en ninguno de los parámetros evaluados ni en el OFT ni en el EPM en comparación con el grupo control. La administración del antidepresivo ESC 2.5 mg/Kg tampoco obtuvo resultados en ninguna de estas dos pruebas.

Tabla 16. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en Test del Campo Abierto y el Test del Laberinto Elevado.

Tratamiento	OFT		EPM	
	Número de entradas	Tiempo entradas (s)	Entradas brazos abiertos (%)	Tiempo brazos abiertos (%)
Suero salino + LCRa	23.6 ± 4.0	62.0 ± 15.3	23.6 ± 8.9	14.9 ± 7.4
ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	25.9 ± 4.3	59.0 ± 12.0	18.9 ± 8.2	14.8 ± 8.0
ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3nmol	22.1 ± 4.3	36.4 ± 10.2	7.9 ± 2.8	1.9 ± 0.7

Tabla 16. Efecto de la combinación de GAL(1-15) y ESC en el OFT y EPM. ESC o salino se administraron ip 23, 5 y 1 h antes del test. GAL(1-15) o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes del test. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de las entradas a los brazos abiertos (%), el tiempo en los brazos abiertos (%), el nº de entradas y el tiempo de entradas. Los animales inyectados con suero salino y LCRa se consideraron el grupo control. No se observan diferencias entre los grupos experimentales en ninguna de las dos pruebas de conducta.

2.3.4 GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en los núcleos implicados en alcoholismo y depresión.

Los animales se inyectaron con ESC 2.5 mg/Kg o suero salino 23, 5 y 1 h antes de la autoadministración de alcohol y con GAL(1-15) 0.3 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba. Posteriormente, 90 minutos después de la inyección de los tratamientos, se obtuvo el tejido cerebral para analizar la expresión de C-Fos en distintos núcleos implicados en la depresión y el trastorno por consumo de alcohol como son: RMTg, HbM, HbL, NAc y CPF. Además, se realizó una inmunohistoquímica doble de C-Fos/5-HT en RD y una inmunohistoquímica doble de C-Fos/TH en ATV.

Como se observa en la figura 23, en la inmunohistoquímica doble realizada en el Área Tegmental Ventral, el número de células dobles de C-Fos + TH tras la administración icv de GAL(1-15) 0.3 nmol + ESC 2.5 mg/Kg ($F_{2,11}$, $p=0.004$, Fisher's LSD post hoc: $p < 0.05$) y la administración de ESC 2.5 mg/Kg (Fisher's LSD post hoc: $p < 0.01$) fue significativamente menor que el número de células presentes en el grupo control. En el grupo de ESC, la activación de células dobles es significativamente menor que el grupo control mientras que en el grupo de coadministración, si bien la activación es menor que en el grupo control, el porcentaje de bajada fue menor que en el grupo de ESC solo.

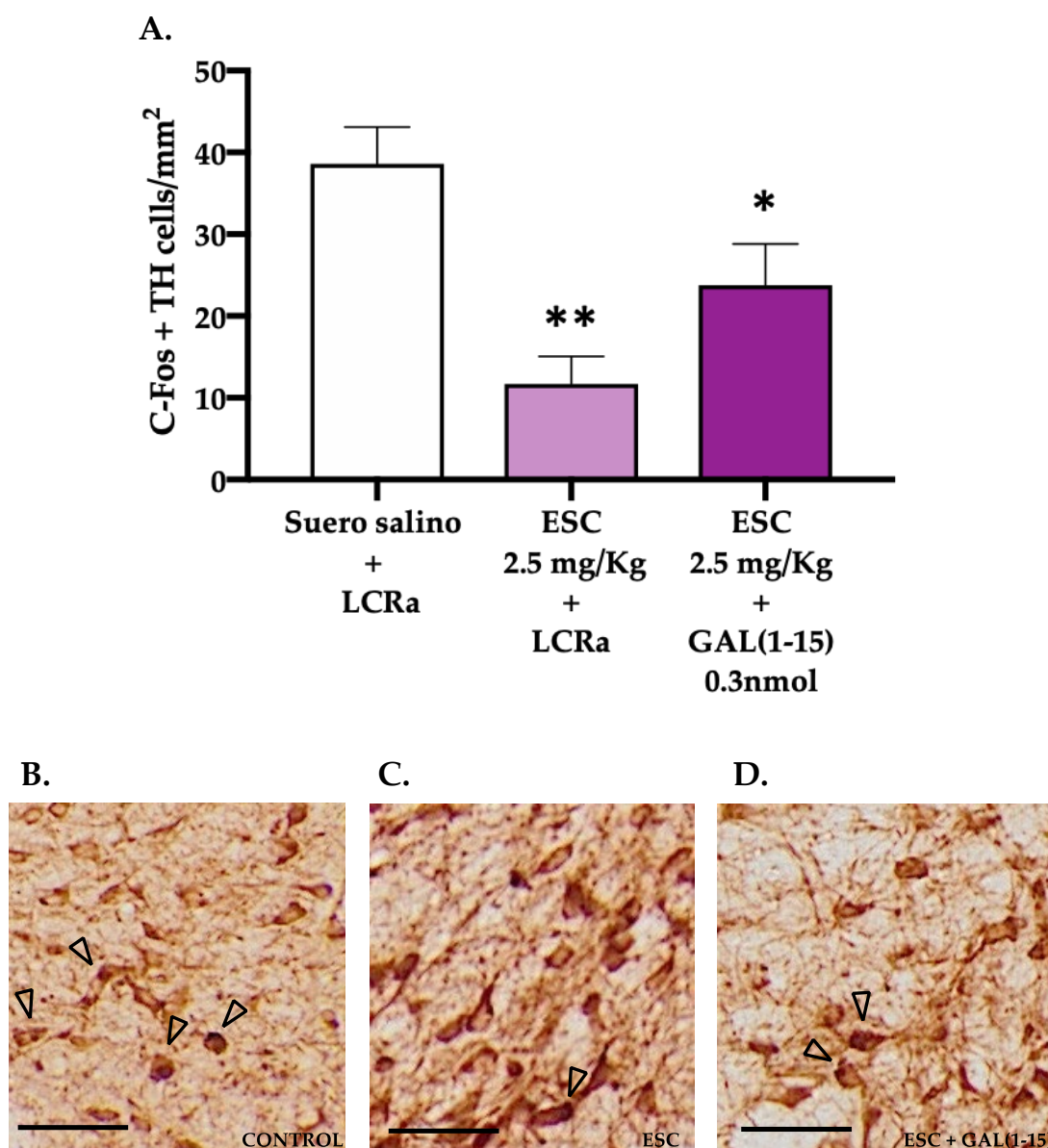


Figura 23. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos+TH en ATV. **A.** Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media de las células/mm² $\times$ 10 de C-Fos + TH en el ATV. Los animales inyectados con suero salino y LCRa se consideraron el grupo control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; con respecto al grupo control, según un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test post hoc de Fisher. **B, C, D.** Se muestra una imagen representativa de la inmunohistoquímica doble mostrando los diferentes tratamientos probados y observando las diferencias entre ellos, donde las flechas indican la presencia de células dobles C-Fos/TH en el área tegmental ventral, observándose menor cantidad de estas en los grupos ESC y ESC+GAL(1-15) en comparación con el grupo control. Escala= 100 μ m.

Sin embargo, no se observaron efectos significativos en el resto de núcleos estudiados entre los distintos grupos experimentales (tabla 17).

Tabla 17. Expresión de C-Fos en los distintos núcleos estudiados

Tratamiento	RMTg	HbL	HbM	NAc	CPF	RD
	C-Fos células/mm ²					C-Fos+5-HT células/mm ²
Suero salino + LCRA	60.8 ± 22.2	176.0 ± 57.9	218.4 ± 75.1	33.6 ± 8.1	259.2 ± 44.2	37.8 ± 10.3
ESC 2.5 mg/Kg + LCRA	21.0 ± 6.5	180.3 ± 74.3	205.5 ± 82.7	20.4 ± 5.4	210.3 ± 34.3	42.8 ± 6.7
ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3 nmol	51.6 ± 10.2	371.7 ± 113.1	406.6 ± 94.9	40.9 ± 13.2	327.9 ± 34.9	42.7 ± 8.5

Tabla 17. Efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en RMTg, HbL, HbM, NAc, CPF y RD. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de las células/mm² × 10 de C-Fos en RMTg, HbL, HbM, NAc y CPF. En la última columna los datos representan la media ± el error estándar de la media de las células/mm² × 10 de C-Fos+5-HT en el RD. Los animales inyectados con suero salino y LCRA se consideraron el grupo control. No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales estudiados en ninguna de las áreas analizadas.

A la vista de los resultados obtenidos en las inmunohistoquímicas anteriores, se realizó un Análisis de Componentes Principales con rotación varimax para extraer las dimensiones independientes o factores de los datos obtenidos de la inmunohistoquímica de C-Fos tras la prueba de autoadministración de alcohol. El Análisis de Componentes Principales reveló la existencia de tres factores independientes que representan los módulos cerebrales funcionales o redes subyacentes a C-Fos que explicaron ~80% de la varianza total (Figura 24).

A.

Núcleos	Factor 1	Factor 2	Factor 3
RD	-.811	.085	.023
ATV	.674	-.100	.303
RMTg	.810	.250	-.068
HbL	-.064	.957	.044
HbM	.097	.970	.031
NAc	.461	.203	.741
CPF	-.126	-.041	.933
Valor	2.35	1.82	1.33
Varianza explicada (%)	33.60	26.10	19.02

B.

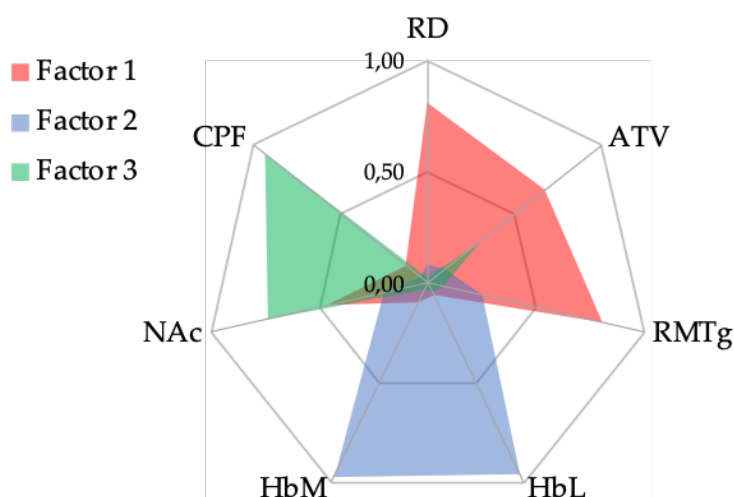


Figura 24. Análisis de Componentes Principales. A. El Análisis de Componentes principales reveló tres dimensiones independientes indicativas de la cantidad de actividad en las áreas RD/ATV/RMTg (Factor 1), la Habénula (Factor 2) y las regiones CPF/NAc (Factor 3). Los valores numéricos representan las cargas factoriales. B. El factor 1 se obtuvo a partir de medidas registradas en RD, ATV y RMTg; El factor 2 se obtuvo a partir de medidas registradas en HbL y HbM; El factor 3 se obtuvo de medidas registradas en NAc y CPF. Se consideró que un núcleo cerebral estaba incluido en un factor cuando su carga era > 0.7 en valor absoluto (valores en negrita). Las puntuaciones factoriales altas indican un mejor desempeño en cada dimensión.

El primer factor englobó a los núcleos RD, ATV y RMTg (33.60% de varianza explicada), el segundo factor estuvo compuesto por la HbM y HbL (26.10% de varianza explicada), mientras que el tercer factor estuvo compuesto por NAc y CPF (19.02% de varianza explicada). En el Análisis de los Componentes Principales se cumplieron los supuestos estadísticos, lo que permitió su uso e interpretación (KMO: 0.349; Bartlett's prueba de esfericidad: $\chi^2(21) = 35.76$, $p = 0.023$).

Con el objetivo de determinar la relevancia de cada factor en el Test de autoadministración de alcohol, realizamos las correlaciones de las puntuaciones factoriales (FS) para cada factor con el número de pulsaciones a la palanca activa en la prueba de autoadministración de alcohol previa al sacrificio de los animales. El número de pulsaciones a la palanca activa sólo puede predecirse por las puntuaciones en el Factor 1, compuesto por el RD (FS = -0.811)/ATV, (FS = 0.674)/RMTg (FS = 0.810) ($r = 0.549$; $p < 0.05$; Figura 25), indicando que las ratas que exhibieron un aumento en la expresión de C-Fos en el circuito ATV/RMTg fueron más propensas para presionar la palanca activa en la prueba de autoadministración de alcohol.

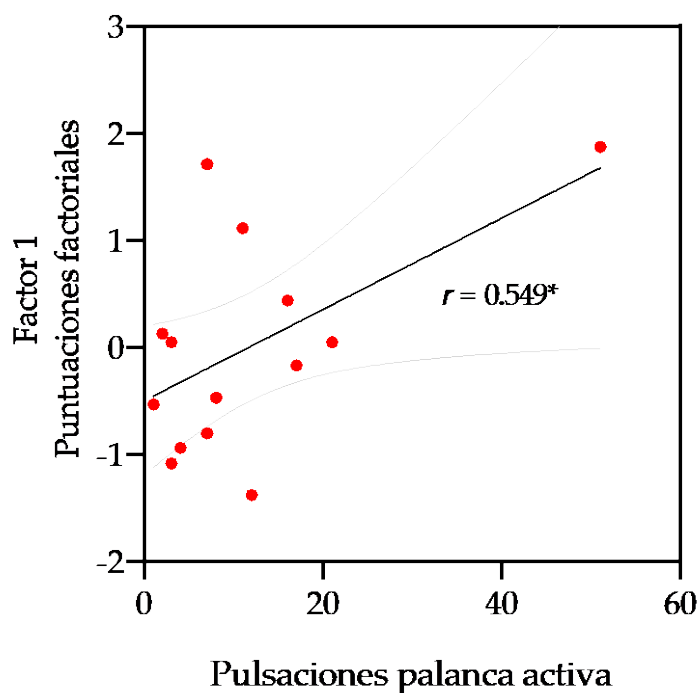


Figura 25. Correlaciones de las puntuaciones factoriales. Correlación entre los datos de comportamiento (pulsaciones a la palanca activa) del test de autoadministración de alcohol y C-Fos en Factor 1; $R. = 0.549$, * $p = 0.042$.

2.3.5 GAL(1-15) y ESC en la expresión de pCREB en el núcleo accumbens (NAc).

Además de la inmunohistoquímica de C-Fos comentada en el apartado anterior, se estudió la expresión de pCREB en NAc tras un consumo crónico de alcohol en autoadministración. Los animales se inyectaron con ESC 2.5 mg/Kg o suero salino 23, 5 y 1 h antes del test de autoadministración de alcohol y con GAL(1-15) 0.3 nmol o LCRa 15 minutos antes de la prueba.

Como se observa en la tabla 18, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión del receptor pCREB entre los distintos tratamientos en el NAc.

Tabla 18. Expresión de pCREB en NAc

Tratamiento	NAc (pCREB células/mm ²)
Suero salino + LCRa	16541 ± 1750
ESC 2.5 mg/Kg + LCRa	20918 ± 6987
ESC 2.5 mg/Kg + GAL(1-15) 0.3nmol	15878 ± 1790

Tabla 18. Efecto de GAL(1-15) y ESC en la expresión de pCREB en NAc. ESC o suero salino se administraron de forma ip 23, 5 and 1 hora antes del test de autoadministración de alcohol mientras que GAL(1-15) 0.3nmol o LCRa se administraron vía icv 15 minutos antes de la prueba. Los animales inyectados con suero salino y LCRa se consideraron el grupo control. Los datos representan la media ± el error estándar de la expresión de pCREB en células/mm² x 10 en NAc. No existen diferencias significativas entre los grupos experimentales según un Análisis de Varianza.

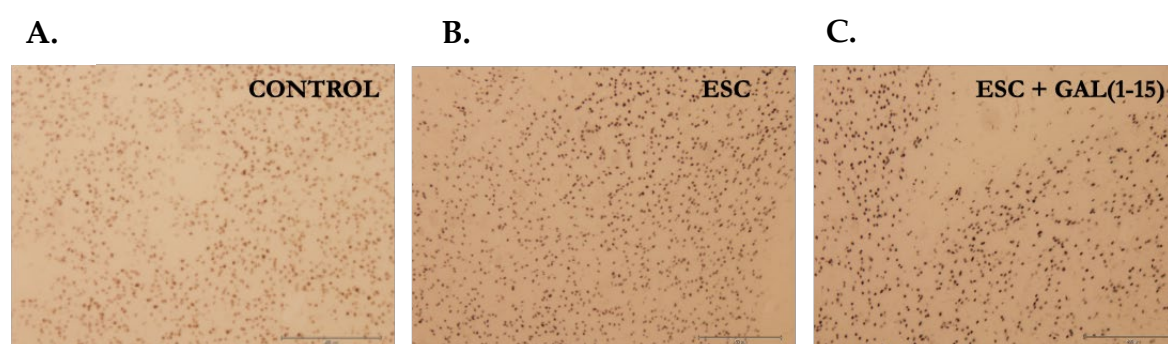


Figura 26. Inmunohistoquímica pCREB en NAc. Se muestra una imagen representativa en la zona NAc mostrando los diferentes tratamientos probados sin observar diferencias entre ellos. Escala= 100 µm.

Discusión



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. GAL(1-15) en un modelo de autoadministración de alcohol.

1.1 Papel de GAL(1-15) en el consumo y búsqueda de alcohol.

En el primer bloque de esta tesis doctoral, el principal objetivo de estudio fue evaluar el efecto del fragmento GAL(1-15) en la búsqueda de alcohol en ratas Sprague Dawley macho, en un **modelo de condicionamiento operante**, modelo que se encuentra ampliamente validado para el estudio del comportamiento de búsqueda de drogas, cuyo supuesto deriva en que las drogas funcionan como reforzadores que mantienen el comportamiento de búsqueda y consumo de la droga (Panlilio and Goldberg, 2007; Ettenberg et al., 2009; Calleja-Conde et al., 2023). Para ello, se utilizó la prueba de autoadministración de alcohol bajo un programa de refuerzo FR1, es decir, la realización de una respuesta operante, en este caso pulsar la palanca activa una vez, da como resultado un refuerzo de 0.1 mL de alcohol al 10%. En esta prueba se realizó una curva dosis-respuesta de GAL(1-15), observándose que la dosis de GAL(1-15) 3 nmol redujo de forma significativa tanto el número de refuerzos como el número de pulsaciones a la palanca activa, lo que indica que este fragmento tiene un papel relevante en la adicción al alcohol, provocando una disminución importante en la búsqueda por esta sustancia.

En resultados previos de nuestro grupo de investigación se observó que en un modelo no operante, como la ingesta voluntaria de alcohol mediante la elección de dos botellas, la administración de GAL(1-15) redujo la preferencia y el consumo por el alcohol en un 90% en diferentes medidas temporales (a las 2, 14 y 24 horas tras la administración del péptido), lo que confirma el papel específico de GAL(1-15) en el consumo de alcohol, tanto en un modelo voluntario (Millón et al., 2019b) como en el modelo operante de búsqueda de alcohol, realizado en la presente tesis doctoral.

En este bloque experimental también se observó un papel diferencial de la molécula completa de GAL y GAL(1-15) en el modelo operante de autoadministración de alcohol, ya que es la GAL(1-15) (3 nmol) y no GAL (3 nmol), la que reduce notablemente el número de refuerzos de alcohol y, por tanto, la búsqueda de alcohol.

El papel diferencial en el consumo de alcohol de GAL(1-15) con respecto a la molécula completa se encuentra descrito en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, en concreto, en el modelo voluntario de elección de dos biberones, donde se observó que GAL(1-15) redujo de forma significativa la preferencia y el consumo de alcohol en comparación con la GAL, ya que GAL careció de efecto con respecto al grupo control en todos los parámetros estudiados, mostrando un papel diferencial y específico de la GAL(1-15) en el consumo de alcohol (Millón et al., 2019b). La administración de GAL(1-15) no modificó la ingesta de agua ni de alimentos en la prueba de dos biberones, por lo que la reducción de la ingesta de alcohol se debe a una atenuación del efecto gratificante de esta sustancia (Millón et al., 2019b).

Existen trabajos previos de la implicación de GAL en el consumo de alcohol y en la motivación para conseguir esta sustancia. Así, Leibowitz y colaboradores observaron que microinyecciones de GAL en el tercer ventrículo producían un aumento de la ingesta de alcohol en ratas Sprague Dawley en un modelo de dos biberones (agua versus alcohol 7%), siendo este aumento mayor durante la fase de luz, cuando normalmente los animales están inactivos y la conducta de beber disminuye (Lewis et al., 2004). La administración de GAL en el núcleo paraventricular del hipocampo mostró de igual modo un aumento del consumo de alcohol en el modelo de dos biberones siendo este efecto revertido con la administración del antagonista específico de GAL (GAL M40) (Rada et al., 2004).

Debido a que GAL(1-15) redujo la preferencia y el consumo de alcohol mientras que otros autores, tal y como se acaba de describir, encontraron un efecto opuesto de la GAL, nuestros resultados validan y amplían la visión de un papel específico de GAL(1-15) en el consumo de alcohol.

Los estados emocionales como la ansiedad y la depresión son variables que aumentan el consumo de alcohol (Chappell et al., 2013), por lo que se podría pensar que el efecto obtenido en la búsqueda de alcohol es por la actuación de GAL(1-15) sobre el estado de ánimo. Sin embargo, en trabajos previos, se ha demostrado que la administración de GAL(1-15) en rata induce efectos prodepresivos en el test de natación forzada (FST) y en el test de suspensión de la cola (TST) además, en la prueba que evalúa parámetros de ansiedad como es el OFT, GAL(1-15) indujo un efecto ansiogénico (Millón et al., 2015).

Por todo lo comentado anteriormente, podemos decir que GAL(1-15) tiene un papel relevante y específico en los trastornos del estado de ánimo. Por otro lado, la reducción en el consumo y preferencia de alcohol inducida por GAL(1-15) en el modelo de dos biberones es producida por mecanismos independientes a los estados emocionales, ya que produce una reducción del valor gratificante del alcohol, en lugar de una forma de autotratamiento para paliar la ansiedad o la depresión (Millón et al., 2019b). Debido a que las sustancias ansiogénicas en general suelen aumentar el consumo de alcohol y al administrar GAL(1-15) se ha observado el efecto contrario, podemos pensar que su efecto sobre la bajada en el consumo de alcohol es independiente de los estados emocionales.

Por tanto, existe un claro papel diferencial en las acciones de GAL(1-15) y GAL en la búsqueda y consumo de alcohol así como en los trastornos del estado de ánimo.

Para analizar los receptores implicados en el efecto de GAL(1-15) en autoadministración de alcohol, en primer lugar, se utilizó el antagonista de GALR2, M871, en autoadministración de alcohol ya que se trata de un antagonista altamente específico para los receptores GALR2, que se une a este receptor 30 veces con mayor afinidad que a GALR1, demostrando que es un ligando específico para GALR2 (Lang et al., 2007). El antagonista M871 ha demostrado su eficacia en otras funciones de la GAL como en el bloqueo del dolor en un modelo nociceptivo en animales o en el bloqueo del aumento del efecto ansiolítico del receptor Y1 del NPY en pruebas de conducta animal (Narváez et al., 2014).

En la prueba de autoadministración de alcohol de esta tesis, se administró el antagonista de GALR2, M871 con una dosis de 3 nmol y observamos que la administración de M871 solo no produjo ninguna modificación en el número de refuerzos de alcohol ni en el número de pulsaciones a la palanca activa. Sin embargo, la administración de M871 junto con GAL(1-15) bloqueó completamente el efecto de la GAL(1-15) en la reducción del número de refuerzos y número de pulsaciones de palanca activa en la prueba de autoadministración de alcohol, por lo que observamos que **el receptor GALR2 se encuentra implicado en el efecto de la GAL(1-15) en la búsqueda de alcohol en la prueba de autoadministración.**

Estos resultados concuerdan con datos previos en un modelo de ingesta voluntaria de alcohol donde el antagonista M871 también bloqueó el efecto de GAL(1-15) en la reducción de la preferencia y en el consumo de alcohol mientras que la administración sola del antagonista M871 careció de efecto en este modelo (Millón et al., 2019b).

Por otra parte, dada la necesidad de estudiar la implicación de GALR1 en el efecto de GAL(1-15) y debido a la ausencia comercial de un antagonista del receptor GALR1 se generó un modelo animal con una expresión reducida (knockdown) del receptor GALR1 así como del receptor GALR2 para confirmar los datos obtenidos con el antagonista M871, basados en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015; Flores-Burgess et al., 2017), para conocer la implicación de ambos receptores en el efecto de GAL(1-15) en la búsqueda de alcohol en autoadministración.

El modelo knockdown supone un silenciamiento génico a través de ARN pequeño de interferencia (siRNA) para la inhibición de la expresión de genes diana que consigue una disminución en la expresión de la proteína asociada tanto in vitro como in vivo (Kole et al., 2012; Nakajima et al., 2012). La generación de animales knockdown GALR1 y knockdown GALR2 ha sido realizada previamente en nuestro laboratorio gracias al sistema Accell siRNA de Thermo Scientific Dharmacon que presenta una modificación química que permite a la célula la entrada sin reactivos de transfección, evitando así la toxicidad celular (Millón et al., 2015; Flores-Burgess et al., 2018).

En los experimentos de autoadministración de alcohol, los animales knockdown GALR1 y knockdown GALR2 no mostraron diferencias respecto a los controles en los parámetros analizados tras la administración de GAL(1-15), lo que muestra que la ausencia tanto del receptor GALR1 como del receptor GALR2 produce un bloqueo del efecto demostrado por la GAL(1-15) en la reducción de la búsqueda de alcohol, lo que indica la implicación directa tanto del receptor GALR1 como del receptor GALR2 en el efecto de la GAL(1-15). Los animales controles fueron tratados con Accell siRNA el cual no presenta ninguna diana génica para descartar que el sistema Accell siRNA utilizado presentara algún efecto en la prueba de autoadministración (Nakajima et al., 2012).

Es por ello que estos resultados demuestran que la reducción de la expresión de los receptores GALR1 y los receptores GALR2 bloquea el efecto de la búsqueda de alcohol producido por GAL(1-15) de igual forma que lo hace el antagonista específico del receptor GALR2, M871. Podemos decir entonces que **tanto el receptor GALR1 como el receptor GALR2 están implicados en el efecto producido por la GAL(1-15).**

El mecanismo de acción de GAL(1-15) se debe a la acción de GAL(1-15) sobre los receptores de GAL, ya que GAL(1-15) presenta una menor afinidad que la GAL por los tres receptores descritos de GAL (Branchcheck et al., 1998). Tal y como se ha descrito, inicialmente se pensó en la existencia de un posible receptor específico pero al no conseguir clonar un receptor específico para GAL(1-15), se formuló la hipótesis de la existencia de un heterodímero, que podría explicar los sitios de unión específicos y el papel diferencial de GAL(1-15) con respecto a GAL (Fuxe et al., 2012).

La existencia de un **heterodímero GALR1-GALR2** que pudiera ser la diana de actuación de GAL(1-15) se evidenció con la realización de distintas pruebas, como la colocalización de los receptores GALR1 y GALR2 en hipocampo dorsal y rafe dorsal y, posteriormente, con la técnica de ligamiento por proximidad (PLA) en el núcleo del rafe dorsal y el hipocampo dorsal, donde se observó que ambos receptores se encontraban muy próximos entre sí, permitiendo la formación de complejos heterodímeros en el hipocampo dorsal y especialmente en las células del rafe dorsal, lo que indica que las células nerviosas del rafe podrían ser un objetivo crucial de la GAL(1-15) (Hedlund et al., 1992; Millón et al., 2015, figura 1).

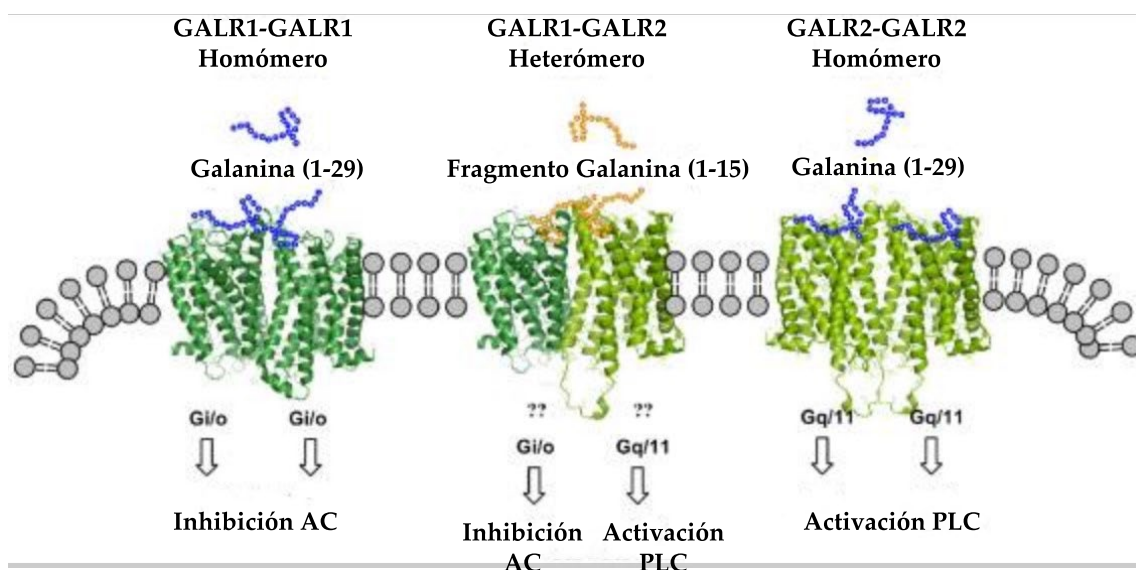


Figura 1. La señalización del receptor preferente de GAL(1-15) (heterómero GALR1-GALR2) se compara con la señalización de los homómeros GALR1 y GALR2. AC, PLC: fosfolipasa C. Modificado de Fuxe et al., 2012.

También se han obtenido evidencias de este heterodímero en modelos celulares donde se observó que GAL(1-15) fue más potente que GAL en la reducción de los niveles de CREB y NFAT en las células transfectadas con GALR1 y GALR2, mientras que en las células transfectadas solo con GALR2 ambos péptidos carecieron de efecto, así, GAL(1-15) activa la señalización mediada por Gi/o del protómero GALR1, reduciendo el CREB, sin activar la vía de señalización de calcio mediada por el protómero GALR2 Gq/11 (Borroto-Escuela et al., 2014).

Tras lo expuesto anteriormente, la existencia del heterodímero GALR1-GALR2 podría explicar los el mecanismo de actuación de la GAL(1-15), donde el promotor GALR1 actuaría activando una vía de señalización diferente o inhibiendo la señalización mediada por Gq/11 a través de interacciones alostéricas receptor-receptor (Fuxe et al., 2012), lo que podría explicar que la acción de GAL(1-15) sea más potente que GAL.

Por tanto, observamos que **el fragmento 1-15 N-terminal de Galanina es relevante y se encuentra implicado en el consumo y búsqueda de alcohol, mediando su acción a través del heterodímero GALR1-GALR2 (figura 2.)**

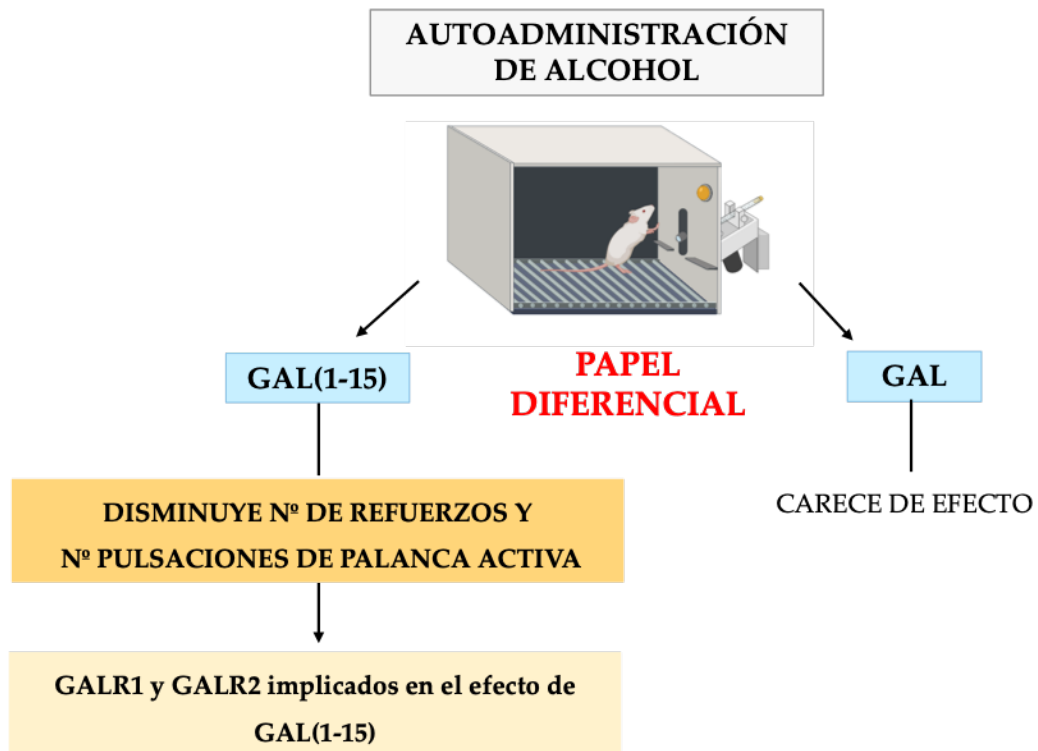


Figura 2. Resumen de los resultados sobre el papel de GAL(1-15) y los receptores implicados en autoadministración de alcohol.

Tal y como se ha explicado anteriormente, los trabajos de esta tesis demuestran que GAL(1-15) es capaz de reducir la búsqueda de alcohol en un modelo operante de autoadministración en un programa de proporción fija 1 (FR1). En este trabajo se estudió también el papel de GAL(1-15) en un programa variable, usando para ello un programa de ratio progresivo, modelo utilizado frecuentemente para evaluar la eficacia reforzante de sustancias con potencial de abuso y, por tanto, la motivación por ellas (Richardson and Roberts, 1996).

En este modelo la motivación se evalúa mediante la cantidad de "trabajo" o esfuerzo que un animal está dispuesto a realizar para obtener la eficacia del reforzador y esto se infiere a partir de los valores del punto de ruptura o *breaking point*, que suelen medirse en una sola sesión, aumentando el número de respuestas requeridas para la obtención del refuerzo (Czachowski and Samson, 1999).

La administración de GAL(1-15) redujo de forma significativa la motivación en la búsqueda de alcohol que se vio reflejada en una reducción en el número de pulsaciones a la palanca activa para conseguir el alcohol así como en el número de respuestas máximas que el animal fue capaz de realizar para la consecución de un solo refuerzo o *breaking point*, lo que sugiere un papel específico de GAL(1-15) en la reducción de la motivación por la búsqueda de alcohol. Es importante destacar que esta capacidad de GAL(1-15) para reducir la motivación por el alcohol es relevante ya que la desregulación motivacional es una característica distintiva de la adicción (Lebourgeois et al., 2018). En resultados de trabajos previos, GAL(1-15) indujo una reducción de la motivación por diferentes refuerzos naturales y artificiales, como la sacarina en la prueba de autoadministración (Millón et al., 2019a) o directamente, generando una fuerte disminución en un 90% de la preferencia y el consumo de alcohol en un modelo de ingesta voluntaria de alcohol (Millón et al., 2019b).

En nuestro estudio, usamos ratas Sprague-Dawley macho, las cuales mostraron un *breaking point* muy similar a otros trabajos que utilizan la misma cepa (Alex-Cantin et al., 2013). Sin embargo, al administrar GAL(1-15) esa motivación por el alcohol y, por ende, el *breaking point* disminuye, lo que muestra un papel específico de GAL(1-15) en la motivación por el alcohol.

Es por ello que nuestro estudio demuestra una **disminución de la motivación por el alcohol** tras la administración de GAL(1-15) en un **ratio progresivo** lo que aporta una nueva prueba de la implicación de GAL(1-15) en el proceso de motivación y búsqueda de recompensas (figura 3) y abre la **posibilidad de utilizar la GAL(1-15) como terapia farmacológica** en el trastorno por uso de alcohol

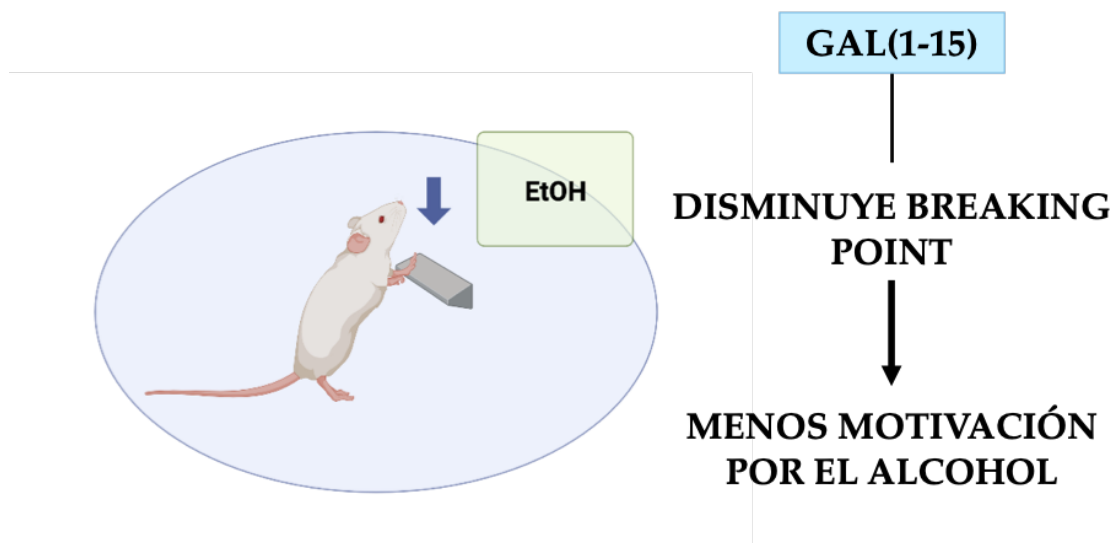


Figura 3. Resumen de los resultados tras la administración de GAL(1-15) en un ratio progresivo.

1.2 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de genes en el sistema mesolímbico.

Se analizaron los núcleos principales del sistema de recompensa mesocorticolímbico, es decir, ATV, NAc y CPF, que son críticos para el desarrollo y mantenimiento del refuerzo del alcohol (Gonzales et al., 2004) y la adicción a las drogas (Koob et al., 1992; Koob and Volkow, 2010).

1.2.1 GAL(1-15) en la expresión de ARNm de C-Fos en ATV, NAc y CPF.

Los resultados de las q-PCR revelaron que el sistema mesocorticolímbico participa en los efectos de GAL(1-15) en la autoadministración de alcohol, donde la administración de GAL(1-15) indujo un aumento significativo de la expresión de C-Fos, en ATV, NAc y CPF en comparación con los animales controles que también se autoadministraron alcohol. El **marcador C-Fos fue analizado** en estos núcleos, ya que se trata de un marcador de neuronas activadas conductualmente en modelos de autoadministración de drogas, así, ensayos inmunohistoquímicos indicaron que la expresión de C-Fos aumenta durante la autoadministración de cocaína o heroína en todo el circuito corticoestriatal, incluida la corteza prefrontal, las subregiones del núcleo y la cubierta del NAc y el cuerpo estriado dorsal (Cruz et al., 2015), por lo que la modulación de la expresión de este gen por parte de GAL(1-15) indica la implicación de estos núcleos en su efecto en la reducción de la búsqueda de alcohol. En trabajos previos sobre consumo voluntario de alcohol, GAL(1-15) también indujo un aumento significativo de la expresión de C-Fos en el cuerpo estriado indicando un aumento de la actividad neuronal en esa zona (Millón et al., 2019b).

Por tanto, podemos decir que **la administración de GAL(1-15) en animales que se encuentran bajo un consumo crónico de alcohol, modula la vía corticomesolímbica** de manera que aumenta la actividad de regiones relacionadas con la recompensa y la motivación (Dean and Keshavan, 2017; Browne et al., 2019).

1.2.2 Receptores D1, D2, D3 y D5 y transportadores DAT y Vmat2.

Se analizaron los **receptores y transportadores de dopamina** ya que la dopamina es el neurotransmisor principal presente en la motivación por las recompensas (Dean and Keshavan, 2017; Browne et al., 2019). La administración de GAL(1-15) modificó la expresión del receptor D3 en el **ATV**. Así, GAL(1-15) aumentó de forma significativa la expresión del receptor D3, receptor implicado en la motivación para autoadministrarse drogas (Le Foll et al., 2005). Este aumento observado en los receptores D3 podría indicar que GAL(1-15) afecta a la producción y liberación de DA, ya que los receptores D3 se expresan, no sólo en las regiones postsinápticas, sino también en los cuerpos celulares dopaminérgicos, donde pueden funcionar como autorreceptores (Díaz et al., 2000) con efectos inhibidores sobre el flujo de impulsos, la síntesis y la liberación de DA (Tepper et al., 1997; Leggio et al., 2013). Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación donde la reducción de la autoadministración de sacarina mediada por GAL(1-15) se acompañó de un aumento significativo de la expresión del receptor D3 en el ATV, lo que sugiere una reducción de la liberación de DA (Millón et al., 2019a).

Con respecto al **NAc**, se produjo una reducción del receptor D3 de dopamina tras la administración tanto de GAL(1-15) como de LCRA, por lo que dicha disminución podría deberse al efecto del alcohol per se. Sin embargo, la importancia del cuerpo estriado como diana de GAL(1-15) se reveló en estudios previos, donde la disminución de la actividad locomotora inducida por el alcohol fue potenciada tras la administración de GAL(1-15), indicando que este efecto conductual estaría mediado principalmente por el sistema dopaminérgico (Millón et al., 2019b).

Así, el uso de neurotoxinas, como el 6-OHDA, que destruyen de forma selectiva las neuronas que liberan dopamina, alteran el sistema dopaminérgico y producen una fuerte reducción de dopamina en el cuerpo estriado, disminuyendo por tanto el efecto conductual, en este caso, la actividad locomotora (Breese et al. 1984). Resultados de trabajos previos sugieren que la potenciación de la hipolocomoción inducida por GAL(1-15) en ratas tratadas con alcohol puede requerir la modulación del sistema dopaminérgico por GAL(1-15), y en concreto, al cuerpo estriado ya que se trata de un blanco crucial de las proyecciones dopaminérgicas que, además, posee sitios de unión específicos para GAL(1-15), lo que lo convierte en una diana de actuación de este fragmento (Hedlund et al., 1992).

La **CPF** es una región clave del sistema de recompensa la cual modula la autoadministración de alcohol, debido a que se encuentra involucrada en funciones ejecutivas como la toma de decisiones o el control de los impulsos, funciones que se ven afectadas en el consumo de drogas, y en especial, en el consumo de alcohol (Koob et al., 2010; Halladay et al., 2020).

En los resultados de esta tesis, la administración de GAL(1-15) indujo un fuerte aumento de la expresión del receptor D1 de dopamina no solo con respecto al grupo de animales que no se autoadministraron alcohol, sino también con respecto al grupo control, mostrando por tanto que el efecto observado no es debido al consumo de alcohol, sino a la administración de GAL(1-15), mostrando por tanto una modulación del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico.

En cuanto a los **transportadores de dopamina** analizados, observamos que tanto la administración de GAL(1-15) 3 nmol como la administración de LCRa en ratas con consumo crónico de alcohol aumentó la expresión de Vmat2 en el ATV en comparación con los animales que carecían de consumo de alcohol previo, por lo que no se observó un efecto específico de GAL(1-15) sobre los transportadores de dopamina Vmat2 y DAT. En trabajos previos de GAL(1-15) en anhedonia estos transportadores de dopamina sí se vieron modulados sin embargo en el presente trabajo no se llegó a ver una modulación tras la administración de GAL(1-15) (Millón et al., 2019a).

Nuestros resultados muestran que el alcohol modula la producción y liberación de DA, de los transportadores Vmat2 y DAT, sin observar diferencias entre los grupos experimentales administrados con GAL(1-15) y LCRa.

En conjunto, estas modificaciones inducidas por **GAL(1-15)** **sugieren que su principal efecto sobre la vía mesolímbica es la reorganización funcional del sistema dopaminérgico, lo que probablemente conduce a su inhibición funcional (figura 4).**

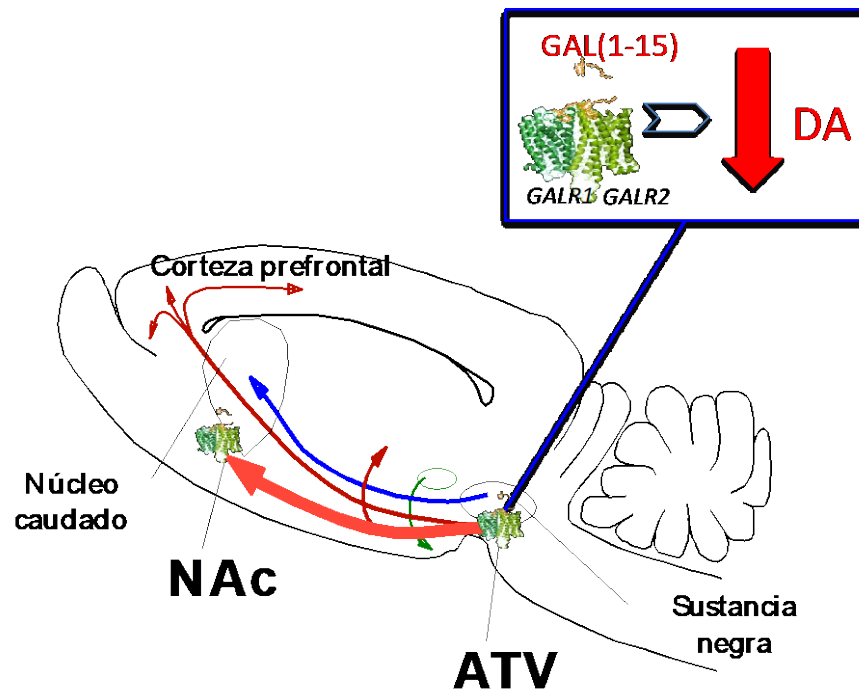


Figura 4. Ilustración que representa las modificaciones tras la administración de GAL(1-15) en el sistema de recompensa.

1.2.3 Receptor 5-HT1A.

Es interesante mencionar que no sólo se modificó la expresión de los receptores dopaminérgicos, también se vio modificada la **expresión de los receptores de serotonina**. Los animales que se habían autoadministrado alcohol mostraron un aumento de la expresión del receptor 5-HT1A en el **ATV**, como se ha observado por otros autores (Belmer et al., 2016), percibiéndose un ligero aumento de dicha expresión en los animales administrados con GAL(1-15) con respecto al grupo control, que aunque no llega a ser significativo, sugiere la existencia de una interacción entre GAL(1-15) y el receptor 5-HT1A, tal y como se ha observado en trabajos previos de grupo de investigación (Millón et al., 2016).

El alcohol también moduló la expresión del 5-HT_{1A}R en la **CPF**, observándose una reducción de la expresión del receptor tanto en el grupo GAL(1-15) como en el grupo control.

Varios estudios han demostrado que existe una interacción entre GAL(1-15) y el 5-HT_{1A} tanto a nivel funcional como a nivel de receptor en los últimos años (Millón et al., 2016; Flores Burgess et al., 2017; García-Durán et al., 2021), por ejemplo, GAL(1-15) potenció los efectos antidepresivos inducidos por el agonista del 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, afectando también a las características de unión y a los niveles de ARNm del 5-HT_{1A} dependiente del tiempo en hipocampo dorsal y rafe (Millón et al., 2016), núcleos implicados en la depresión, lo que confirma la importancia de este receptor en el mecanismo de actuación de la GAL(1-15).

En la presente tesis doctoral se analizó la expresión de los receptores GALR1 y los receptores GALR2 tras la administración de GAL(1-15). Tanto la administración de inyecciones agudas de alcohol en animales basales realizada en trabajos previos (Millón et al., 2019b) como la autoadministración operante de alcohol de la presente tesis, no afectaron a la expresión de los receptores GALR1 y GALR2, lo que indica que el alcohol per se no influye en la expresión de GALR1 y GALR2, lo que sugiere que el efecto encontrado en la reducción de la búsqueda y consumo de alcohol está mediado por la administración de GAL(1-15).

A pesar de que estos resultados son prometedores y sugieren que el circuito mesocorticolímbico está involucrado en el comportamiento inducido por GAL(1-15) (figura 8), se requieren experimentos adicionales para clarificar el papel de este circuito.

Implicación del Sistema mesocorticolímbico en los efectos de **GAL(1-15)** en autoadministración de alcohol

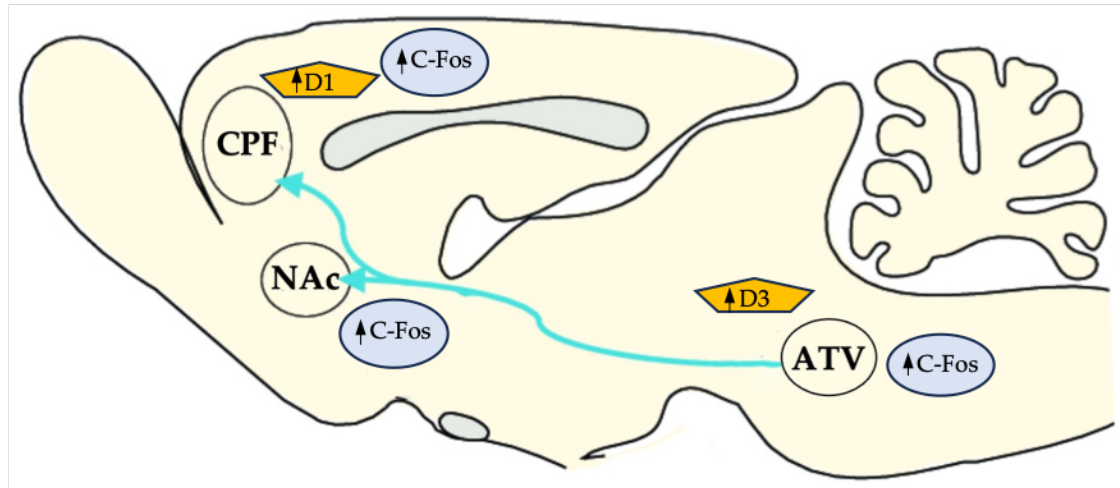


Figura 5. Ilustración que representa las modificaciones tras la administración de GAL(1-15) en distintas zonas y genes implicados en la recompensa. Modificado de Alfredo Meneses, 2014.

1.3 Efecto de GAL(1-15) en recaída alcohólica por contexto.

Durante esta tesis doctoral se ha mostrado como la administración de GAL(1-15) es capaz de inducir una reducción tanto en la búsqueda como en la motivación por el alcohol, sugiriendo un papel clave de este péptido en el trastorno por uso de alcohol.

Una de las características de las personas con problemas por el alcohol son los ciclos de recaída y remisión, de hecho, diferentes estudios de investigación muestran que entre el 65 y el 70 % de personas abstinentes con dependencia del alcohol recaen dentro de un año, y más especialmente, dentro de los primeros 3 meses de abstinencia (Kadam et al., 2017; Domi et al., 2021). Por ello y tras obtener unos resultados previos prometedores, se propuso analizar el papel de GAL(1-15) en la recaída alcohólica.

Los animales con una línea de base estable de autoadministración de alcohol al 10% en el contexto A se sometieron a un proceso de extinción en el contexto B para inducir posteriormente una recaída alcohólica mediante la reintroducción del contexto A, un paradigma ampliamente utilizado en el estudio de la recaída en el alcohol inducida por el contexto, ABA (Crombag et al., 2008; Domi et al., 2021; Fredriksson et al., 2021; Tavares et al., 2023). En este modelo se estudia la recaída en el mismo contexto donde se aprendió la conducta, siendo las señales y el contexto ambiental clave para propiciar la recaída alcohólica. El contexto ambiental influye en la conducta del individuo, de manera que este es incapaz de abstenerse de beber en entornos que están asociados al consumo de alcohol, así como a los efectos farmacológicos de este. Por ello, los tratamientos conductuales basados en la reducción de señales discretas relacionadas con el alcohol en la clínica como eliminar del campo visual una botella de alcohol, no resultan suficientes si el contexto asociado al consumo de alcohol sigue estando presente (Janak and Chaudhri, 2010).

La extinción se llevó a cabo en un contexto diferente, contexto B, donde las señales contextuales asociadas con el alcohol y éste no se encontraban disponibles. Una vez cumplido el criterio de extinción, se procedió a realizar el test de recaída alcohólica en el contexto A.

En el test, los animales del grupo control aumentaron notablemente el número de pulsaciones activas en el contexto A en comparación con los niveles en el período de extinción, lo que indica un restablecimiento de la autoadministración de alcohol, confirmando la validez del procedimiento experimental (Wilson et al., 2018). Sin embargo, **los animales inyectados con GAL(1-15) mostraron una reducción significativa de las pulsaciones de palanca activa, de manera que se produjo una reducción del restablecimiento de la autoadministración mostrando, por tanto, una reducción en la recaída alcohólica inducida por GAL(1-15) (figura 6).**

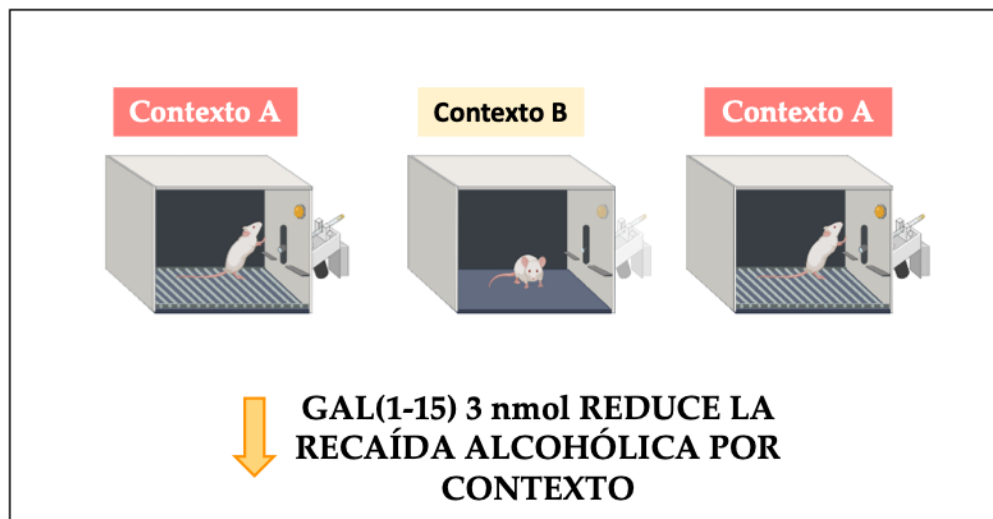


Figura 6: Resultados de GAL(1-15) en recaída alcohólica.

En nuestro estudio, la recaída alcohólica se llevó a cabo en el contexto previo donde los animales aprendieron a autoadministrarse alcohol. Este contexto estuvo acompañado de señales asociadas a la disponibilidad del alcohol, siendo la combinación de ambas (señal + contexto) más fuerte que la presentación aislada de una sola condición en el test.

Por ejemplo, en la cepa de ratones C57B1/6 se confirmó que la señal contingente a la conducta operante (luz, tono) acompañada del contexto asociado a la disponibilidad de la droga, tuvo mayor efecto en la recaída alcohólica en comparación con la presentación de señales en el contexto de extinción o con la ausencia de señales en el contexto asociado con la droga (Janak and Chaudhri, 2010). Además, los trabajos de Bachteler combinaron señales y contexto dando como resultado un aumento de las presiones de palanca para la obtención del refuerzo en comparación con las dos señales por separado (Bachteler et al., 2005; Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Nuestro modelo de recaída alcohólica ha estado determinado por el cambio de contexto principalmente, aunque existen otros tipos de recaída como la reexposición a la droga o priming o por la exposición a factores estresantes (O'Brien et al., 1992; Sinha, 2011; Fredriksson et al., 2021).

Así, la recaída a sustancias puede llevarse a cabo bajo una condición libre de drogas o no, sin embargo, una persona no recaerá si no consume previamente la sustancia objeto de adicción (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). En la recaída por priming, se presenta una pequeña cantidad de sustancia para que el animal recaiga, por ello se podría decir que la recaída alcohólica por contexto realizada en esta tesis podría considerarse también una especie de mix entre recaída por contexto y priming, ya que implica la aparición simultánea de los estímulos que se encuentran asociados al alcohol (señales, contexto, etc) así como el alcohol en sí al llevar a cabo la respuesta operante (Nieto et al., 2021).

La reincidencia en el consumo es un factor crucial en el trastorno por uso de alcohol, siendo una de las conductas que con frecuencia culmina en recaída y, por tanto, uno de los principales retos del tratamiento del TUA (Domi et al., 2021).

Nuestros resultados sugieren la capacidad de GAL(1-15) para reducir la recaída en el consumo de alcohol, lo que amplía su perfil de uso en el tratamiento del TUA. No obstante, es necesario seguir estudiando el efecto de este péptido en otros modelos de recaída alcohólica, así como en modelos de abstinencia para completar el perfil farmacológico de la GAL(1-15) en alcoholismo.

1.4 Efecto de GAL(1-15) por la vía de administración intranasal.

Como hemos visto a lo largo de esta tesis, GAL(1-15) ha sido principalmente administrada en rata mediante inyecciones únicas intracerebroventriculares para la evaluación del efecto del fragmento en autoadministración de alcohol.

Se seleccionó esta vía de administración ya que GAL(1-15) no pasa la barrera hematoencefálica (Kapur, 2011), por lo que para conocer su efecto es necesario administrarla directamente en el cerebro. La vía intranasal es una alternativa no invasiva de administrar fármacos al cerebro que permite un enfoque factible y muy atractivo, especialmente para los péptidos (Costantino et al., 2007; Serova et al., 2013). Este método permite que los fármacos entren rápida y directamente en el sistema nervioso central mediante las vías intracelulares neuronales olfativas y extracelulares que se encuentran asociadas al nervio trigémino, pasando la barrera hematoencefálica permitiendo así su acceso a múltiples partes del cerebro (Thorne et al., 1995; Ionescu et al., 2012; Serova et al., 2013).

Con el objetivo de comprobar la compatibilidad de la vía intranasal con la GAL(1-15), se analizó el papel del fragmento vía intranasal en la prueba de autoadministración de alcohol.

Los resultados demostraron que GAL(1-15) administrada de forma intranasal, redujo de forma significativa el número de refuerzos y el número de pulsaciones de palanca activa en autoadministración de alcohol, confirmando el efecto que realiza su administración intracerebroventricular. Otros autores han mostrado la eficacia de la vía intranasal para la administración de péptidos, así estudios de Serova y colaboradores han demostrado cómo la administración intranasal del neuropéptido Y (NPY) es capaz de modular el estrés postraumático con una única administración del péptido (Serova et al., 2013, 2014, 2019).

En los experimentos de administración intranasal realizados en esta tesis, la dosis de GAL(1-15) utilizada fue la de 75 µg, ya que previamente, realizamos una curva dosis respuesta en la prueba de natación forzada y comprobamos que la administración de dicha dosis resultaba suficiente para observar cambios de comportamiento en rata (estos datos no se muestran en esta tesis doctoral).

Por otro lado, para la correcta administración del péptido los animales deben ser anestesiados previamente, ya sea con éter o con el anestésico inhalatorio isofluorano (Serova et al., 2013, 2014, 2019). En nuestros experimentos se decidió usar el anestésico isoflurano ya que resulta menos agresivo para el animal en comparación con el éter permitiendo además un control adecuado de la profundidad anestésica, así como una rápida recuperación (Herbst et al., 2019).

Bibliografía reciente indica que la administración de isofluorano en comparación con otros anestésicos como tribromoetanol o el hidrato de cloral en rata, no afecta al resultado posterior de las pruebas de comportamiento, ni a corto (2 h) ni a largo plazo (7 días), como en el FST o en el EPM ni a la eficacia antidepressiva de determinados fármacos como la imipramina, por lo que se trata de un buen anestésico para el estudio de fármacos y péptidos en pruebas de conducta animal (Herbst et al., 2019).

En nuestra evaluación de GAL(1-15) intranasal una hora antes de la autoadministración de alcohol, en general vemos que ambos grupos experimentales muestran una reducción de los refuerzos obtenidos, no obstante, el grupo administrado con GAL(1-15) es el que reduce de forma significativa tanto el número de refuerzos como el número de pulsaciones de palanca activa.

Por tanto, la administración de GAL(1-15) 75 µg de forma intranasal en rata, resultó en una disminución significativa de la búsqueda de alcohol, lo que nos sugiere que GAL(1-15) podría utilizarse mediante esta vía para su futura traslación a humanos para el tratamiento del trastorno por uso de alcohol.

1.5 GAL(1-15) en la cepa Marchigian Sardinian (msP): un modelo animal con alta preferencia por el alcohol.

Durante la estancia en la Universidad de Camerino (Italia) se trabajó sobre el modelo de rata con preferencia por el alcohol, la cepa msP. Esta cepa se deriva originalmente de ratas Wistar y ha sido criada selectivamente debido a su alta preferencia y consumo de alcohol en la Universidad de Camerino a partir de la cepa de ratas sP, desarrolladas originalmente en la Universidad de Cagliari (Cerdeña, Italia) (Colombo et al., 2006; Borruto et al., 2021).

Esta cepa de rata alcohólica está caracterizada por mostrar una preferencia innata por el alcohol, además de presentar un fenotipo muy ansioso, con vulnerabilidad al estrés y con síntomas similares a la depresión, comportamientos que mejoran con el consumo de alcohol. A nivel molecular, se ha observado una alta expresión del gen que codifica los receptores del factor liberador de corticotropina (CRF) así como una hiperactividad de CRF en distintas zonas cerebrales (Cicocioppo et al., 2006; Borruto et al., 2021).

En los experimentos realizados en Camerino el objetivo fue estudiar el efecto de GAL(1-15) tanto en machos como en hembras en la prueba de autoadministración de alcohol en la cepa msP. Los entrenamientos en la caja de autoadministración fueron más rápidos debido a que estas ratas muestran una mayor preferencia por el alcohol que la cepa Sprague Dawley y no fue necesario realizar un faiding previo con sacarina.

Se administró la dosis de 3 nmol ya que resultó ser la dosis efectiva en la cepa Sprague Dawley en la prueba de autoadministración de alcohol, sin embargo, ni la administración de GAL(1-15) a la dosis de 3 nmol ni a la dosis de 6 nmol mostró diferencias significativas con respecto al grupo control en ninguno de los dos sexos.

A la vista de estos resultados, no se puede descartar que la falta de efecto de GAL(1-15) en este modelo de rata con preferencia por el alcohol pueda deberse a una alteración del sistema galaninérgico. Es por ello que, como planteamiento para un futuro próximo, se estudiará el sistema galaninérgico de las cepas msP y Sprague Dawley, para evaluar si existen diferencias a nivel de receptores entre ambas cepas que pudiera explicar la ausencia de efecto de GAL(1-15) sobre la cepa msP.

Es importante destacar, que el TUA es un trastorno muy heterogéneo asociado con múltiples fenotipos por lo que no se podría proponer un único modelo animal representando al TUA de forma general pero sí se pueden simular determinadas características fenotípicas específicas que resulten similares a distintas poblaciones de pacientes con trastorno por uso de alcohol, como la cepa msP (Borruto et al., 2021). Por ello, el uso de cepas preferentes por el alcohol sigue siendo necesario para nuestros estudios con GAL(1-15) para la validación de su uso en población vulnerable al consumo de alcohol.

2. GAL(1-15) en combinación con el antidepresivo escitalopram (ESC) en la comorbilidad alcoholismo y depresión.

2.1 Efecto de GAL(1-15) y ESC en la Prueba de Preferencia de Sacarosa (SPT).

En el segundo bloque de esta tesis doctoral, se estudió el papel de la combinación de GAL(1-15) junto con ESC en la modulación sobre el consumo crónico de alcohol, así como sobre otros reforzadores como la sacarosa o la sacarina, y la implicación de esta combinación en los trastornos del estado de ánimo.

El efecto de la combinación de GAL(1-15)+ESC en anhedonia fue estudiada en la prueba de preferencia de sacarosa, una de las pruebas más conocidas que se utilizan en experimentación animal para la evaluación de la anhedonia definida como una pérdida de interés o motivación, que constituye una de las principales características de la depresión (Marco et al., 2017; Höflich et al., 2019; Markov et al., 2022).

En la depresión, los ISRS son los fármacos antidepresivos más recomendados, en concreto dos de ellos, fluoxetina (FLX) y escitalopram (ESC) (Boyce-Rustay et al., 2006; Artigas, 2013; Pastoor and Gobburu, 2014; Edinoff et al., 2021). Es interesante destacar que el ISRS ESC resulta más eficaz que la FLX en la reducción de los síntomas depresivos para el tratamiento de la fase aguda de la depresión mayor (Cipriani et al., 2009) y se ha estudiado en la terapia para la depresión resistente al tratamiento (TRD) con aripiprazol (Morton et al., 2021) o con buspirona (Shin et al., 2020).

En este trabajo se realizó una curva dosis-respuesta del antidepresivo ESC en la prueba de preferencia de sacarosa, con un patrón de inyección del ESC subcrónico 23, 5 y 1 hora antes de la prueba, ya que es el patrón que simula el tratamiento crónico en humanos (Reed et al., 2008) y se observó que la dosis de ESC 10mg/Kg no modificó los parámetros evaluados en esta prueba como el consumo y la preferencia de sacarosa, por lo que fue la dosis elegida para coadministrar con GAL(1-15).

La coadministración de dosis subumbrales de ESC (10 mg/Kg) y GAL(1-15) (1 nmol) produjo una reducción significativa en el consumo y preferencia por la sacarosa a las 2 horas, efecto mantenido a las 24 horas de la administración de los tratamientos. Los trabajos previos de nuestro grupo de investigación sobre GAL(1-15) en anhedonia muestran que la administración de dosis efectivas de GAL(1-15) (3 nmol) induce una reducción del consumo y preferencia por la sacarosa, produciendo un fuerte fenotipo similar a la anhedonia en un modelo no operante, como es el test de preferencia de sacarosa (SPT). Además, se obtuvieron resultados similares en otras pruebas que también evalúan anhedonia como, por ejemplo, en la prueba de orina de la hembra donde GAL(1-15) demostró una disminución del refuerzo sexual o en la prueba el novelty suppressed feeding (NSF) donde produjo una disminución del efecto reforzante de la comida tras un periodo de ayuno (Millón et al., 2019a). En la presente tesis, la dosis de ESC 7.5 mg/Kg resultó efectiva en el SPT, ya que redujo de forma significativa tanto el consumo como la preferencia por la sacarosa a las 2 horas. Por tanto, podemos observar que la administración de ambos tratamientos, GAL(1-15) y ESC, a dosis subumbrales, produce una fuerte reducción en el consumo y la preferencia de sacarosa.

Por otro lado, estudios sobre estrés crónico y anhedonia revelaron que la administración crónica de ESC no solo no revirtió los síntomas de anhedonia mostrados en el test de preferencia de sacarosa, sino que, además, exageró el perfil ansiogénico de los animales del estudio (Yang et al., 2015).

La administración de GAL(1-15) junto con ESC nos muestra que esta combinación resulta más potente en el aumento de la pérdida de motivación por la sacarosa, lo que puede ayudar a comprender mejor los problemas de anhedonia, proporcionando una base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con el uso de análogos de GAL(1-15) para el tratamiento de la depresión así como de las enfermedades relacionadas con la recompensa.

2.2 Combinación de GAL(1-15) y ESC en modelos operantes: sacarina y alcohol.

2.2.1 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de sacarina.

Una vez comprobado el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y ESC sobre la anhedonia en un modelo no operante el objetivo fue estudiar esta combinación en un modelo operante de autoadministración de sacarina, ya que la sacarina es un reforzador artificial utilizado frecuentemente para medir los efectos hedónicos en animales de laboratorio (Pucilowski et al., 1993). Los modelos de autoadministración operante son una buena herramienta para estudiar la conducta motivada por la búsqueda de recompensa en modelos animales (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006; Ettenberg, 2009; Calleja-Conde et al., 2023).

En la prueba de autoadministración de sacarina observamos que la dosis de ESC 2.5 mg/Kg fue la dosis no efectiva, ya que no modificó ni el número de refuerzos de sacarina ni el número de pulsaciones de palanca activa, mientras que la dosis de ESC 7.5 mg/Kg fue la dosis efectiva con una reducción significativa de todos los parámetros evaluados en la autoadministración de sacarina.

En el test, la combinación de GAL(1-15) y ESC indujo una reducción sustancial en el número de refuerzos, sugiriendo que la coadministración de GAL(1-15) + ESC causó una pérdida de la conducta motivacional inducida por la sacarina. Por tanto, **observamos que la pérdida de la conducta motivacional se induce con la coadministración de dosis subumbrales tanto de GAL(1-15) como de ESC** (Millón et al., 2019a; García-Durán et al., 2021).

La serotonina es un neurotransmisor implicado en la modulación de la recompensa y la aversión reduciendo las propiedades reforzantes de la comida, la sacarina o el alcohol (Browne et al., 2019; Bahi, 2024), por ejemplo, estudios han demostrado que tras la administración aguda de citalopram en ratones SERT-KO, se produjo una reducción en el consumo de sacarina, indicando por tanto una función inhibidora del 5-HT en la motivación por las recompensas o incentivos, como la sacarina (Browne et al., 2016). Además, estudios optogenéticos recientes también han descubierto que la combinación de la estimulación de las neuronas de serotonina del rafe dorsal con una dosis baja de citalopram redujo la respuesta operante a la sacarina, lo que sugiere que las neuronas de serotonina del rafe dorsal ejercen una influencia inhibitoria sobre la respuesta operante a la recompensa a través de una interacción directa con el sistema DA mesolímbico a nivel del ATV (vía DRN-ATV).

Por tanto, implicaría la influencia inhibitoria de las neuronas serotoninérgicas sobre las neuronas dopaminérgicas del ATV, estableciéndose una relación entre el sistema serotoninérgico y dopaminérgico (Browne et al., 2019; Bahi, 2024).

Trabajos previos revelaron que GAL(1-15), pero no GAL, indujo una fuerte reducción en el número de refuerzos, en la prueba de autoadministración de sacarina, siendo este efecto bloqueado por el antagonista GALR2, M871 (Millón et al., 2019a). Junto a estos resultados, se observó que el efecto de GAL(1-15) en la reducción de la motivación en la tarea de autoadministración de sacarina está mediado por el sistema mesolímbico dopaminérgico, observándose un aumento en la expresión de los receptores de DA, como el D3, tanto en el ATV como en el NAc y una reducción de los transportadores de DA en el ATV, lo que sugiere que GAL(1-15) participa en reorganización funcional del sistema dopaminérgico (Millón et al., 2019a).

Hasta ahora, se ha observado que la administración sola de GAL(1-15) produce efectos similares a la anhedonia, y además, cuando se combina con el antidepresivo ESC en la prueba de autoadministración de sacarina, se observa una pérdida de la motivación. Esto se evidencia en una disminución en el número de refuerzos por la sacarina, lo que conlleva a una pérdida de la conducta motivacional.

Nuestros resultados muestran un potente efecto de la combinación de GAL(1-15) con el ISRS ESC en la pérdida de la motivación en la autoadministración de sacarina, lo que sugiere un papel clave de esta combinación en la motivación por la recompensa.

2.2.2 Efecto de GAL(1-15) y ESC en autoadministración de alcohol.

Tras los resultados obtenidos sobre la disminución de la motivación frente a diferentes reforzadores se plantearon nuevos estudios para comprobar si la combinación de GAL(1-15) y ESC era eficaz también en otros reforzadores como las drogas de abuso, en concreto, en el alcohol debido a su alta prevalencia y comorbilidad con la depresión.

Para ello, en nuestros estudios, los animales fueron entrenados en las cajas de autoadministración para obtener un consumo de alcohol crónico a lo largo de todo el procedimiento experimental en un programa de ratio fijo FR1. Los animales con un consumo estable y crónico de alcohol al 10% realizaron la prueba de autoadministración de alcohol donde se observó que la coadministración de dosis subumbrales de ESC (2.5 mg/Kg) y GAL(1-15) 0.3 nmol redujo de forma significativa el número de refuerzos de alcohol y el número de pulsaciones de palanca activa, provocando una pérdida de la conducta motivacional inducida por el alcohol.

El sistema serotoninérgico desempeña un papel fundamental en los mecanismos neurobiológicos que subyacen tanto al trastorno por uso de alcohol como a la depresión, por ejemplo, se ha observado que niveles bajos de 5-HT se correlacionan con una elevada ingesta de alcohol (Maurel et al., 1999; Bahi, 2024). Los fármacos que aumentan los niveles cerebrales de 5-HT son uno de los tratamientos recomendados para el alcoholismo ya que, o bien inhiben la recaptación de serotonina, como los ISRS, o estimulan la liberación de 5-HT atenuando de esta forma la ingesta de alcohol.

Así, estudios preclínicos han mostrado una reducción en el consumo de alcohol en rata normal y con preferencia por el alcohol donde, tras la administración de ESC en un modelo voluntario de consumo de alcohol, los ISRS como FLX o citalopram redujeron la ingesta y la preferencia por el alcohol de forma dependiente de la dosis, tanto en ratas que no habían consumido alcohol como en ratas con alta preferencia por el alcohol (Maurel et al., 1999). Además, en ratones knockout del transportador de serotonina, se observó una reducción en el consumo de alcohol en el paradigma de elección libre, confirmando el papel de la serotonina en el consumo de alcohol (Kelaii et al., 2003; Boyce-Rustay et al., 2006).

Por otro lado, la combinación de ESC con otros compuestos, como el acamprosato o el aripiprazol, en pacientes con TUA y depresión mayor comórbida, ha mostrado una mejora de los síntomas depresivos a pesar de continuar con el consumo de alcohol (Witte et al., 2012; Han et al., 2013). De hecho, en estudios preclínicos con la cepa de ratón C57BL/6J, la combinación de acamprosato y ESC redujo la ingesta de alcohol tanto en ratones estresados como en los no estresados, lo que supone que esta combinación podría ser de utilidad para las personas con TUA con o sin depresión comórbida en la reducción del consumo de consumo de alcohol (Ho et al., 2016).

A la vista de estos resultados, la combinación GAL(1-15) y ESC podría modular el sistema de recompensa con reforzadores como el alcohol y la sacarina, abriendo la posibilidad de utilizar esta combinación como estrategia terapéutica en la comorbilidad de la depresión y el TUA (figura 7).

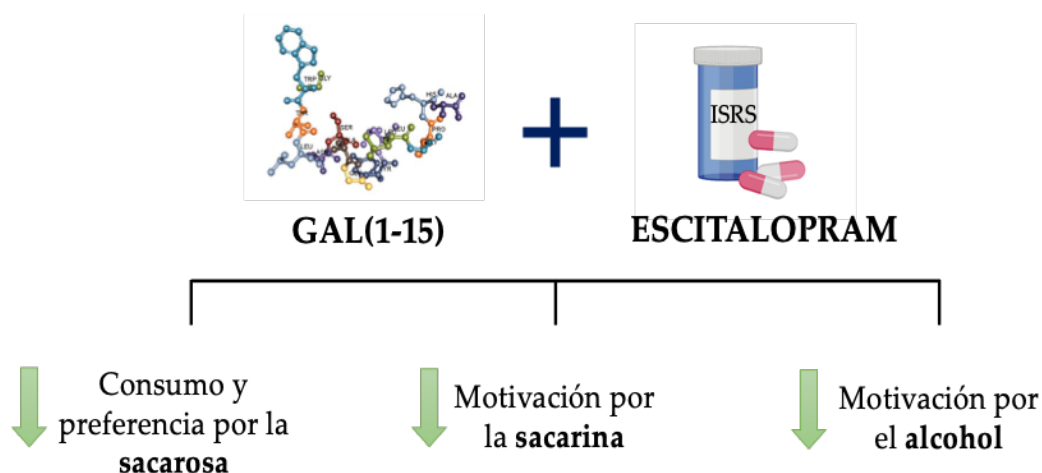


Figura 7. Esquema que representa los principales resultados de la combinación de GAL(1-15) y ESC en las pruebas de preferencia de sacarosa y autoadministración de sacarina y alcohol.

2.2.2.1 GAL(1-15) y ESC en pruebas de desesperanza y ansiedad.

Animales sometidos a una **autoadministración diaria de alcohol** realizaron varias pruebas de evaluación del estado emocional para analizar el efecto de la combinación de GAL(1-15) y ESC. Para ello, se realizaron pruebas de desesperanza, entre las que se encuentran el FST y el TST (Porsolt et al., 1977).

El FST es una de las pruebas más ampliamente utilizadas para la evaluación de las conductas depresivas y su base se apoya en la conducta de desesperanza (Porsolt et al., 1977). Con el uso de esta prueba se predice la eficacia de los tratamientos antidepresivos, así, la reducción en el tiempo de inmovilidad, supone un efecto del fármaco antidepresivo ya que mejora la neurotransmisión de serotonina relacionada con la movilidad (Detke and Lucki, 1996). Sin embargo, los efectos del ESC en ratas naive muestran un rango de respuesta variable desde no mostrar ningún efecto (Reed et al., 2008) hasta una disminución de la conducta de inmovilidad en el FST (Jastrzębska-Więsek et al., 2018).

Los resultados del presente trabajo demostraron que, en ratas con consumo de alcohol crónico, la administración sola de ESC (7.5 mg/Kg) aumentó significativamente el tiempo de inmovilidad y disminuyó el tiempo de natación en el FST, lo que supone un efecto contrario a los antidepresivos. Pese a encontrarnos con un efecto adverso, en nuestro estudio, GAL(1-15) revirtió los efectos adversos mediados por el ESC en el FST. **De esta forma, la combinación de GAL(1-15) y ESC mejoró la sintomatología negativa producida por la administración de ESC, situándose a nivel de los animales controles.**

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación sobre desesperanza han demostrado que la combinación de GAL(1-15) con el antidepresivo FLX (10 mg/Kg) ha potenciado los efectos antidepresivos inducidos por la FLX sola, no solo en animales naive (Flores-Burgess et al., 2017, 2019), sino también en un modelo animal de depresión, como son las ratas con bulbectomía bilateral olfatoria (Flores-Burgess et al., 2021). Precisamente en este modelo animal, animales con bulbectomía bilateral olfatoria, la combinación de GAL(1-15)+ESC se ha estudiado también, y ha mostrado un efecto de potenciación del efecto del ESC en pruebas de desesperanza como el FST (García-Durán et al., 2021).

Pese a existir estos datos previos mostrando una potenciación del efecto del ESC por parte del fragmento 1-15 en pruebas de desesperanza con diferentes cepas de rata, en el presente estudio hemos obtenido datos contrarios al usar dicha combinación por primera vez en ratas bajo un consumo crónico de alcohol.

Una posible explicación a estos resultados podría ser que tras un consumo diario de alcohol se produce una alteración en la densidad y/o expresión del receptor de serotonina 5-HT_{1A} en el cerebro, (Nevo and Hamon, 1995; Chen and Lawrence, 2000; Pinto et al., 2002) dando como resultado un aumento de la densidad y expresión del autorreceptor somatodendrítico 5-HT_{1A} (Nevo and Hamon, 1995) y una supersensibilidad del autorreceptor 5-HT_{1A} en el rafe dorsal (Kelaii et al., 2008).

Los receptores de serotonina 5-HT_{1A} actúan tanto como autorreceptores en los núcleos del rafe regulando el tono de 5-HT (Blier et al., 2013) como postsinápticamente en las neuronas inhibitoras del resto del cerebro (Raymond et al., 1999). El receptor 5-HT_{1A} presináptico, se encuentra implicado en el consumo de alcohol, un autorreceptor que inhibe la liberación de serotonina como consecuencia del tratamiento crónico con antidepresivos (Lovinger et al., 1997; Gilpin et al., 2008; Dean et al., 2017; Figura 8).

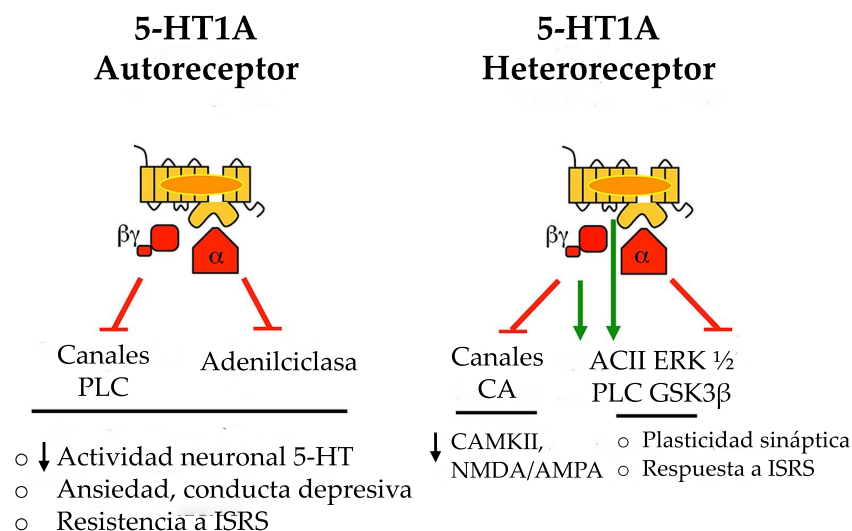


Figura 8. El receptor de serotonina, 5-HT_{1A} como autorreceptor y como heteroreceptor. CA: Calcio; PLC: Fosfolipasa C. Modificado de Albert and Vahid-Ansari, 2019.

Estos receptores 5-HT_{1A} desempeñan un papel crucial en la regulación de la transmisión de la serotonina, lo cual los convierte en un objetivo clave para comprender cómo el alcohol interactúa con el sistema serotoninérgico (Sari et al., 2011). Además, los receptores 5-HT_{1A} están estrechamente relacionados con la ansiedad y la depresión siendo, por tanto, objetivos diana especialmente relevantes para los estudios que exploran los patrones de comportamiento asociados con el alcoholismo, así como con la comorbilidad alcoholismo-depresión.

El aumento de la densidad y de la sensibilidad funcional del autorreceptor 5-HT_{1A} podría explicar los efectos prodepresivos que se observaron tras la administración de ESC en el FST en animales bajo un consumo crónico de alcohol: El ESC, a través del bloqueo del transportador de serotonina (SERT), eleva el tono central de 5-HT, lo que se traduce en una mayor liberación de 5-HT, sin embargo, el alcohol induciría un aumento de la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A} hipersensibles, lo que resulta en una disminución de la 5-HT liberada de forma neta (Sari et al., 2011).

Por tanto, podemos sugerir que el consumo crónico de alcohol produciría un aumento de la actividad del autorreceptor 5-HT_{1A} en el rafe dorsal, aumentando por tanto su sensibilidad (Gilpin et al., 2008), y al administrar el antidepresivo ESC en animales que se autoadministran alcohol, produciría una disminución de la serotonina liberada (Sari et al., 2011), lo que podría explicar los efectos depresivos como el aumento de la inmovilidad o la disminución del tiempo de natación encontrados en la prueba del FST de esta tesis.

Por otro lado, la combinación de GAL(1-15)+ESC en estos animales, revierte los efectos producidos por ESC, volviendo a los niveles de los animales controles. Esto puede explicarse por la interacción existente entre la GAL(1-15) y el receptor 5-HT1A, la cual ha sido descrita tanto a nivel funcional como a nivel de receptor en los últimos años (Millón et al., 2016, 2017; Flores-Burgess et al., 2017, 2019, 2021). Por ejemplo, la administración de GAL(1-15) mejoró los efectos antidepresivos inducidos por el agonista del receptor 5-HT1A, 8-OH-DPAT, en el FST, siendo dichos efectos bloqueados por el antagonista GALR2, M871, revelando así una posible interacción entre el fragmento de Galanina 1-15 y el 5-HT1A (Millón et al., 2016).

En la combinación estudiada de GAL(1-15)+FLX, se ha demostrado que el uso del antagonista del receptor 5-HT1A, Way100635, bloquea el efecto de potenciación de GAL(1-15) sobre el efecto de la FLX (Flores-Burgess et al., 2017), lo que indica un importante papel del receptor 5-HT1A en la interacción GAL(1-15)+FLX, apoyando la existencia de un complejo heteroreceptor GALR1-GALR2-5HT1A (Millón et al., 2016; Fuxe et al., 2008, 2012; Borroto-Escuela et al., 2018).

Es importante destacar la existencia de una interacción a nivel molecular entre el fragmento de Galanina 1-15 y el receptor 5-HT1A que pueden ser clave para explicar los resultados obtenidos en la presente tesis. En estudios previos de autoradiografía, se ha demostrado como la administración de GAL(1-15) tuvo la capacidad de reducir la densidad (Bmax) del receptor 5-HT1A presináptico así como sus niveles de expresión del ARNm en rafe dorsal tras su administración, lo que sugiere una mejora en la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas descendientes del rafe dorsal, es decir, facilitando la liberación de serotonina en este núcleo, lo que conduciría a una mejora de los efectos antidepresivos (Millón et al., 2016).

Por tanto podemos decir que este mecanismo de interacción entre GAL(1-15) y el receptor de serotonina 5-HT1A, podría ser responsable de la mejoría del comportamiento relacionado con la depresión por parte del ESC en el FST observada con GAL(1-15).

Así, GAL(1-15) estaría modulando las características de unión, como el aumento de densidad y sensibilidad funcional y los niveles de expresión del ARNm inducidos por el alcohol, en los receptores 5-HT1A somatodendríticos del rafe dorsal, evitando así los efectos depresivos adversos mostrados por ESC en el consumo de alcohol. Además, estudios de ligamiento por proximidad han revelado una estrecha proximidad de los receptores GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A tanto en rafe dorsal como en hipocampo dorsal (Millón et al., 2016), lo que sugiere la existencia de complejos heteroreceptores que podrían actuar como diana farmacológica y sería interesante para entender la neurotransmisión de serotonina y su capacidad de modulación sobre los receptores 5-HT1A tanto a nivel presináptico como a nivel postsináptico (Millón et al., 2016; Fuxe et al., 2008, 2012; Borroto-Escuela et al., 2018). Aunque estos resultados son interesantes y alentadores, en el futuro deberá llevarse a cabo un estudio detallado de este mecanismo en el trastorno por uso de alcohol.

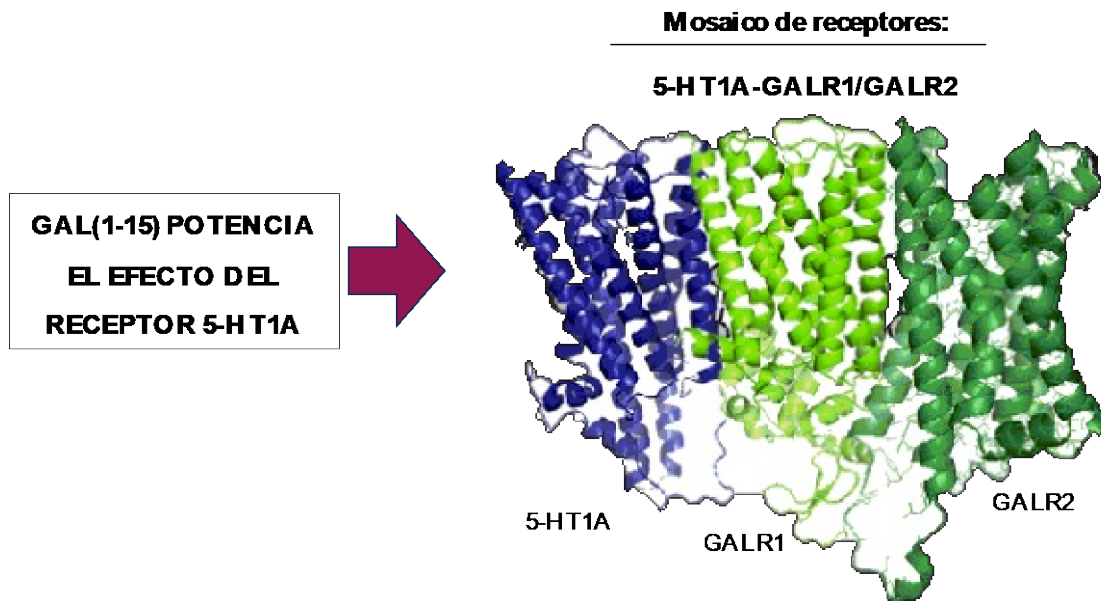


Figura 9. Esquema que representa la potenciación del receptor 5-HT_{1A} producida por GAL(1-15) así como la propuesta de formación del mosaico de receptores 5-HT_{1A}/GALR1/GALR2 como mecanismo que explicaría dicha interacción. Modificado de Fuxe et al., 2012.

Junto al FST, realizamos el TST, el cual también está basado en la conducta de desesperanza (Porsolt et al., 1977). Los resultados mostraron que ni la administración de ESC (7.5 mg/kg) sola ni la coadministración de GAL(1-15) (1 nmol) y ESC (7.5 mg/kg) mostraron diferencias significativas en el tiempo de inmovilidad o movilidad en esta prueba. La ausencia de efecto de GAL(1-15) en la prueba puede deberse a que ésta fue realizada posteriormente al FST y puede que el estrés generado en la primera prueba afectara en la segunda y no pudiéramos ver el efecto de los tratamientos.

En cuanto a la evaluación del estado de ansiedad en animales bajo consumo crónico de alcohol, utilizamos dos pruebas ampliamente validadas para dicho objetivo: el OFT y el EPM. La administración de dosis subumbrales de ESC (2.5 mg/Kg) así como la combinación de GAL(1-15) (0.3 nmol) y ESC (2.5 mg(Kg) no mostró ningún efecto en la conducta de ansiedad en ninguna de las dos pruebas utilizadas.

Estudios sobre ISRS y ansiedad han demostrado que ESC a dosis bajas (1-5 mg/Kg) no muestra efectos ansiolíticos en pruebas de ansiedad como el EPM mientras que la coadministración de ESC (2.5 mg/kg) y el antipsicótico risperidona a una dosis de 0.05 mg/kg indujo un comportamiento ansiolítico al aumentar significativamente el tiempo pasado en los brazos abiertos (Kaminska and Rogoz, 2016). Por otra parte, trabajos previos han demostrado que la administración de GAL(1-15) (3 nmol) en el OFT y en el test de luz oscuridad produce efectos ansiogénicos (Millón et al., 2015). Por tanto, podemos sugerir que la administración de ESC no ha demostrado un efecto claro en estas pruebas de ansiedad y, por tanto, su combinación con el fragmento 1-15 de Galanina no muestra efecto en dichas condiciones.

2.2.2.2 GAL(1-15) y ESC en la expresión de C-Fos en los núcleos implicados en alcoholismo y depresión.

Para el estudio inmunohistoquímico de C-Fos, los animales con consumo crónico de alcohol en autoadministración se perfundieron 90 minutos después de la administración de los tratamientos.

En el **ATV** se observó que la administración de ESC así como la coadministración de dosis no efectivas de GAL(1-15) y ESC produjo una disminución significativa en la activación de células dopaminérgicas en el ATV .

Como se ha comentado a lo largo de esta tesis doctoral, el sistema serotoninérgico está implicado en la comorbilidad de la depresión y el TUA, siendo la serotonina el neurotransmisor principal que actuaría modulando la respuesta a la recompensa y la propiedad reforzante de los distintos reforzadores (Maurel et al., 1999). El mecanismo implicado en el efecto de la 5-HT en el sistema de recompensa interacciona con el sistema dopaminérgico, de hecho, las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal inervan el ATV e inhiben la actividad DA mesolímbica (Browne et al., 2019). Además, en el NAc, las neuronas MSN hacen sinapsis con las neuronas 5-HT del RD, lo que influye directamente en los procesos de recompensa (Dorocic et al., 2014; Hu, 2016).

Varios estudios han demostrado que los ISRS, incluido el ESC, reducen la actividad neuronal DA en el ATV y la liberación DA en el estriado (Clark et al., 1996; Hamati et al., 2020). Esta reducción de la actividad neuronal de dopamina está probablemente relacionada con una interacción serotoninérgica-dopaminérgica en el sistema mesolímbico a través de los receptores 5-HT_{2C} (Dremencov et al., 2009; Visser et al., 2015). Nuestros resultados concuerdan con estos trabajos, ya que el ESC redujo la capacidad de recompensa en los modelos operante (autoadministración de sacarina y alcohol) y no operante (test de preferencia de sacarosa), confirmando que el 5-HT disminuye la función de recompensa.

Estos datos se han visto reflejados en el estudio inmunohistoquímico de la presente tesis doctoral donde la combinación de ESC con GAL(1-15) redujo la activación de células dobles de TH/C-Fos en **VTA**.

Por otro lado, se realizó un Análisis de Componentes Principales con los datos obtenidos en el estudio inmunohistoquímico en el que se relevaron tres factores independientes de las redes neuronales de C-Fos, que explicaban el 80% de la varianza total. El primer factor engloba RD, ATV y RMTg, el segundo factor HbL y HbM y el tercer factor NAc y CPF.

RD, ATV y RMTg componen el primer factor resultante de este Análisis de Componentes Principales que suponen el 33.60% de la varianza explicada. El ATV es el principal núcleo, junto con el NAc, del sistema mesolímbico de recompensa y está compuesto principalmente por neuronas dopaminérgicas, cuyo aumento de la activación se produce en respuesta a recompensas o señales de la presencia de dichas recompensas (Lavezzi and Zahm, 2011). Además, este núcleo está implicado en la conducta de anhedonia inducida por GAL(1-15) (Millón et al., 2019a).

En la parte posterior del ATV, se encuentra el núcleo RMTg compuesto fundamentalmente de neuronas gabaérgicas y que actúa como núcleo conector entre las comunicaciones de ATV y HbL, aunque también tiene conexiones con el RD lo que sugiere que el núcleo RMTg tiene un papel como modulador de la recompensa y la excitación junto con ATV y RD (Lavezzi and Zahm, 2011). En cuanto al RD se sabe que este núcleo es el principal productor de serotonina en el cerebro y que éste media en la recompensa y preferencia por el alcohol, de tal forma que el consumo de alcohol crónico produce una disminución de los niveles de serotonina, suprimiendo la actividad neuronal del RD a través de la activación de los autoreceptores de serotonina (Lovinger et al., 1997).

Además, a través del HbL y el RD el alcohol puede inhibir a las neuronas de 5-HT, mecanismo que podría explicar el papel de la serotonina en la recompensa y la aversión al alcohol (Fu et al., 2017).

En relación al segundo factor, la HbL es una de las pocas regiones que controlan tanto el sistema dopaminérgico como el sistema serotoninérgico. Así, la HbL actúa conectando la corteza límbica con los núcleos relacionados con la depresión, incluidos el ATV y el RD (Hu et al., 2020; Yang et al., 2018). De hecho, la HbL está relacionada con síntomas depresivos, como la indefensión y la anhedonia, ya que se encuentra hiperactivada en personas que presentan depresión mayor (Schmidt et al., 2017) y esta hiperactivación puede suprimir las neuronas DA y 5-HT a través de las neuronas del RMTg gabaérgicas y las interneuronas locales (Hu et al., 2020; Yang et al., 2018). Recientemente se ha descrito que la HbL y HbM están relacionadas con las propiedades aversivas de diferentes drogas de abuso, como la cocaína y el alcohol, ya que la activación de la HbL inhibe a las neuronas dopaminérgicas del ATV, por la acción de las neuronas gabaérgicas del RMTg (Lavezzi et al., 2011).

La HbL actúa disminuyendo su activación en respuesta a señales que predicen recompensas mientras que aumenta su activación en respuesta a estímulos aversivos o a la omisión de recompensas (Lavezzi et al., 2011). Por otro lado, en los períodos de abstinencia alcohólica se produce una hiperexcitabilidad de las neuronas de la habénula lateral que se ha relacionado con la depresión y la ansiedad, trastornos comórbidos con el trastorno por uso de alcohol. Esto puede deberse a una desregulación en los sistemas gabaérgico, glutamatérgico y serotoninérgico en la habénula lateral (Shah et al., 2017).

Junto a estos datos se determinó la relevancia de cada factor en el test de autoadministración de alcohol y se observó que aquellos animales que presentaban un aumento de activación neuronal de C-Fos en el circuito ATV/RMTg tenían más predisposición a presionar la palanca activa en la prueba de autoadministración de alcohol. Por tanto, estos resultados confirman la importancia del papel del ATV en el efecto mediado por la combinación de GAL(1-15) y ESC en la búsqueda de alcohol en la prueba operante de autoadministración de alcohol, demostrando que es un núcleo diana para el estudio de la GAL(1-15) en la motivación por el alcohol (Figura 10).

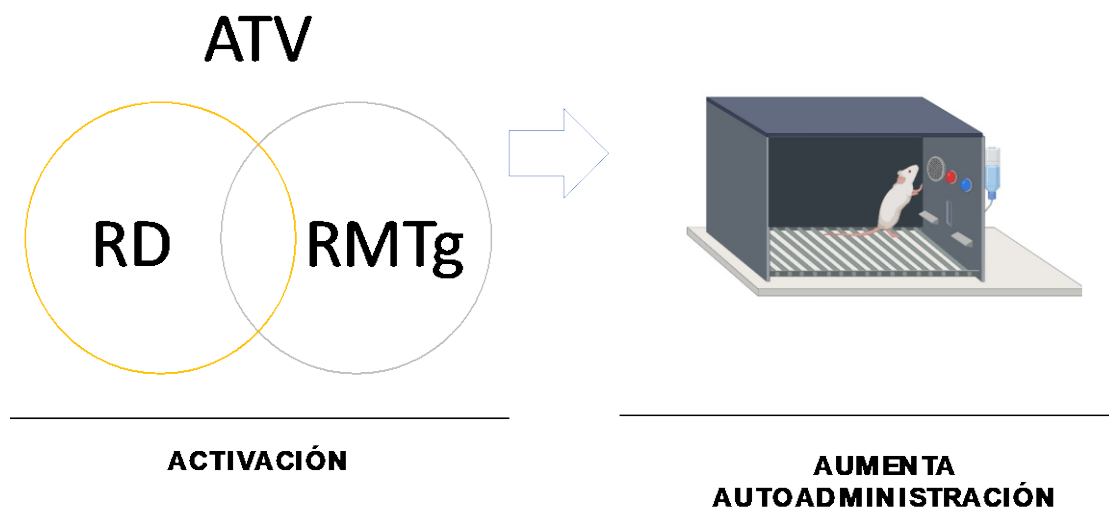


Figura 10. Importancia del factor 1: ATV, RD y RMTg en la predisposición a pulsar la palanca activa en la caja de autoadministración para la obtención de alcohol. Ilustración creada con el programa Biorender.

Conclusiones



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- I.** La administración intracerebroventricular de GAL(1-15) induce una reducción en el consumo y la búsqueda de alcohol en un modelo de autoadministración. La molécula completa de GAL carece de efecto en esta prueba.
- II.** La reducción del consumo y la búsqueda de alcohol producida por la administración de GAL(1-15) se bloquea con el antagonista de los receptores GALR2, M871. Además, la reducción de la expresión de los receptores GALR1 y GALR2 impide el efecto de la GAL(1-15) en esta prueba, indicando una implicación de ambos receptores.
- III.** Los núcleos del sistema de recompensa cerebral como el área tegmental ventral, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal se encuentran implicados en el efecto producido por GAL(1-15) en la prueba de autoadministración de alcohol.
- IV.** El efecto inducido por la administración de GAL(1-15) modula también receptores dopaminérgicos como D1 en la corteza prefrontal y D3 en el área tegmental ventral, en animales con consumo crónico de alcohol por autoadministración.
- V.** La administración de GAL(1-15) induce una disminución de la motivación por el alcohol, mostrando una reducción del *breaking point*, en un programa de ratio progresivo.
- VI.** La administración de GAL(1-15) induce una disminución en la recaída alcohólica inducida por contexto.
- VII.** La vía de administración intranasal replica los efectos producidos por la administración intracerebroventricular de GAL(1-15) en la prueba de autoadministración de alcohol.
- VIII.** Todos estos resultados demuestran que GAL(1-15) tiene un papel específico en el consumo y búsqueda, así como en la recaída alcohólica, lo que sugiere que la administración de GAL(1-15) podría ser una posible diana terapéutica para el trastorno por uso de alcohol.

- IX.** La administración de GAL(1-15) potencia la reducción de la capacidad de recompensa del antidepressivo escitalopram (ESC) sobre diferentes reforzadores como sacarosa o sacarina.
- X.** GAL(1-15) potencia el efecto del ESC en la prueba de autoadministración de alcohol.
- XI.** En animales con consumo crónico de alcohol, GAL(1-15) revirtió los efectos adversos mediados por ESC en el FST, mejorando los síntomas depresivos en un modelo de comorbilidad alcoholismo-depresión.
- XII.** La coadministración de GAL(1-15)+ESC disminuyó significativamente la activación de células dopaminérgicas en el ATV, observadas mediante expresión de C-Fos. Además, el Análisis de Componentes Principales sugirió que existe una red funcional que involucra a los núcleos ATV, RMTg y RD.
- XIII.** La combinación de GAL(1-15) y ESC reduce la motivación por la búsqueda de alcohol además de revertir el efecto producido por la administración única de ESC en el FST, lo que sugiere que la combinación GAL(1-15)+ESC podría utilizarse como una estrategia terapéutica para la comorbilidad alcoholismo-depresión.

Thesis Summary



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Summary

Alcohol use disorder (AUD) is one of the most common disorders worldwide, characterized by an impaired ability to stop or control alcohol consumption despite its negative consequences. Additionally, more than 50% of new patients with alcohol abuse relapse within three months, with the main triggers being stressful events, drug-related cues and context, or re-exposure to a small amount of alcohol. Despite this, pharmacotherapies have had limited use in the treatment of AUD partly due to the low efficacy of the medication. In addition, more than 50% of patients with AUD have a comorbid psychiatric disorder, such as mood disorders.

Galanin (GAL) is a peptide found in the CNS. It has been shown that there are active fragments of GAL, such as the N-terminal fragment 1-15 [GAL(1-15)], which shows biological activity in the CNS. This fragment, GAL(1-15), has shown a specific and differential role concerning the complete GAL molecule, in different functions, specifically in aspects of depression such as anhedonia, as well as in the modulation of drugs of abuse, specifically in the voluntary consumption of alcohol. **In this doctoral thesis, we propose to study GAL(1-15) in alcohol-seeking and motivation as well as in alcohol relapse in a self-administration model. In addition, because depression is one of the most frequent comorbid disorders in alcoholism, the combination of GAL(1-15) with the antidepressant Escitalopram (ESC) will be analyzed in alcohol self-administration as well as in depressive and anxiogenic behaviors in rodents during chronic alcohol consumption.**

The results of the present thesis demonstrate that intracerebroventricular (icv) administration of GAL(1-15) 3nmol induces a significant reduction in alcohol consumption and alcohol seeking, showed in a lower number of reinforcements obtained in a self-administration model. In addition, the involvement of the GALR2 receptor in this effect was demonstrated using a GALR2-specific antagonist (M871), where its administration blocked the impact produced by GAL(1-15). Using an *in vivo* gene silencing model (knockdown), the involvement of the GALR1 receptor was shown, as well as the confirmation of GALR2 involvement since the decrease of GALR1 or GALR2 receptor expression by siRNA was sufficient to block the effect of GAL(1-15). Furthermore, these effects are specific to GAL(1-15), as the entire GAL molecule lacks effect in this assay.

The q-PCR studies revealed that GAL(1-15) induced a significant increase in mRNA levels of the neuronal marker C-Fos in the major reward system nuclei such as the ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex (PFC). GAL(1-15) not only reduces the number of alcohol reinforcements at a fixed ratio 1 (FR1) but also at a progressive ratio, where GAL(1-15) 3 nmol administration was able to reduce the breaking point compared to control animals significantly.

Alcohol relapse is a relevant factor in AUD and that is why it has been the target of study in the present thesis. Thus, after a period of alcohol self-administration in context A, extinction of the behavior was performed in a different context (Context B). During the extinction period, the animals progressively decreased the active lever pulses, until reaching the extinction criterion on day 13. After reintroducing the original context (context A), there was a significant increase in the animal's alcohol seeking, indicating an alcoholic relapse, however, animals injected with GAL(1-15) reduced the active lever pulses significantly compared to control animals, showing a specific role of this fragment in this type of relapse.

Once the pharmacological profile of GAL(1-15) was analyzed, an alternative route of administration compatible with its translation to human use was studied, thus it was observed that the intranasal route of administration is compatible with the use of GAL(1-15) since it replicates the effects produced by the intracerebroventricular administration of GAL(1-15).

This thesis has also evaluated the combination of GAL(1-15) and the antidepressant ESC for the study of alcoholism-depression comorbidity. The experiments performed demonstrate that the coadministration of GAL(1-15) with ESC decreases the rewarding power of sucrose or saccharin in the self-administration paradigm, being also more potent than that shown by ESC alone. Moreover, GAL(1-15)+ESC coadministration induces a reduction in alcohol-seeking behavior in the self-administration test, indicating a potentiation of the effect of ESC in this test leading to a decrease in alcohol motivation.

In animals with chronic alcohol consumption, GAL(1-15) administration reversed ESC-mediated adverse effects on the FST (Forced Swimming Test) hopelessness test, confirming that the GAL(1-15) + ESC combination improves depressive symptoms in a model of alcoholism-depression comorbidity.

Immunohistochemical studies revealed that GAL(1-15)+ESC coadministration significantly decreased the activation of dopaminergic cells in the VTA, observed by C-Fos expression. In addition, a Principal Component Analysis (PCA) was performed that suggested the existence of a functional network involved in the effects on alcohol self-administration, involving the VTA, RMTg, and DR nuclei, which reinforces the importance of the VTA in the effect mediated by the combination of GAL(1-15)+ESC on alcohol seeking.

These results show that GAL(1-15) has a specific role in alcohol consumption and alcohol seeking, as well as in alcohol relapse, suggesting that GAL(1-15) administration could be a possible therapeutic target for alcohol use disorder. On the other hand, the combination of GAL(1-15) and ESC reduces alcohol-seeking motivation in addition to reversing the effect produced by single ESC administration on FST, suggesting that the GAL(1-15)+ESC combination could be used as a therapeutic strategy for alcoholism-depression comorbidity.

INTRODUCTION

1. Alcohol Use Disorder (AUD).

Alcohol use disorder (AUD) is one of the most common mental illnesses worldwide, characterised by an impaired ability to stop or control alcohol use despite the negative consequences (Grant et al., 2015). According to the DSM-5, alcohol use disorder is characterised by a problematic pattern of alcohol use that result in clinically significant impairment or distress, with at least two manifest criteria occurring within a 12-month period (APA, 2014). Craving is a key aspect of addiction, affecting the motivational, cognitive-behavioural and psychophysiological domains (Iwanicka and Olajossy et al., 2015).

According to the World Health Organization (WHO), alcohol consumption causes 2.5 million deaths worldwide each year; total per capita alcohol consumption among the world's population aged 15-44 increased from 5.5 litres of pure alcohol in 2005 to 6.4 litres in 2016, with the European Union being the region with the highest consumption (WHO, 2018). In addition, binge drinking is increasingly practised by young people. In Spain, alcohol is the most widely consumed drug, especially among young people, with an increase in the practice of binge drinking in 2018 (EDADES, 2022).

The 2019 coronavirus disease (COVID-19) and compulsory isolation may be associated with increased alcohol consumption in recent years (Clay and Parker, 2020; Charles et al; 2021; Kilian et al, 2022; Faris et al., 2023).

However, AUD remains severely undertreated, with less than 10% of adults with AUD in Europe receiving pharmacotherapy and or psychotherapy treatment (Rehm et al., 2013; Burnebe et al., 2022). Moreover, pharmacotherapies have seen limited use in the treatment of AUD, partially due to the low efficacy of the medication (Burnebe et al., 2022).

Another relevant factor is that more than 50% of new patients with alcohol abuse relapse within three months being the main trigger the stressful events, the drug-associated cues and context, or the re-exposure to a small amount of alcohol (Sinha, 2011; Fredriksson et al., 2021; Tavares et al., 2023). In particular, re-exposure to environmental contexts where the drug was previously use is a potent trigger for relapse: context acts as a signal indicating drug presence in one context and drug absence, extinction, in a different context (Bouton, 2002; Crombag et al., 2008, Janak and Chaudhri, 2010; Valyear et al., 2017).

Many laboratories have developed rodent strains with high alcohol consumption and preference (Spangel et al., 2017; Nieto et al., 2021). An example of such strains is the Marchigian Sardinian (msP) strain, which has proven to be a good preclinical model for alcoholism, bred for 20 years at the University of Camerino (Italy) from Sardinian rats predisposed to drink alcohol (Ciccocioppo et al., 1998, 2006). The msP strain shows an anxious and depressive phenotype and is characterized by high consumption and preference for alcohol, without showing aversion (Ciccocioppo et al., 2006).

The reward circuit is the most relevant system in addiction that it includes the nuclei ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens (NAc), and prefrontal cortex (PFC), as well as dopaminergic, serotonergic (serotonin receptors such as 5-HT1A), GABAergic, and glutamatergic neurotransmitter systems involved in reward, memory, executive control and or aversion (Eşel and Dinç, 2017).

The majority of research on drug use in animals has been based on non-operant learning models, such as the two-bottle choice, and operant models, such as the self-administration test, a model more similar to addiction in humans in which variables referring to the response itself, such as the rate or frequency of responses, are recorded, and which is useful in the study of substance relapse, such as the ABA relapse model (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

2. Comorbidity for alcoholism and depression.

Depression is the most common comorbid disorder with AUD (J.S, 2014; Becker et al., 2017). The rate of AUD and depression comorbidity have been assessed in epidemiologic studies that linked AUD to 3.7-fold higher odds of experiencing a depressive episode in the prior year (Kessler et al., 1996), and individuals with a lifetime diagnosis of major depression to a 1.3-fold increased risk of AUD (Grant et al., 2015). Furthermore, these studies found that major depression worsened the symptoms of AUD and viceversa (Swendsen et al., 2000), which may explain why people with comorbid depression and AUD are at greater risk for suicide (Wilcox et al., 2004; Anderson et al., 2017). According to the self-medication theory, alcohol addiction develops as a result of a negative emotional state, which induces alcohol consumption as a strategy to relieve psychological pain (Turner et al., 2018).

Dysregulation of the serotonergic (5-HT) system is present in the comorbidity of both pathologies (Torrens et al., 2005). 5-HT presents a key role in motivation, involved in reward and motivation through interactions with the mesolimbic dopaminergic system (Gomez-Coronado et al., 2018; Browne et al., 2019).

A link between serotonergic neurotransmission and alcohol intake is suggested based on preclinical studies of alcohol administration in animals and humans, neuropathological examination of alcohol-preferring animals and application of pharmacological probes that affect the 5-HT system (Torrens et al., 2005; Sari et al., 2011).

Although clinical studies found SSRIs improved depressed mood and decreased alcohol use in some alcohol-dependent individuals (Muhonen et al., 2011), the efficacy of SSRI in AUD and depression comorbidity patients is unclear (Nunes and Levin, 2004; Torrens et al., 2005; Agabio et al., 2018). Antidepressants had positive effects on specific relevant outcomes related to depression and alcohol use but not on others (Agabio et al., 2018). It is, therefore, of great importance to find new pharmacological strategies that could modulate alcohol consumption and depression. Escitalopram (ESC), a pure S-enantiomer of citalopram, 100-fold more potent than the R-enantiomer in inhibiting 5-HT reuptake (Cipriani et al., 2009), is currently one of the most widely used SSRIs (Owens et al., 2001). The combination of ESC with other compounds, such as acamprosate or aripiprazole, in AUD patients with comorbid major depression showed a significant improvement in depressive symptoms despite ongoing drinking (Wibe et al., 2012; Han et al., 2013; Ho et al., 2016).

3. Galanin and the N-terminal fragment 1-15 of Galanin.

Galanin (GAL) is a neuropeptide (Tatemoto et al., 1983) widely distributed in the central nervous system (CNS) (Jacobowitz et al., 2004). GAL action is mediated by three receptors: GALR1, GALR2 and GALR3. Currently, an antidepressant and anxiolytic role of GALR2 suggested, while, on the opposite, the activation of GALR1 and GALR3 receptors could have prodepressant and anxiogenic effects (Genders et al., 2020).

GAL participates in several central functions (Genders et al., 2020; Mitsukawa et al., 2008; Picciobo et al., 2008; Díaz-Cabiale et al., 2010; Lang et al., 2015) and also it is involved in drug abuse and addiction (Picciobo et al., 2008) including alcohol intake and alcoholism (Lewis et al., 2004, 2005; Ash et al., 2014; Genders et al., 2020).

Not only GAL, the Galanin (1-15) [GAL(1-15)] is an N-terminal fragment of GAL, which is active in the CNS (Díaz-Cabiale et al., 2010; Flores-Burgess et al., 2017; Millón et al., 2017). GAL(1-15) shows a differential and specific role than the complete molecule of GAL in several central functions, including depression, anxiety and alcohol intake (Millón et al., 2015, 2017, 2019 a,b). The three cloned receptors have a higher affinity for GAL than for GAL(1-15), but the discovery of specific GAL(1-15) binding sites in the rat brain highlights the important role of GAL fragments in GAL communication, particularly in the dorsal hippocampus, neocortex and striatum (Hedlund et al., 1992; Fuxe et al., 2012).

Moreover, GAL(1-15) decreased, via central mechanisms, the preference and alcohol consumption in a voluntary alcohol intake model in rats (Millón et al., 2019 b). GAL(1-15) induced a significant increase in immediate-early gene C-Fos in the striatum, indicating a high relevance of this nucleus in the GAL(1-15)-mediated effects on the voluntary alcohol intake (Millón et al., 2019b).

Also, the critical role of the striatum as a target for GAL(1-15) was supported by the ability of GAL(1-15) to enhance the suppression of locomotor activity induced by ethanol (Millón et al., 2019b).

Moreover, we have described that the neuropeptide GAL(1-15) induces strong depression and anxiogenic-like effects (Millón et al., 2015, 2017; Flores-Burgess et al., 2017) and also a strong anhedonia-like phenotype, a key symptom of depression, in non-operant and operant models, producing a loss of motivational behaviour caused by an artificial reinforcer, accompanied by the dopaminergic mesolimbic system modulation (Millón et al., 2019a) and acting through GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes in the CNS (Millón et al., 2015, 2017, 2019a). However, GAL(1-15) is able to enhance the antidepressant effects induced by the 5-HT_{1A}R agonist 8-OH-DPAT in the forced swimming test (FST) (Millón et al., 2016), which involves alterations in both the binding characteristics and mRNA levels of 5-HT_{1A}R in the dorsal hippocampus and dorsal raphe (Millón et al., 2016).

GAL(1-15) combined with SSRIs could improve their effectiveness in treating depression symptoms. Thus, we observed in rats that GAL(1-15) enhanced the antidepressant effects induced by fluoxetine in tests related to despair and anhedonic behaviour. This GAL(1-15) effect was also observed in an olfactory bulbectomized rat (OBX) model of depression (Flores-Burgess et al., 2017, 2019). GAL(1-15) also enhanced the antidepressant-like effects induced by ESC in OBX rats, and 5HT_{1A}R significantly participates in the GAL(1-15)/ESC interaction (García-Durán et al., 2021). Two functional networks were involved in the effects; one of them includes the lateral (LHb) and medial (mHB) habenula, dorsal raphe (DR) and ventral tegmental area (VTA), and the other includes the dentate gyrus (DG) and prefrontal cortex (PFC) (García-Durán et al., 2021).

OBJETIVES

Bases on these preliminary results, in this doctoral thesis we propose to address two **main objectives**:

1. Study the effect of GAL(1-15) on alcohol seeking-behavior and motivation for alcohol in an operant model of self-administration, as well as to describe the possible mechanism of action of this fragment of Galanin.
2. Analyze the combination of GAL(1-15) and the antidepressant escitalopram as a possible pharmacological strategy for depression-alcohol comorbidity.

To perform these main objectives, the following **specific objectives** will be proposed:

1. To analyse the role of GAL(1-15) in alcohol consumption and alcohol seeking-behavior using the self-administration test.
 - a. To study the role of GAL(1-15) and its comparison with the complete Galanin (GAL) molecule.
 - b. To analyse the role of GALR1 and GALR2 receptors in the effect produced by GAL(1-15).
 - c. Study the changes in gene expression produced after GAL(1-15) administration in the mesocorticolimbic system.
 - d. Analyse the role of GAL(1-15) in the degree of motivation for alcohol using a progressive ratio programme.
 - e. To evaluate the role of GAL(1-15) on alcohol relapse context-induced.

- f. Study the effect of GAL(1-15) by a route compatible with use in patients: the intranasal route.
 - g. Analyse the effect of GAL(1-15) on the Marchigian Sardinian rats (msP), a strain with a high preference for alcohol.
2. To analyse the effect of the combination of GAL(1-15) and escitalopram (ESC) on alcoholism-depression comorbidity.
- a. Study the combination of GAL(1-15) and ESC in the sucrose preference test.
 - b. Analyse the combination of GAL(1-15) and ESC in saccharin self-administration.
 - c. To evaluate the effect of the combination of GAL(1-15) and ESC on alcohol self-administration.
 - d. Study the combination effect of GAL(1-15) and ESC on anxiety and depression tests in animals under chronic alcohol consumption.
 - e. To evaluate the molecular mechanisms involved in the combination of GAL(1-15) and ESC in alcohol self-administration, by immunohistochemical studies of the neuronal activity marker C-Fos in the nuclei involved in alcoholism and depression.

RESULTS

All the methodology and results are detailed in the articles appended at the end of the manuscript. In this section we described the most relevant results in this thesis.

1. GAL(1-15) in an alcohol self-administration model.

1.1 Role of GAL(1-15) in alcohol consumption and alcohol seeking behaviour.

1.1.1 Dose-response curve of GAL(1-15).

GAL(1-15) 3nmol induced a significant reduction in the number of reinforcements by 50% and in the active lever presses by 48% compared with control animals. GAL(1-15) (1nmol) induced a less strong but significant effect. GAL(1-15) 0.3nmol lacked an effect in the alcohol self-administration test compared with controls animals.

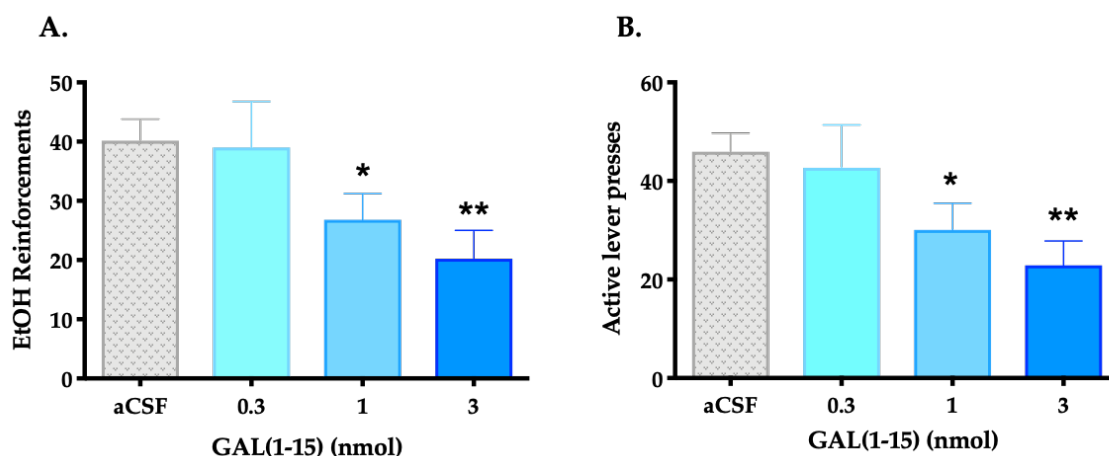


Figure 1. Effect of the administration of Galanin(1-15) on the alcohol self-administration test. GAL(1-15) 0.3nmol (n = 6), 1nmol (n = 11), 3nmol (n = 9) or artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (n = 13) were administered icv 15 min before the test. aCSF injected rats were used as control group. Vertical bars represent a mean $\pm$ standard error of the mean of the number of alcohol reinforcements and the active lever presses. * p < 0.05; ** p < 0.01 vs control group, according to one way ANOVA followed by Fisher Multiple Comparison Test.

1.1.2 Effect of GAL(1-15) on gene expression in the mesolimbic system.

1.1.2.1 GAL(1-15) on C-Fos mRNA expression in VTA, NAc and PFC.

In animals under chronic alcohol consumption by self-administration, GAL(1-15) 3 nmol produced a significant increase in the mRNA levels of C-Fos in the VTA, NAc and PFC compared with aCSF group.

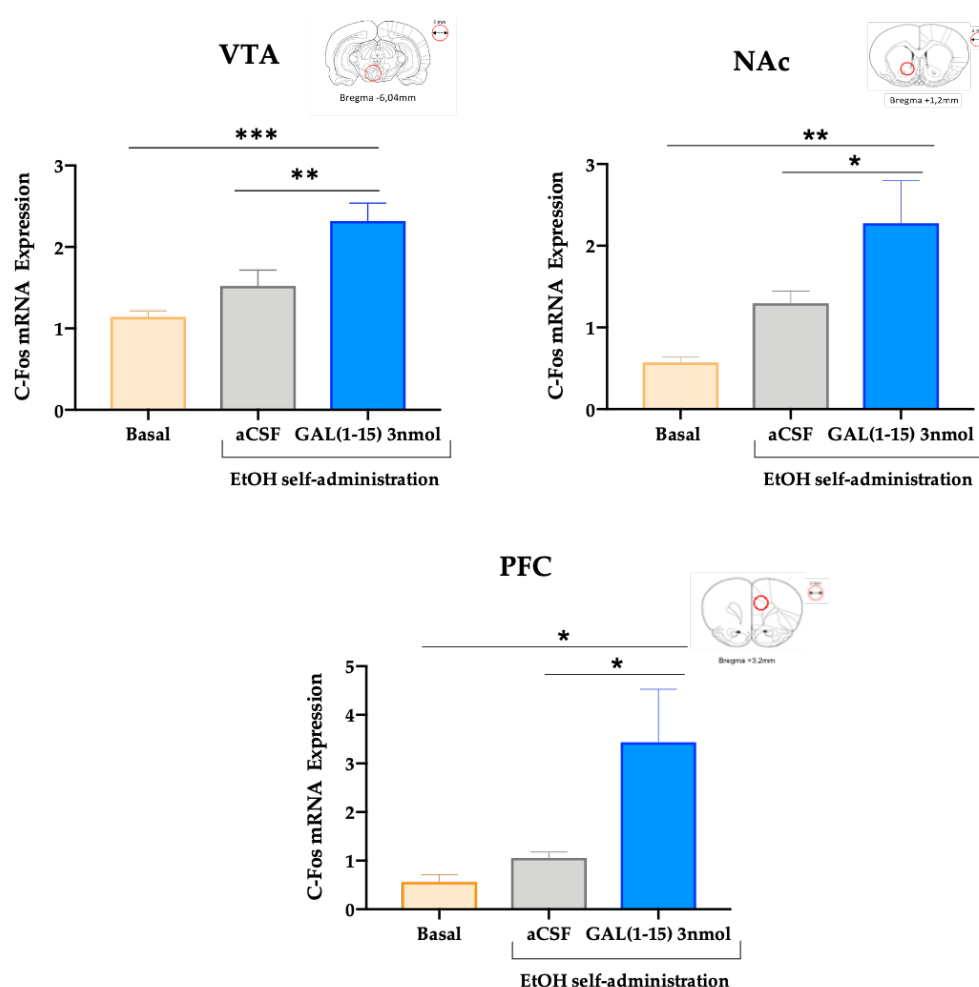


Figure 2. Effect of GAL(1-15) fragment on C-Fos mRNA expression levels in the Ventral Tegmental Area (VTA), Nucleus Accumbens (NAc) and Prefrontal Cortex (PFC). GAL(1-15) 3nmol (n=5-6) was administered icv one hour before measurements. Animals without previous alcohol consumption by self-administration were considered as baseline group (n=5). Animals injected with aCSF were considered as control group (n=5-6). Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean of C-Fos mRNA expression. A. ** $p < 0.01$ with respect to aCSF; *** $p < 0.001$ with respect to basal group. B. * $p < 0.05$ with respect to aCSF; ** $p < 0.01$ with respect to baseline group. C. * $p < 0.05$ vs aCSF, baseline; based on one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post hoc test.

1.1.2.2 GAL(1-15) on mRNA expression of dopamine D1, D2, D3, D5, DAT, DAT, VMAT2, 5-HT1A receptor and GALR1 and GALR2 receptors in VTA, NAc and PFC.

We have analysed the mRNA expression of the dopamine receptors D1, D2, D3 and D5 in VTA, NAc and PFC.

Table 1

	VTA			NAc			PFC		
	EtOH self-administration			EtOH self-administration			EtOH self-administration		
	Basal	aCSF	GAL(1-15) 3 nmol	Basal	aCSF	GAL(1-15) 3 nmol	Basal	aCSF	GAL(1-15) 3 nmol
D1	1.23 ± 0.31	1.70 ± 0.29	1.73 ± 0.50	2.15 ± 0.11	1.42 ± 0.12	2.72 ± 0.64	0.88 ± 0.17	0.93 ± 0.03	2.12 ± 0.2 ^{*,***}
D2	3.33 ± 0.53	4.96 ± 1.09	4.38 ± 0.61	1.99 ± 0.21	1.47 ± 0.24	1.95 ± 0.35	0.97 ± 0.43	0.87 ± 0.19	0.93 ± 0.28
D3	0.35 ± 0.05	0.95 ± 0.42	2.11 ± 0.57*	5.26 ± 1.32	1.17 ± 0.12 ^{##}	1.17 ± 0.29 ^{**}	1.71 ± 0.40	3.74 ± 2.02	2.08 ± 0.58
D5	1.00 ± 0.17	1.05 ± 0.17	1.01 ± 0.24	1.97 ± 0.44	1.22 ± 0.14	2.93 ± 1.07	2.12 ± 0.32	1.28 ± 0.34	1.53 ± 0.20
GALR1	0.59 ± 0.15	1.29 ± 0.25	0.90 ± 0.28	0.72 ± 0.17	0.79 ± 0.09	1.42 ± 0.36	2.77 ± 0.59	2.73 ± 0.68	4.71 ± 0.93
GALR2	2.54 ± 0.41	4.24 ± 0.99	3.72 ± 0.60	0.35 ± 0.02	0.72 ± 0.18	0.69 ± 0.15	1.81 ± 0.47	1.06 ± 0.14	1.16 ± 0.16
5HT1A	0.57 ± 0.15	0.93 ± 0.07 ^z	1.19 ± 0.09 ^z	1.62 ± 0.29	0.83 ± 0.05	1.58 ± 0.45	2.50 ± 0.44	1.30 ± 0.28 ^z	1.46 ± 0.15*

Table 1. Effects of GAL(1-15) on D1, D2, D3, D5, GALR1, GALR2 and 5HT1A mRNA expression in the ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens (NAc) and prefrontal cortex (PFC). GAL(1-15) (3 nmol/rat) (n=5-7) was injected icv one hour before the measures. Animals without previous alcohol consumption in self-administration was considered the basal group (n=4-5). Cerebrospinal fluid-injected (aCSF) rats were used as the control group (n=4-8). VTA. D3: *p<0.05 vs basal; 5HT1A: #p<0.05 vs basal; **p<0.01 vs basal; NAc. D3: ##p<0.01 vs basal; **p<0.01 vs basal; PFC.D1: ^{◇◇}p<0.01 vs aCSF; ***p<0.001 vs basal; 5HT1A: ^zp<0.05 vs basal; *p<0.05 vs basal; According to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significance difference.

As seen in Table 1, the administration of GAL(1-15) 3 nmol modified the mRNA expression of D3 in the VTA and NAc. In VTA, GAL(1-15) produced a significant increase in D3 mRNA levels compared with basal animals while in the NAc, GAL(1-15) 3 nmol and aCSF induce a significant decrease in D3 mRNA expression compared with basal animals.

In PFC, GAL(1–15) increased D1 mRNA expression compared with basal and aCSF animals.

We have also studied the mRNA expression of dopamine transporters, Vmat2 and DAT, in the VTA. We observed that self-administered alcohol rats [aCSF or GAL(1–15)] showed an increased expression of Vmat2 compared to baseline animals while there was no difference between the experimental group in the DAT mRNA levels.

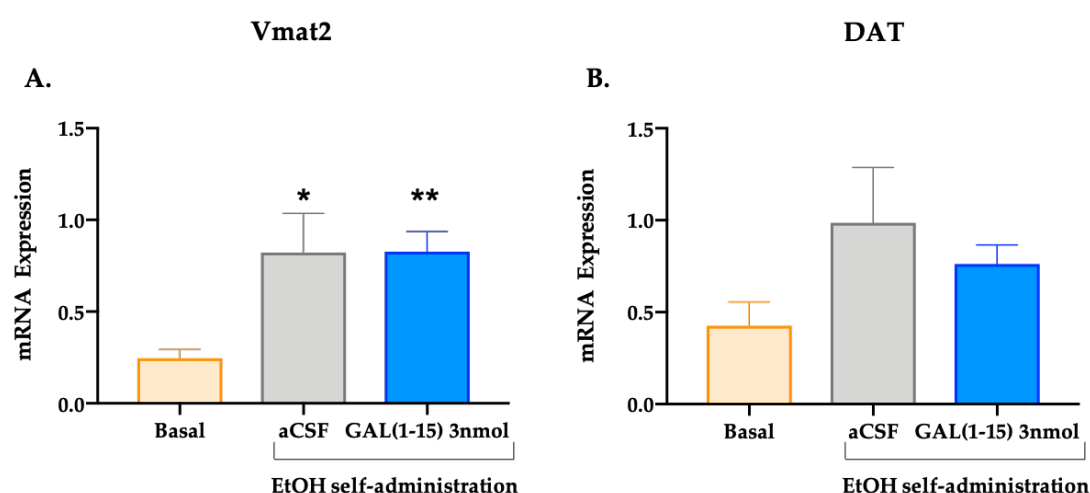


Figure 3. Effect of GAL(1–15) fragment on Vmat2 and DAT mRNA expression levels in the VTA. GAL(1–15) (3 nmol) or aCSF was injected via icv one hour before measurements. Animals with no previous self-administered alcohol consumption (n=5–6) were considered as the basal group. Rats injected with aCSF were used as the control group (n=5–6). Vertical bars represent mean $\pm$ standard error of mean DAT and Vmat2 mRNA expression. A. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ relative to baseline group, according to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significant difference. B. No significant difference between the different experimental groups.

In VTA, GAL(1–15) 3 nmol induced a significant increase of 5HT1A mRNA expression compared with basal group, while aCSF also increased of 5HT1A expression (Table 1). In the PFC, both the administration of GAL(1–15) 3nmol and aCSF decreased 5HT1A mRNA levels compared with basal animals.

In the GALR1 and GALR2 mRNA expression, it was observed that GAL(1-15) administration at a dose of 3 nmol had no effect on GALR1 and GALR2 receptor expression in any of the areas analysed (table 1).

1.1.3 Comparing Galanin (GAL) and GAL(1-15) Effects.

GAL(1-15) 3 nmol significantly reduces the number of reinforcements and the active lever presses compared with GAL. The complete GAL molecule does not affect the number of reinforcements or the active lever presses compared with control animals.

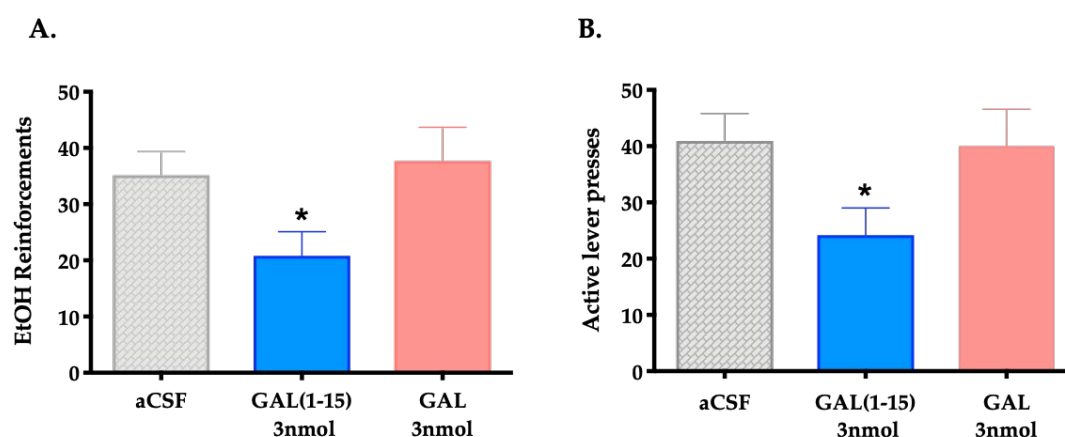


Figure 4. Comparison of the complete Galanin molecule and the GAL(1-15) fragment in the alcohol self-administration test. GAL(1-15) 3 nmol (n = 11), GAL 3 nmol (n = 9) or aCSF (n = 13) was administered via icv 15 min before the self-administration test. Animals administered with aCSF were considered the control group. Vertical bars represents the mean $\pm$ standard error of the mean number of alcohol reinforcements and pulses to the active lever during the self-administration session. *p < 0.05 vs. all other groups, according ANOVA followed by Fisher's post hoc test.

1.1.4 Role of GALR1 and GALR2 receptors in the effect produced by GAL(1-15).

1.1.4.1 GALR2 receptor antagonist, M871.

We have tested the involvement of GALR in the GAL(1-15) effect with the GALR2 antagonist M871 and using two *in vivo* rat models: siRNA GALR1 knockdown or siRNA GALR2 knockdown rats.

The GALR2 antagonist M871 3nmol significantly blocked the GAL(1-15)-induced reduction in the number of reinforcements of alcohol self-administration and in the number of active lever presses. The GALR2 antagonist M871 injected alone in the dose of 3nmol lacked effects in the number of reinforcements of alcohol self-administration and the number of active lever presses.

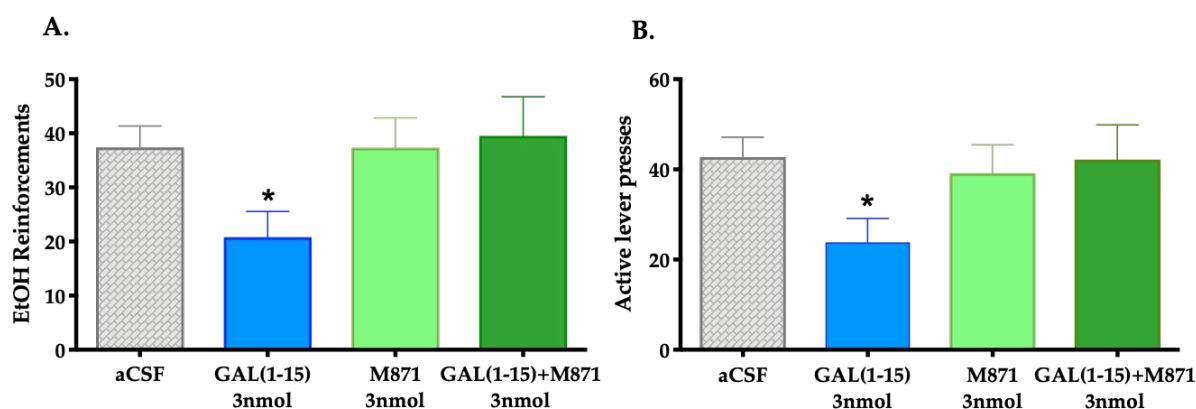


Figure 5. Administration of the GALR2 antagonist, M871, in the GAL(1-15) effect on alcohol self-administration. GAL(1-15) 3 nmol (n = 10), GALR2 antagonist M871 3 nmol (n = 6), GAL(1-15) 3 nmol combined with M871 3 nmol (n = 6) or aCSF(n = 15) were administered via icv 15 min before test. Vertical bars represent mean $\pm$ standard error of the mean number of alcohol boosts and presses to the active lever during the self-administration session. A. * $p < 0.05$ vs the rest of the groups. B. * $p < 0.05$ vs. LCRa and GAL(1-15) + M871 3nmol; according to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's post hoc test.

1.1.4.2 knockdown animals: GALR1 and GALR2 receptors involved in the GAL(1-15) effects.

To study the receptors involved in the effect of GAL(1-15) in the alcohol self-administration, we have used two in vivo rat models: siRNA GALR1 knockdown or siRNA GALR2 knockdown rats in the alcohol self-administration test.

Downregulation of GALR1 or GALR2 by siRNA did not affect any parameter in the alcohol self-administration test. However, the decrease in GALR1 or GALR2 receptors by siRNA was sufficient to block the effect of GAL(1-15) in the alcohol self-administration test. GAL(1-15) at the dose of 3nmol lacked effect in the number of reinforcements, active lever presses neither inactive lever presses in the siRNA GALR1 knockdown or siRNA GALR2 knockdown rats.

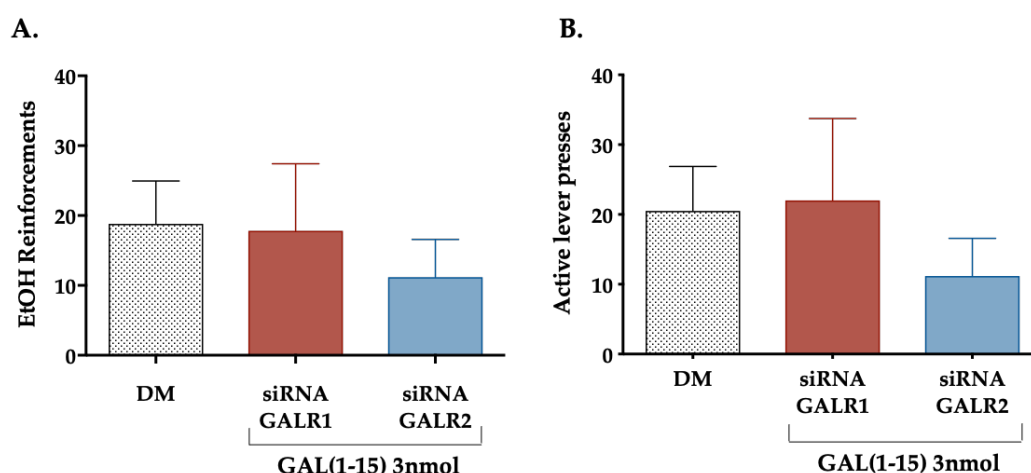


Figure 6. Knockdown rats for GALR1 and GALR2 receptors in the GAL(1-15) effect on alcohol self-administration. Delivery Media (DM) (n = 10), GALR1 siRNA (n = 5), GALR2 siRNA (n = 6) were administered icv 8 days before test. GAL(1-15) or aCSF were administered 15 min before the self-administration test. aCSF and DM were used as the control group. Vertical bars represent mean ± standard error of the mean number of alcohol reinforcements and presses to the active lever during the self-administration session. A, B. There are no differences according to a one-way analysis of variance (ANOVA) between experimental groups in either the number of reinforcements or active lever presses.

1.2 Effect of the administration of GAL(1-15) on alcohol motivation (Progressive Ratio).

In the alcohol self-administration, the animals injected icv with GAL(1-15) (3 nmol) emitted significantly fewer presses during the progressive ratio session and displayed a substantially lower breaking point compared with aCSF treated rats.

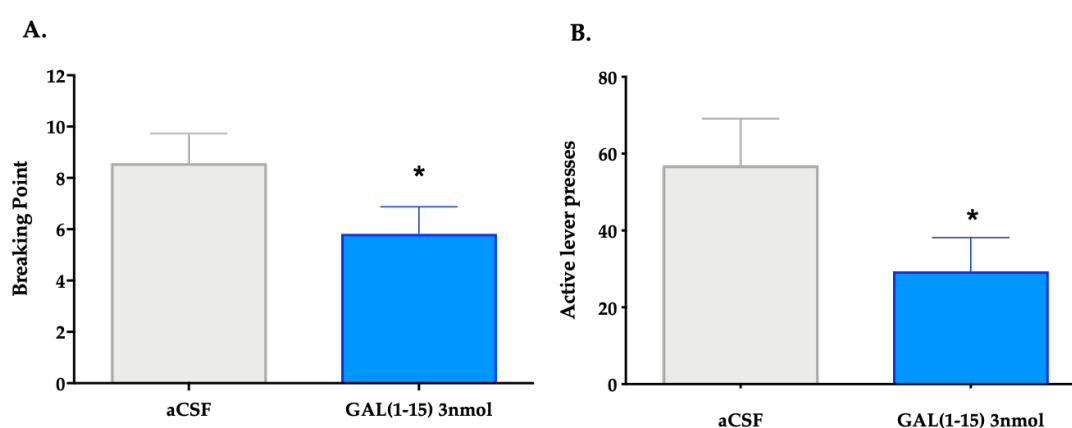


Figure 7. Effect of the administration of GAL(1-15) on alcohol seeking-behaviour (Progressive Ratio). GAL(1-15) 3 nmol (n = 11) or aCSF (n = 14) were administered via icv 15 min before test. aCSF rats were used as a control group. Vertical bars represent mean $\pm$ standard error of mean breaking point and pulsations to the active lever during the hour of testing. A, B. * p < 0.05 with respect to the control group; according to Student's t-test.

1.3 Effect of the administration of GAL(1-15) on alcohol relapse context-induced.

During the extinction period (context B), the animals progressively decreased the pressing for the active lever, reaching day 13 to the extinction criterion.

After context-induced reset (context A), we injected icv GAL(1-15) 3 nmol or aCSF, and we observed that GAL(1-15) 3 nmol reduced the response on the active lever compared to aCSF in alcoholic relapse. Animals injected with GAL(1-15) 3nmol, or aCSF, increased active lever presses in the alcohol self-administration test compared to the extinction group.

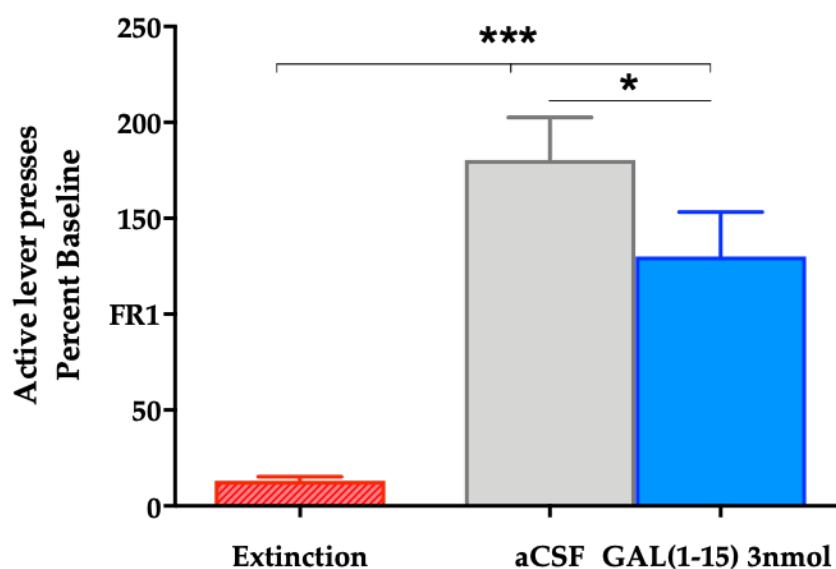


Figure 8. Effect of the administration of GAL(1-15) on alcoholic relapse. GAL(1-15) 3nmol (n = 12) or artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (n = 11) were administered i.c.v 15 min before the test. aCSF injected rats were used as control group. Vertical bars represent a mean $\pm$ standard error of the mean of the active lever presses according to Percent Baseline in FR1 during the test period. * $p < 0.05$ vs control group; *** $p < 0.001$ extinction period vs aCSF, GAL(1-15) 3nmol, according to one way ANOVA followed by Fisher Multiple Comparison Test.

1.4 Intranasal administration of GAL(1-15).

The role of GAL(1-15) intranasal administration route in an operant model of alcohol self-administration was analyzed. As shown in Figure 9, the 75 μ g dose of GAL(1-15) significantly reduced the number of alcohol reinforcements as well as the active lever presses in the self-administration test.

We observed that through the intranasal route of administration, the GAL(1-15) fragment also demonstrates an effect in reducing alcohol consumption in an operant model of self-administration, making the GAL(1-15) compatible for human use.

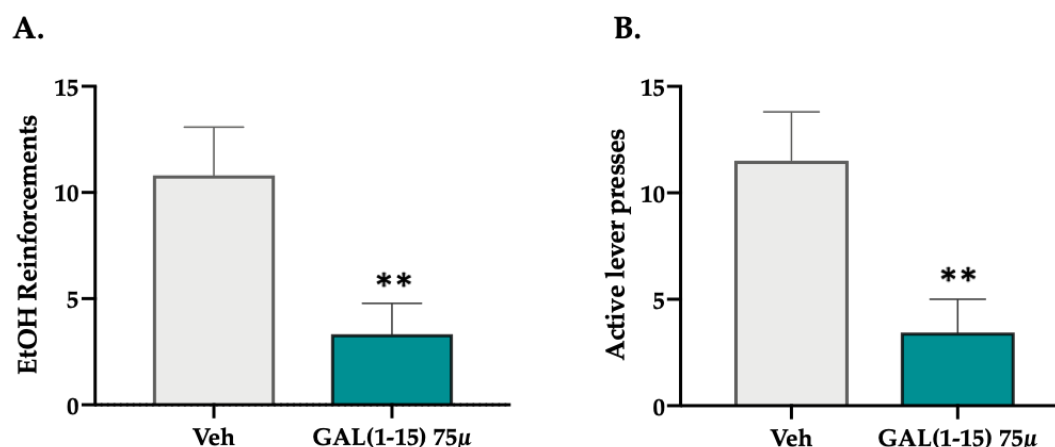


Figure 9. Intranasal administration of the GAL(1-15) fragment in an operant model of alcohol self-administration. GAL(1-15) 75 μg (n=9) or distilled water (n=10) were injected one hour before the alcohol session intranasally, 10 μl of substance per nasal orifice. Animals injected with distilled water were considered the control group. Vertical bars represent the mean ± standard error of the mean of the number of reinforcements and active lever presses during the 30-min alcohol self-administration session. * $p < 0.01$ with respect to the control group according to Student's t-statistic.

1.5 GAL(1-15) in the Marchigian Sardinian (msP) strain: an animal model with high alcohol preference.

GAL(1-15) 3 nmol, 6 nmol or CSFa were administered icv 15 minutes before the alcohol self-administration test.

No differences were observed between the GAL(1-15) injected group and the control group either in the number of reinforcements or in pulses to the active lever in the 30 min self-administration session. Nor were differences observed in the parameters evaluated in alcohol self-administration in either males or females (Figure 10).

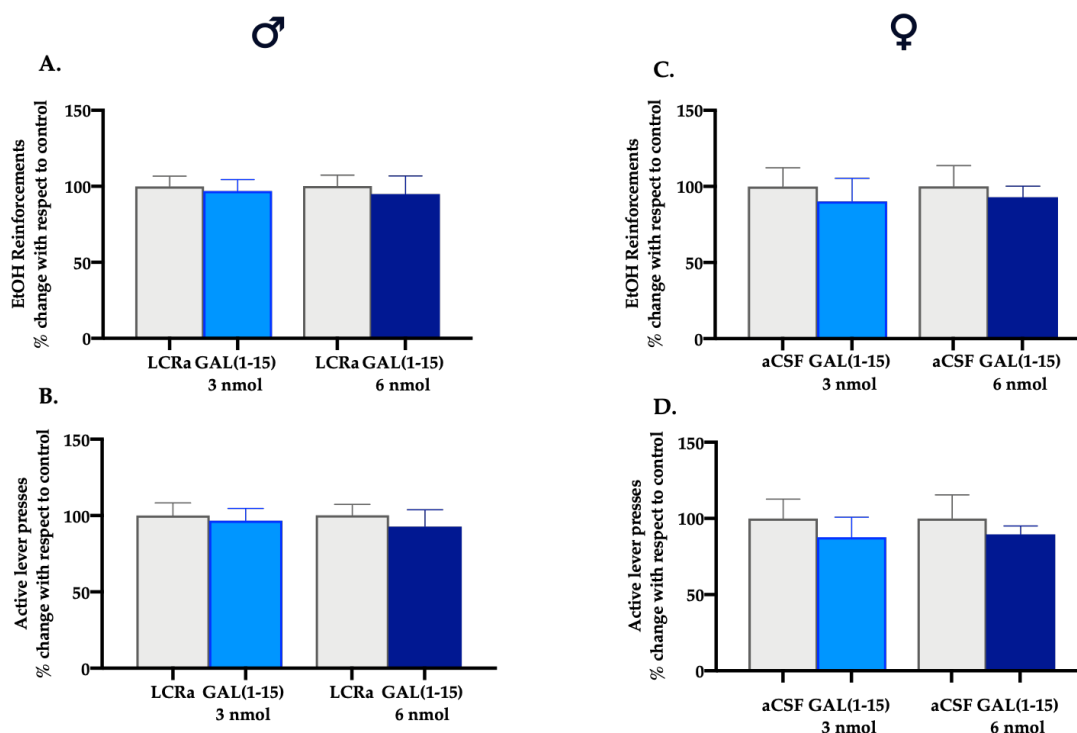


Figure 10. Effect of GAL(1-15) on the alcoholic msP strain. Male and female rats were injected with GAL(1-15) 3 nmol, 6 nmol or CSFa 15 min before the self-administration test. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean number of reinforcements and active lever pulses as a function of % change relative to the control group. No significant differences were found between experimental groups in either males or females in the number of reinforcements or active lever presses.

2. The combination of gal(1-15) with the antidepressant escitalopram (esc) in the comorbidity alcoholism and depression.

2.1 Effect of the combination of GAL(1-15) and ESC in the sucrose preference test (SPT).

The coadministration of ESC (10 mg/kg) and the icv injection of GAL(1-15) (1 nmol) induced a decrease in sucrose intake and in sucrose preference at 2 hours compared with the ESC (10 mg/kg) group in the sucrose preference test, suggesting that GAL(1-15) enhanced the reduction of reward capacity mediated by ESC in this test.

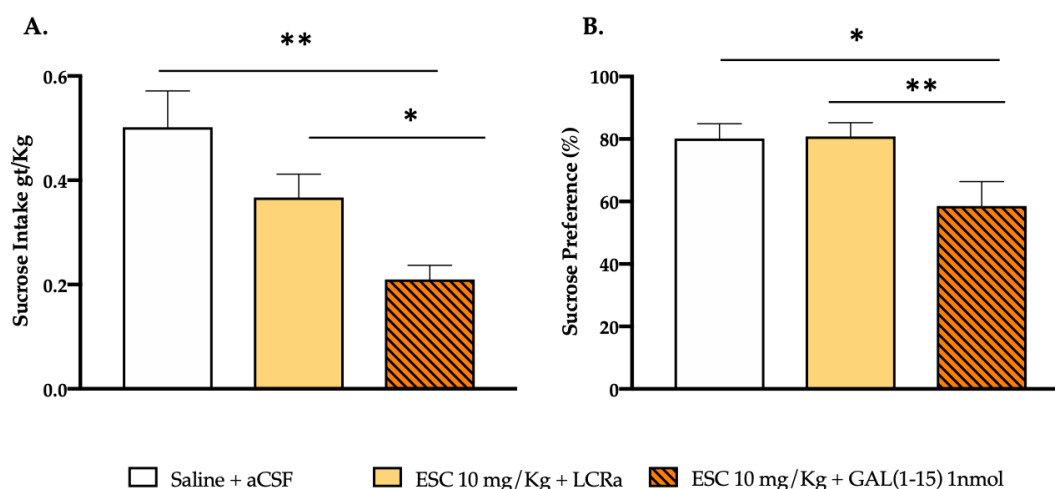


Figure 11. Effect of the administration of GAL(1-15) and Escitalopram (ESC) in the sucrose preference test (SPT). ESC was administrated intraperitoneal (ip) 23, 5 and 1 h before the test and GAL(1-15) 1 nmol or artificial cerebrospinal fluid (aCSF) was administered icv 15 min before the test. Saline + aCSF injected rats were used as the control group ($n = 7-10$ animals/group). Vertical bars represent the mean $\pm$ standard error of the mean of sucrose intake (g/kg) and preference (percentage). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, according to one way ANOVA followed by Fisher multiple comparison test. The saccharin self-administration test.

2.2 Effect of the coadministration of GAL(1-15) and ESC on saccharin self-administration.

In the saccharine self-administration test, the coadministration of threshold doses of GAL(1-15) (1 nmol) and ESC (2.5 mg/kg) induced a strong reduction in the reward capacity of saccharine. Thus, a significant decrease appeared in the number of reinforcements of saccharine self- and in number of active lever presses.

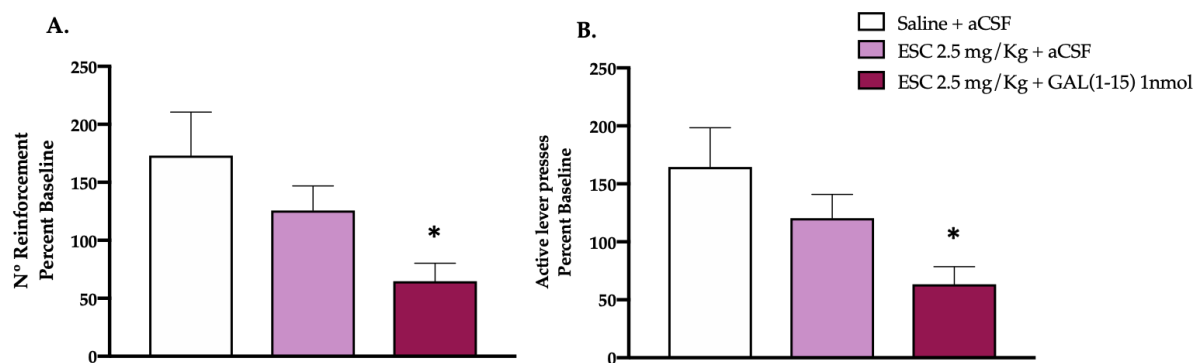


Figure 12. Effect of the administration of GAL(1-15) and escitalopram (ESC) in the saccharin self-administration test. ESC or saline were administered ip 23, 5 and 1 h before the test. GAL(1-15) or aCSF were administered via icv 15 min before the test. Animals injected with saline + aCSF were considered the control group. Vertical bars represent the mean $\pm$ standard error of the mean number of reinforcements and pulsations to the active lever in percentage with respect to baseline for each animal in the self-administration test. * $p < 0.05$ with respect to the control, according to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post hoc test ($n=7-9$ animals per group).

2.3 Effect of the coadministration of GAL(1-15) and ESC on alcohol self-administration.

In this test, the threshold dose of GAL(1-15) (0.3 nmol) enhanced the reduction of alcohol intake mediated by ESC (2.5 mg/kg) in rats. Icv GAL(1-15) decreased the number of alcohol reinforcements, by 50% and the number of active lever presses, by around 50%, induced by ESC.

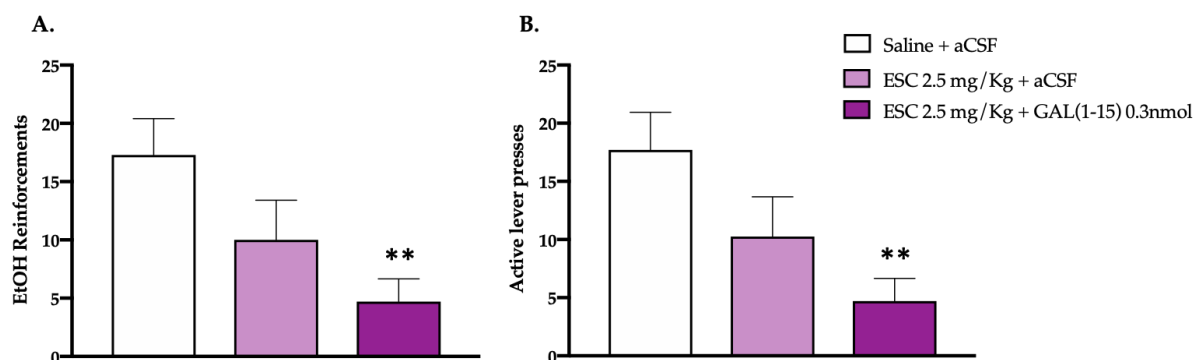


Figure 13. Effect of the administration of GAL(1-15) and Escitalopram (ESC) in the ethanol self-administration Test. ESC was administrated ip 23, 5 and 1 h before the test, and GAL(1–15) 0.3 nmol or aCSF was administered i.c.v 15 min before the test. Saline + aCSF, injected rats were used as control group ($n = 7-8$ animals/group). Vertical bars represent mean $\pm$ standard error of the mean of the number of ethanol reinforcements and active lever presses during the test period. * $p < 0.05$ vs. saline + aCSF, ** $p < 0.01$ vs. saline + aCSF, according to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significance difference test.

2.3.2 The combination of GAL(1-15) and ESC on depression-related behavioral test: the forced swimming test (FST).

In the FST, the subchronic administration of ESC (7.5 mg/kg) in animals with ethanol intake by self-administration induced a significant increase in the immobility time and a decrease in the swimming time compared with the control group, suggesting an adverse effect of ESC in this test. The coadministration of GAL(1–15) (1 nmol) and ESC (7.5 mg/kg) reversed the effect of ESC administration, as the animals cotreated with GAL(1–15) + ESC showed a statistically significant decrease in immobility an increase in swimming with the ESC group.

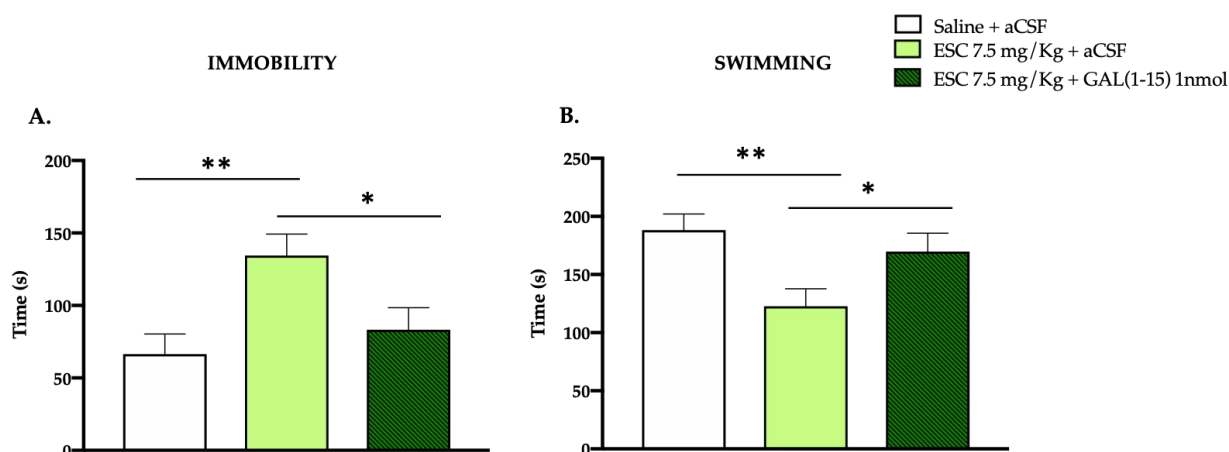


Figure 14. Effect of the administration of GAL(1-15) and Escitalopram (ESC) in the forced swimming test (FST). ESC was administrated intraperitoneal (ip) 23, 5 and 1 h before the test, and GAL(1-15) 1 nmol or artificial cerebrospinal fluid (aCSF) was administered i.c.v 15 min before the test. Saline + aCSF injected rats were used as the control group ($n = 7-8$ animals/group). Vertical bars represent the mean $\pm$ standard error of the mean of immobility time and swimming time in FST during the test period. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, according to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significance difference test.

2.3.3 GAL(1-15) and ESC in C-Fos expression in nuclei involved in alcoholism and depression.

We analyzed C-Fos IR 90 min after the coadministration of GAL(1-15) (0.3 nmol) and ESC (2.5 mg/kg) in several nuclei involved in depression and AUD—RMTg, LHb, mHb, NAc, PFC—and by double immunohistochemical staining of 5HT/C-Fos in DR or TH/C-Fos in VTA.

As seen in Figure 15, in the VTA, the number of C-Fos IR TH cell bodies after icv GAL(1-15) + ESC and ESC was significantly decreased in comparison with C-Fos IR TH cell bodies in the control group. No significative effects were observed in the rest of the nuclei.

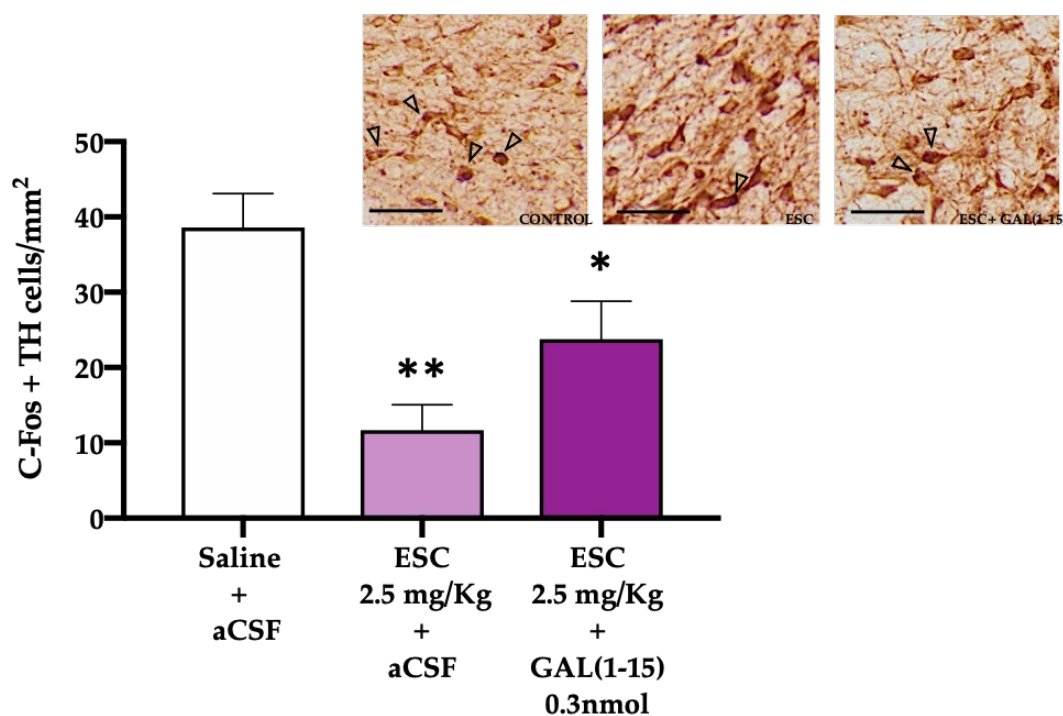


Figure 15. Effect of the administration of GAL(1-15) and Escitalopram (ESC) on C-Fos expression. The mean $\pm$ SEM of C-Fos + TH cells/mm² in the ventral tegmental area (VTA) is shown ($n = 4-5$ animals/group). * $p < 0.05$ vs. saline + aCSF; ** $p < 0.01$ vs. saline + aCSF, according to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's least significance difference test. next to the figure we can see a representative image showing the different treatments tested. Scale= 100 μ m.

The PCA revealed three independent factors representing the functional brain modules or networks underlying C-Fos IR that explained ~80% of the total variance. The first factor encompassed DR, VTA and RMTg (33.60% of variance explained), the second factor was composed of LHb and mHb (26.10% of variance explained), while the third factor was composed of NAc and CPF (19.02% of variance explained).

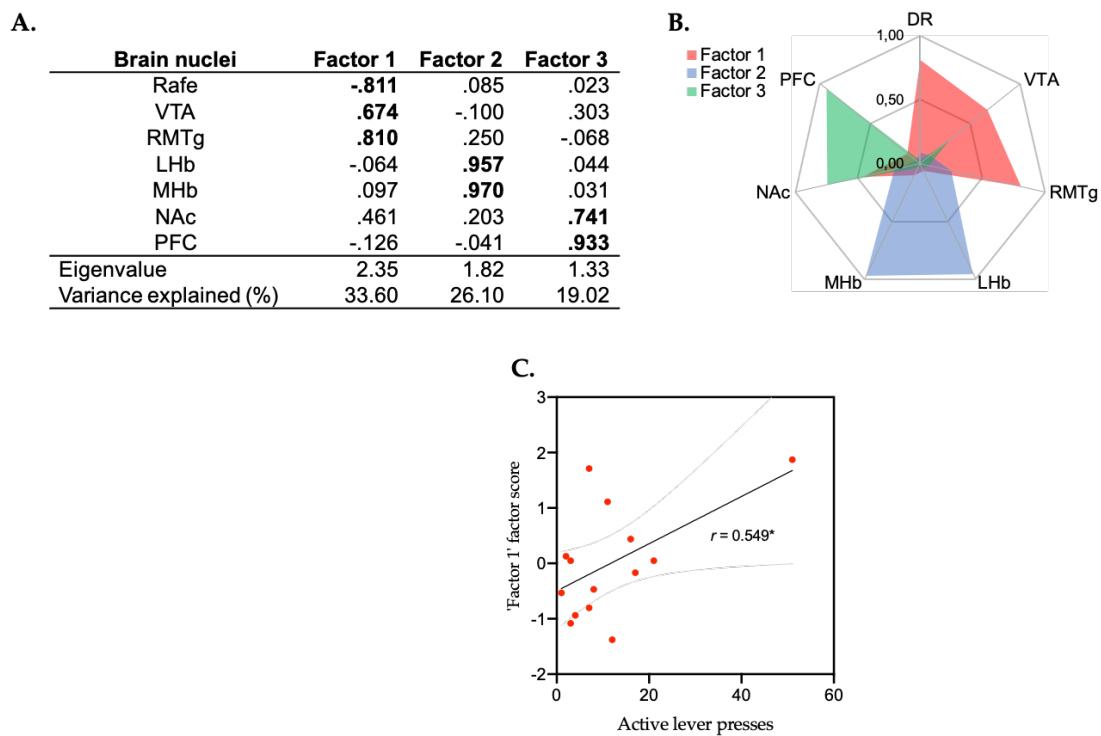


Figure 16. General regions extracted in principal component analyses. (A) Factors extracted from C-Fos data. A PCA revealed three independent dimensions indicative of the amount of activity in the Raphe/VTA/RMTg areas (Factor 1), the Hb (Factor 2) and the PFC/NAc regions (Factor 3). Numerical values indicate factor loadings. (B) Factor 1 was obtained from measures registered in DR, VTA and RMTg; Factor 2 was obtained from measures registered in LHb and MHb; Factor 3 was obtained from measures registered in NAc and CPF. A brain nucleus was considered to be included in a factor when its loading was >0.7 in absolute value (highlighted in bold). High factor scores indicate better performance in each dimension. (C) Correlation between behavioral data (pulsations to the active lever) of the ethanol self-administration test and C-Fos in Factor 1; $r = 0.549$, $*p = 0.042$.

DISCUSSION

1. GAL(1-15) in an alcohol self-administration model.

In the present work, we demonstrated that GAL(1-15) strongly reduced alcohol-seeking behaviour in the operant model of alcohol self-administration, not only in a fixed ratio protocol but also at the breaking point in a progressive ratio schedule. In the alcohol self-administration, an operant model widely used as a tool for studying drug-seeking motivated behaviour (Sanchis-Segura et al., 2006; Ettenberg et al., 2009), GAL (1-15) 3 nmol induced a substantial reduction in the number of alcohol reinforcements suggesting that GAL(1-15) caused a loss of motivational behaviour induced by the alcohol. We confirmed the decrease in motivation for alcohol by analysing the Progressive Ratio (PR) schedule, which can be used to evaluate the reinforcing efficacy of drugs with potential abuse liability (Richardson and Roberts, 1996). After specific training with PR, GAL(1-15) produced a significant reduction in the breaking point, which derived from a PR schedule is sensitive to pharmacological change (Richardson et al., 1996). These results are in agreement with previous works, where the administration of GAL(1-15) induced a reduction of the motivation for different natural and artificial reinforcement including the saccharine self-administration (Millón et al., 2019a) or directly, generating a strong decrease by 90% of preference and alcohol consumption in a voluntary alcohol intake model (Millón et al., 2019b).

In this work, we also observed a differential role of GAL(1-15) compared with the complete molecule GAL in alcohol-seeking motivated behaviour. GAL(1-15) but not GAL induced a significant reduction in the number of alcohol reinforcements in the self-administration test, suggesting that only the GAL(1-15) fragment reduces the motivation to intake alcohol.

We have previously described a different action of GAL and GAL(1-15) in several behavioural functions (Díaz-Cabiale et al., 2010; Millón et al., 2015, 2016), including in the saccharine-seeking motivated behaviour (Millón et al., 2019a) and the alcohol voluntary consumption (Millón et al., 2019b). Therefore, the results of the present work validated a specific role of GAL(1-15) in brain communication.

GALR1 and GALR2 were involved in GAL(1-15) effects since the specific GALR2 antagonist M871 blocked the GAL(1-15) mediated action in alcohol self-administration, and the downregulation of GALR1 and GALR2 by siRNA was sufficient to block the GAL(1-15) effect. The blockade of GAL(1-15) mediated action in alcohol self-administration obtained with the siRNA GALR1 or siRNA GALR2 knockdown rats and the use of the GALR2 antagonist M871 confirm the critical role of both GALR1 and GALR2 in GAL(1-15) mediated action. These results are in consonance with our previous studies showing that GAL(1-15) preferentially binds to GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes (Millón et al., 2015, 2016; Fuxe et al., 2012; Borroto-Escuela et al., 2014).

Importantly, the mesocorticolimbic circuitry participates in the mechanism of GAL(1-15) behaviour-mediated actions since we observed changes in the immediate-early gene C-Fos, dopamine receptor and 5HT1A in the VTA, NAc and PFC. The mesocorticolimbic circuitry participates in GAL(1-15)-mediated effects in alcohol self-administration. In the key mesocorticolimbic reward nodes, VTA, NAc and PFC that are critical for developing and maintaining alcohol reinforcement (Gonzales et al., 2004) and drug addiction (Koob, 1992; Koob and Volkow, 2010). GAL(1-15) induced an increase on the expression of immediate early gene C-Fos, a marker of behaviourally activated neurons in drug self-administration models (Cruz et al., 2015).

In addition, GAL(1-15) modified the D3 expression in VTA and NAc. In the VTA, GAL(1-15) increased the expression of the D3 receptor, a receptor implicated in the motivation to self-administer drugs (Le Foll et al., 2005). This increase in D3 receptors observed could indicate that GAL(1-15) could affect to production and release of DA since D3 receptors are expressed not only in the postsynaptic regions but also in dopaminergic cell bodies, where they may function as autoreceptors (Díaz et al., 2000) with inhibitory effects on impulse flow, synthesis and DA release (Tepper et al., 1997; Leggio et al., 2013).

These results agree with previous works where the GAL(1-15)-mediated reduction of saccharine self-administration was accompanied by a significant increase of D3 receptor expression in VTA, suggesting a reduction in DA release (Millón et al., 2019a). Moreover, GAL(1-15) induced the D1 receptor expression to increase in PFC, where there is growing evidence that the prefrontal cortex modulates ethanol self-administration (Koob et al., 2010; Halladay et al., 2020), confirming the GAL(1-15) modulation over the dopaminergic mesocorticolimbic system.

Interestingly, not only dopamine receptors but also the 5-HT1A serotonin receptor expression was modified in VTA and PFC in GAL(1-15)-administered animals. The interaction between GAL(1-15) and 5-HT1A receptor has been described both at the functional and the receptor level in recent years (Millón et al., 2015, 2016; Flores-Burgess et al., 2017, 2019, 2021; García-Durán et al., 2021). Therefore, the present results confirm the modulation of GAL(1-15) over the 5-HT1A receptor in this model, although future experiments should be performed to determine the role of 5-HT1A in alcohol-seeking behaviour. Although the results indicate the implication of the mesocorticolimbic circuit in the behavioural effect of GAL(1-15), it will be necessary to perform additional experiments to determine the involvement of this circuit.

An essential result of the present work was the ability of GAL(1-15) to reduce context-induced alcohol relapse. Animals with a stable baseline in alcohol self-administration in context A were subjected to an extinction process in context B to subsequently induce an alcohol relapse by context A reintroducing, a paradigm widely used in the context induced alcohol relapse (Domi et al., 2021). The control group markedly increased the number of active lever presses for the previous extinction levels when reintroduced in context A, indicating a reinstatement of self-administration of alcohol, which confirms the validity of the experimental procedure (Wilson et al., 2018). However, animals injected with GAL(1-15) showed a significant reduction in this reinstatement of self-administration, indicating the ability of GAL(1-15) to reduce alcoholic relapse.

Alcohol reinstatement is a crucial factor in AUD, where more than 50% of new patients relapse within three months (Sinha et al., 2011; Domi et al., 2021) being the reintroducing to context-related alcohol consumption one of the behaviours that frequently culminates in relapse and therefore one of the main challenge of alcohol use disorders treatment (Domi et al., 2021). Our results suggest the ability of GAL(1-15) to reduce alcohol relapse, which expands the profile of use in AUD treatment. However, a detailed study of this component should be carried out in the future.

In the experiments with the Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats, GAL(1-15) was administered in the alcohol self-administration test, however, neither GAL(1-15) administration at the 3 nmol dose nor at the 6 nmol dose showed significant differences with respect to the control group in either sex. In view of these results, the lack of effect of GAL(1-15) in this alcohol-preferring rat model may be due to an alteration of the galaninergic system.

Finally, the intracerebroventricular effects of GAL(1-15) on alcohol self-administration were reproduced by the intranasal administration route, which is a non-invasive way to deliver drugs to the brain that allows a feasible and very attractive approach, especially for peptides. (Costantino et al., 2007, Serova et al., 2013). Therefore, the intranasal administration route is compatible with the GAL(1-15) use and could be a possibility to use in humans in the future.

In conclusion, our results indicate that Galanin (1-15) N-terminal fragment induces a strong reduction of alcohol-seeking behaviour with the involvement of the mesocorticolimbic pathway, a key region in the reward effects of drug, moreover showing a decrease of the context-induced alcohol relapse. These results open up the possibility of using GAL(1-15) as a novel strategy in AUD.

2. The combination of GAL(1-15) and the antidepressant escitalopram in the comorbidity of alcoholism and depression.

In this section, we used two operant self-administration models, alcohol and saccharin. In both tests, the combination of GAL(1-15) and ESC induced a substantial reduction in the number of reinforcements, suggesting that GAL(1-15) + ESC caused a loss of motivational behaviour induced by an artificial reinforcer. This effect in the loss of motivational behaviour is powerful since it is induced with the coadministration of threshold doses of GAL(1-15) and ESC (Millón et al., 2019a; García-Durán et al., 2021). Not only in the operant models but also in the non-operant model using the natural reinforcer sucrose (SPT) (Der-Avakian and Marcou, 2012), the combination of GAL(1-15) and ESC induced a significant reduction in sucrose preference and sucrose intake, confirming a substantial effect for this cotreatment in the reward system.

The fact that the GAL(1–15) and ESC combination can modulate the reward system with both natural and artificial reinforcers such as alcohol, in addition to improving depressive symptoms in an animal model of depression such as OBX rats (García-Durán et al., 2021) opens up the possibility to use this combination as augmentation therapy in the depression and AUD comorbidity.

The role of neurotransmitter 5-HT as a modulator of reward function is widely described in the literature. Serotonin reduces the reinforcing properties of food, saccharin, alcohol, psychostimulants, and direct electrical brain stimulation (Maurel et al., 1999; Browne et al., 2019; McDevitt et al., 2021). Treatment with SSRIs or the 5-HT releaser dexfenfluramine consistently decreases instrumental responding for primary reinforcers such as food, drugs of abuse (Richardson and Roberts, 1991) and brain stimulation reward (McClelland et al., 1989; Lee et al., 1998). Moreover, both in SERT-KO mice and after acute administration of citalopram, the primary reinforcer saccharine is reduced (Browne and Fletcher 2016; Browne et al., 2019). Recent optogenetic studies also found that combining stimulation of DRN 5-HT neurons with a low dose of the SSRI citalopram reduced the operant responding by saccharine (Browne et al., 2019).

The mechanism involved in the 5-HT effect in the reward system affects the DA system. The serotonergic neurons from DR innervate the VTA and inhibit mesolimbic DA activity (Browne et al., 2019). Additionally, in the NAc, the MSNs neurons synapse onto DR 5-HT neurons, directly influencing reward processes (Hu et al., 2016). Several studies showed that SSRIs, including ESC, reduced DA neuronal activity in the VTA and DA release in the striatum (Clark et al., 1996; Dremencov et al., 2009; Hamati et al., 2020).

The reduction of DA neuronal activity is probably related to a serotonergic-dopaminergic interaction in the mesolimbic system via 5-HT_{2C} receptors (Dremencov et al., 2009; Visser et al., 2015). Our results are in agreement with these works since ESC reduced the reward capacity in the operant and non-operant models, confirming that 5-HT decreases the reward function.

The coadministration of GAL(1–15) + ESC significantly decreased the number of C-Fos-IR TH cell bodies in the VTA, and PCA analysis suggested that one functional network, including VTA, RMTg and DR, was involved in these effects on alcohol self-administration. Moreover, the analysis of the relevance of the different brain networks in the alcohol self-administration test indicated that rats that exhibited an increase in C-Fos IR in the VTA/RMTg circuitry were more prone to press the active lever in the alcohol self-administration test, confirming the importance of VTA in the GAL(1–15) + ESC-mediated effect.

It is of high interest that the effect of GAL(1–15) and ESC coadministration was found in the FST, a depression behavioural test related with despair, in the animals with alcohol intake by self-administration. Our results indicated that ESC administration alone induced an increase in immobility and a decrease in swimming, suggesting a worsening of depressive symptoms. However, the coadministration of ESC with GAL(1–15) reversed the adverse effects induced by ESC alone in the FST.

ESC effects in naive rats show a variability of response: no effect (Reed et al., 2008), or a decrease (Jastrzebska-Wiesek et al., 2008) of immobility in the FST. Interestingly, chronic ethanol intake alters 5HT1A receptor density and/or expression in the brain (Nevo and Hamon, 1995; Chen Lawrence, 2000; Pinto et al., 2002) showing an increase in the density and expression of somatodendritic 5HT1A autoreceptor (Nevo and Hamon, 1995) and a 5HT1A autoreceptor supersensitivity (Kelai et al., 2008) in the DR.

This increase in the density and functional sensitivity of the 5HT1A autoreceptor could explain the pro-depressive effects of ESC in the FST; ESC through the SERT lock raises the central tone of 5-HT, which increases the activation-hypersensitive autoreceptors induced by the alcohol and produces a decrease in the 5-HT released.

The interaction between GAL(1–15) and the 5-HT1A receptor has been described both at the functional level and at the receptor level in recent years (Millón et al., 2016, 2017; Flores-Burgess et al., 2017, 2019, 2021). The existence of a 5HT1A-GALR1-GALR2 receptor mosaic would explain these results (Fuxe et al., 2008, 2012; Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al., 2016). We have described the GAL(1–15) ability to modulate the 5-HT1A receptor characteristics and expression level (Millón et al., 2016). Thus, in the DR, GAL(1–15) reduced the density of 5-HT1A autoreceptor and its mRNA levels, suggesting an enhancement in the firing rate of the ascending 5-HT DR neurons (Millón et al., 2016). This mechanism could underlie the enhancement of ESC by GAL(1–15) in the FST in the present work. GAL(1–15) could modulate the alcohol-induced increase in density and functional sensitivity at somatodendritic 5-HT1A receptors in DR, thus avoiding the depressive adverse effects shown by ESC in alcohol-consuming rats.

In conclusion, our results indicate a potent effect of the combination GAL(1–15) with ESC in reducing the reward-seeking motivated by alcohol with a significant reduction of depressive adverse effects in rats. The results open up the possibility to use GAL(1–15) in combination with the SSRI Escitalopram as a novel strategy in AUD comorbidity with depression.

CONCLUSIONS

- I. Intracerebroventricular administration of GAL(1-15) induces a reduction in alcohol consumption and alcohol seeking-behavior in a self-administration model. Full molecule GAL lacks effect in this test.
- II. The reduction in alcohol consumption and alcohol seeking-behavior produced by GAL(1-15) administration is blocked by the GALR2 receptor antagonist, M871. In addition, the reduction of GALR1 and GALR2 receptor expression prevents the effect of GAL(1-15) in this test, indicating an involvement of both receptors.
- III. The nuclei of the brain reward system such as the ventral tegmental area, nucleus accumbens, and prefrontal cortex are involved in the effect produced by GAL(1-15) in the alcohol self-administration test.
- IV. The effect induced by administering GAL(1-15) also modulates dopaminergic receptors such as D1 in the prefrontal cortex and D3 in the ventral tegmental area, in animals with chronic alcohol consumption by self-administration.
- V. GAL(1-15) administration induces a decrease in alcohol motivation, showing a breaking point reduction, in a progressive ratio program.
- VI. GAL(1-15) administration induces a decrease in context-induced alcohol relapse.
- VII. The intranasal route of administration replicates the effects produced by intracerebroventricular administration of GAL(1-15) in the alcohol self-administration test.
- VIII. All these results demonstrate that GAL(1-15) has a specific role in drinking and seeking, as well as in alcohol relapse, suggesting that GAL(1-15) administration could be a possible therapeutic target for alcohol use disorder.

- IX.** The administration of GAL(1-15) potentiates the reduction of the reward capacity of the antidepressant escitalopram (ESC) over different reinforcers such as sucrose or saccharin.
- X.** GAL(1-15) potentiates the effect of ESC in the alcohol self-administration test.
- XI.** In animals with chronic alcohol consumption, GAL(1-15) reversed ESC-mediated adverse effects on FST, improving depressive symptoms in a model of alcoholism-depression comorbidity.
- XII.** Coadministration of GAL(1-15)+ESC significantly decreased dopaminergic cell activation in the VTA, as observed by C-Fos expression. In addition, Principal Component Analysis suggested that there is a functional network involving the VTA, RMTg, and DR nuclei.
- XIII.** The combination of GAL(1-15) and ESC reduces alcohol-seeking motivation in addition to reversing the effect produced by single ESC administration on FST, suggesting that the GAL(1-15)+ESC combination could be used as a therapeutic strategy for alcoholism-depression comorbidity.

Bibliografía



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abelaira, H. M., Réus, G. Z., Quevedo, J., 2013. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Braz J Psychiatry* 35 Suppl 2, S112-120.

Agabio, R., Sinclair, J. M., Addolorato, G., Aubin, H. J., Beraha, E. M., Caputo, F., Chick, J. D., de La Selle, P., Franchitto, N., Garbutt, J. C., Haber, P. S., Heydtmann, M., Jaury, P., Lingford-Hughes, A. R., Morley, K. C., Müller, C. A., Owens, L., Pastor, A., Paterson, L. M., ..., Leggio, L., 2018. Baclofen for the treatment of alcohol use disorder: the Cagliari Statement. *Lancet Psychiatry* 5, 957-960.

Akhtar, S., Benter, I. F., 2007. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 117, 3623-3632.

Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Legastelois, R., Botia, B., Pierrefiche, O., Vilpoux, C., Naassila, M., 2013. Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 67, 521-531.

Albert, P. R., Vahid-Ansari, F., 2019. The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. *Biochimie* 161, 34-45.

Alén, F., Santos, A., Moreno-Sanz, G., González-Cuevas, G., Giné, E., Franco-Ruiz, L., Navarro, M., López-Moreno, J. A., 2009. Cannabinoid-induced increase in relapse-like drinking is prevented by the blockade of the glycine-binding site of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 158, 465-473.

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Vol. 5. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2014.

Anderson, J., Mitchell, P. B., Brodaty, H., 2017. Suicidality: prevention, detection and intervention. *Aust Prescr* 40, 162-166.

Artigas, F., 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 137, 119-131.

Ash, B. L., Quach, T., Williams, S. J., Lawrence, A. J., Djouma, E., 2014. Galanin-3 receptor antagonism by SNAP 37889 reduces motivation to self-administer alcohol and attenuates cue-induced reinstatement of alcohol-seeking in iP rats. *J Pharmacol Sci* 125, 211-216.

Ash, B. L., Zanatta, S. D., Williams, S. J., Lawrence, A. J., Djouma, E., 2011. The galanin-3 receptor antagonist, SNAP 37889, reduces operant responding for ethanol in alcohol-preferring rats. *Regul Pept* 166, 59-67.

Bachteler, D., Economidou, D., Danysz, W., Ciccocioppo, R., Spanagel, R., 2005. The effects of acamprosate and neramexane on cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior in rat. *Neuropsychopharmacology* 30, 1104-1110.

Bahi, A., 2024. Serotonin transporter knockdown relieves depression-like behavior and ethanol-induced CPP in mice after chronic social defeat stress. *Behav Brain Res* 466, 114998.

Bariselli, S., Glangetas, C., Tzanoulinou, S., Bellone, C., 2016. Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *J Neurochem* 139, 1071-1080.

Barnes, N. M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.

Bartfai, T., Fisone, G., Langel, U., 1992. Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 13, 312-317.

Bartfai, T., Lu, X., Badie-Mahdavi, H., Barr, A. M., Mazarati, A., Hua, X. Y., Yaksh, T., Haberhauer, G., Ceide, S. C., Trembleau, L., Somogyi, L., Kröck, L., Rebek, J., 2004. Galmic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain, and forced-swim tests. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10470-10475.

Becker, A., Ehret, A. M., Kirsch, P., 2017. From the neurobiological basis of comorbid alcohol dependence and depression to psychological treatment strategies: study protocol of a randomized controlled trial. *BMC Psychiatry* 17, 153.

Bedecs, K., Berthold, M., Bartfai, T., 1995. Galanin--10 years with a neuroendocrine peptide. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 337-349.

Bellido, I., Díaz-Cabiale, Z., Jiménez-Vasquez, P. A., Andbjør, B., Mathé, A. A., Fuxe, K., 2002. Increased density of galanin binding sites in the dorsal raphe in a genetic rat model of depression. *Neurosci Lett* 317, 101-105.

Bing, O., Möller, C., Engel, J. A., Söderpalm, B., Heilig, M., 1993. Anxiolytic-like action of centrally administered galanin. *Neurosci Lett* 164, 17-20.

Boden, J. M., Fergusson, D. M., 2011. Alcohol and depression. *Addiction* 106, 906-914.

Bogdanova, O. V., Kanekar, S., D'Anci, K. E., Renshaw, P. F., 2013. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 118, 227-239.

Borroto-Escuela, D. O., Narvaez, M., Di Palma, M., Calvo, F., Rodriguez, D., Millon, C., Carlsson, J., Agnati, L. F., Garriga, P., Díaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., 2014. Preferential activation by galanin 1-15 fragment of the GalR1 protomer of a GalR1-GalR2 heteroreceptor complex. *Biochem Biophys Res Commun* 452, 347-353.

Borroto-Escuela, D. O., Narváez, M., Ambrogini, P., Ferraro, L., Brito, I., Romero-Fernandez, W., Andrade-Talavera, Y., Flores-Burgess, A., Millon, C., Gago, B., Narvaez, J. A., Odagaki, Y., Palkovits, M., Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., 2018. Receptor-Receptor Interactions in Multiple 5-HT_{1A} Heteroreceptor Complexes in Raphe-Hippocampal 5-HT Transmission and Their Relevance for Depression and Its Treatment. *Molecules* 23.

Borruto, A. M., Stopponi, S., Li, H., Weiss, F., Roberto, M., Ciccocioppo, R., 2021. Genetically selected alcohol-preferring msP rats to study alcohol use disorder: Anything lost in translation? *Neuropharmacology* 186, 108446.

Bouton, M. E., 2002. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry* 52, 976-986.

Boyce-Rustay, J. M., Wiedholz, L. M., Millstein, R. A., Carroll, J., Murphy, D. L., Daws, L. C., Holmes, A., 2006. Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res* 30, 1957-1965.

Brady, K. T., Sonne, S. C., 1999. The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse. *Alcohol Res Health* 23, 263-271.

Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., Walker, M. W., 2000. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21, 109-117.

Breese, G. R., Baumeister, A. A., McCown, T. J., Emerick, S. G., Frye, G. D., Crotty, K., Mueller, R. A., 1984. Behavioral differences between neonatal and adult 6-hydroxydopamine-treated rats to dopamine agonists: relevance to neurological symptoms in clinical syndromes with reduced brain dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 231, 343-354.

Browne, C. J., Abela, A. R., Chu, D., Li, Z., Ji, X., Lambe, E. K., Fletcher, P. J., 2019. Dorsal raphe serotonin neurons inhibit operant responding for reward via inputs to the ventral tegmental area but not the nucleus accumbens: evidence from studies combining optogenetic stimulation and serotonin reuptake inhibition. *Neuropsychopharmacology* 44, 793-804.

Browne, C. J., Fletcher, P. J., 2016. Decreased Incentive Motivation Following Knockout or Acute Blockade of the Serotonin Transporter: Role of the 5-HT_{2C} Receptor. *Neuropsychopharmacology* 41, 2566-2576.

Burgevin, M. C., Loquet, I., Quarteronet, D., Habert-Ortoli, E., 1995. Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *J Mol Neurosci* 6, 33-41.

Burnette, E. M., Nieto, S. J., Grodin, E. N., Meredith, L. R., Hurley, B., Miotto, K., Gillis, A. J., Ray, L. A., 2022. Novel Agents for the Pharmacological Treatment of Alcohol Use Disorder. *Drugs* 82, 251-274.

Calleja-Conde, J., Echeverry-Alzate, V., Bühler, K. M., Morales-García, J., Segovia-Rodríguez, L., Durán-González, P., Olmos, P., de Fonseca, F. R., Giné, E., López-Moreno, J. A., 2023. Dissecting operant alcohol self-administration using saccharin-fading procedure. *Neuropsychopharmacol Rep* 43, 12-22

Carlson, Neil R, and Melissa A Birkett. *Fisiología de la conducta*. Pearson: Madrid, 2013.

Chappell, A. M., Carter, E., McCool, B. A., Weiner, J. L., 2013. Adolescent rearing conditions influence the relationship between initial anxiety-like behavior and ethanol drinking in male Long Evans rats. *Alcohol Clin Exp Res* 37 Suppl 1, E394-403.

Charles, N. E., Strong, S. J., Burns, L. C., Bullerjahn, M. R., Serafine, K. M., 2021. Increased mood disorder symptoms, perceived stress, and alcohol use among college students during the COVID-19 pandemic. *Psychiatry Res* 296, 113706.

Chau, B. K. H., Jarvis, H., Law, C. K., Chong, T. T., 2018. Dopamine and reward: a view from the prefrontal cortex. *Behav Pharmacol* 29, 569-583.

Chen, F., Lawrence, A. J., 2000. 5-HT transporter sites and 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptors in Fawn-Hooded rats: a quantitative autoradiography study. *Alcohol Clin Exp Res* 24, 1093-1102.

Chermat, R., Thierry, B., Mico, J. A., Steru, L., Simon, P., 1986. Adaptation of the tail suspension test to the rat. *J Pharmacol* 17, 348-350.

Ciccocioppo, R., Economidou, D., Cippitelli, A., Cucculelli, M., Ubaldi, M., Soverchia, L., Lourdusamy, A., Massi, M., 2006. Genetically selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats: an animal model to study the neurobiology of alcoholism. *Addict Biol* 11, 339-355.

Ciccocioppo, R., Gehlert, D. R., Ryabinin, A., Kaur, S., Cippitelli, A., Thorsell, A., Lê, A. D., Hipskind, P. A., Hamdouchi, C., Lu, J., Hembre, E. J., Cramer, J., Song, M., McKinzie, D., Morin, M., Economidou, D., Stopponi, S., Cannella, N., Braconi, S., ..., Heilig, M., 2009. Stress-related neuropeptides and alcoholism: CRH, NPY, and beyond. *Alcohol* 43, 491-498.

- Ciccocioppo, R., Panocka, I., Polidori, C., Frolidi, R., Angeletti, S., Massi, M., 1998. Mechanism of action for reduction of ethanol intake in rats by the tachykinin NK-3 receptor agonist aminosenktide. *Pharmacol Biochem Behav* 61, 459-464.
- Cipriani, A., Santilli, C., Furukawa, T. A., Signoretti, A., Nakagawa, A., McGuire, H., Churchill, R., Barbui, C., 2009. Escitalopram versus other antidepressive agents for depression. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006532.
- Clark, R. N., Ashby, C. R., Dewey, S. L., Ramachandran, P. V., Strecker, R. E., 1996. Effect of acute and chronic fluoxetine on extracellular dopamine levels in the caudate-putamen and nucleus accumbens of rat. *Synapse* 23, 125-131.
- Clay, J. M., Parker, M. O., 2020. Alcohol use and misuse during the COVID-19 pandemic: a potential public health crisis? *Lancet Public Health* 5, e259.
- Colombo, G., Lobina, C., Carai, M. A., Gessa, G. L., 2006. Phenotypic characterization of genetically selected Sardinian alcohol-preferring (sP) and -non-preferring (sNP) rats. *Addict Biol* 11, 324-338.
- Cooper, S., Robison, A. J., Mazei-Robison, M. S., 2017. Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics* 14, 687-697.
- Costantino, H. R., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P. H., Quay, S. C., 2007. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm* 337, 1-24.
- Crombag, H. S., Bossert, J. M., Koya, E., Shaham, Y., 2008. Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3233-3243.
- Cruz, F. C., Javier Rubio, F., Hope, B. T., 2015. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Res* 1628, 157-173.
- Czachowski, C. L., Samson, H. H., 1999. Breakpoint determination and ethanol self-administration using an across-session progressive ratio procedure in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 23, 1580-1586.

Dahlström, A., Fuxe, K., 1966. Monoamines and the pituitary gland. *Acta Endocrinol (Copenh)* 51, 301-314.

Dean, J., Keshavan, M., 2017. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr* 27, 101-111.

Der-Avakian, A., Markou, A., 2012. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci* 35, 68-77.

Detke, M. J., Lucki, I., 1996. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res* 73, 43-46.

Diaz, J., Pilon, C., Le Foll, B., Gros, C., Triller, A., Schwartz, J. C., Sokoloff, P., 2000. Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 20, 8677-8684.

Ding, Y. D., Chen, X., Chen, Z. B., Li, L., Li, X. Y., Castellanos, F. X., Bai, T. J., Bo, Q. J., Cao, J., Chang, Z. K., Chen, G. M., Chen, N. X., Chen, W., Cheng, C., Cheng, Y. Q., Cui, X. L., Duan, J., Fang, Y. R., Gong, Q. Y., ..., Guo, W. B., 2022. Reduced nucleus accumbens functional connectivity in reward network and default mode network in patients with recurrent major depressive disorder. *Transl Psychiatry* 12, 236.

Domi, E., Domi, A., Adermark, L., Heilig, M., Augier, E., 2021. Neurobiology of alcohol seeking behavior. *J Neurochem* 157, 1585-1614.

Dremencov, E., El Mansari, M., Blier, P., 2009. Effects of sustained serotonin reuptake inhibition on the firing of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area. *J Psychiatry Neurosci* 34, 223-229.

Durazzo, T. C., Meyerhoff, D. J., Yoder, K. K., 2018. Cigarette smoking is associated with cortical thinning in anterior frontal regions, insula and regions showing atrophy in early Alzheimer's Disease. *Drug Alcohol Depend* 192, 277-284.

Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J. A., Yanaihara, N., González-Barón, S., Fuxe, K., 2000. Galanin/alpha2-receptor interactions in central cardiovascular control. *Neuropharmacology* 39, 1377-1385.

Díaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Narváez, M., Millón, C., Puigcerver, A., Fuxe, K., Narváez, J. A., 2010. The Galanin N-terminal fragment (1-15) interacts with neuropeptide Y in central cardiovascular control: Involvement of the NPY Y2 receptor subtype. *Regul Pept* 163, 130-136.

Díaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Vela, C., Razani, H., Coveñas, R., Fuxe, K., Narváez, J. A., 2005. Role of galanin and galanin(1-15) on central cardiovascular control. *Neuropeptides* 39, 185-190.

Edinoff, A. N., Akuly, H. A., Hanna, T. A., Ochoa, C. O., Patti, S. J., Ghaffar, Y. A., Kaye, A. D., Viswanath, O., Urits, I., Boyer, A. G., Cornett, E. M., Kaye, A. M., 2021. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. *Neurol Int* 13, 387-401.

Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España, EDADES. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Informe 2022. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. 2022.

Encuesta sobre uso de drogas en Enseñanzas Secundarias en España, ESTUDES. Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Informe 2022. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. 2022.

Ettenberg, A., 2009. The runway model of drug self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 91, 271-277.

Eşel, E., Dinç, K., 2017. [Neurobiology of Alcohol Dependence and Implications on Treatment]. *Turk Psikiyatri Derg* 28, 51-60.

Faris, L. H., Gabarrell-Pascuet, A., Felez-Nobrega, M., Cristóbal-Narváez, P., Mortier, P., Vilagut, G., Olaya, B., Alonso, J., Haro, J. M., López-Carrilero, R., Domènech-Abella, J., 2023. The Association Between Substance Use Disorder and Depression During the COVID-19 Lockdown in Spain and the Moderating Role of Social Support: a Cross-Sectional Study. *Int J Ment Health Addict* 21, 1157-1167.

Fava, M., 2001. Augmentation and combination strategies in treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 18, 4-11.

Flores-Burgess, A., Millón, C., Gago, B., J. A., Fuxe., Díaz-Cabiale, Z., 2018. Small Interference RNA Knockdown Rats in Behavioral Functions: GALR1/GALR2 Heteroreceptor in Anxiety and Depression-Like Behavior.

Flores-Burgess, A., Millón, C., Gago, B., García-Durán, L., Cantero-García, N., Coveñas, R., Narváez, J. A., Fuxe, K., Santín, L., Díaz-Cabiale, Z., 2019. Galanin (1-15)-fluoxetine interaction in the novel object recognition test. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the prefrontal cortex of the rats. *Neuropharmacology* 155, 104-112.

Flores-Burgess, A., Millón, C., Gago, B., García-Durán, L., Cantero-García, N., Puigcerver, A., Narváez, J. A., Fuxe, K., Santín, L., Díaz-Cabiale, Z., 2022. Galanin (1-15) Enhances the Behavioral Effects of Fluoxetine in the Olfactory Bulbectomy Rat, Suggesting a New Augmentation Strategy in Depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 25, 307-318.

Flores-Burgess, A., Millón, C., Gago, B., Narváez, M., Borroto-Escuela, D. O., Mengod, G., Narváez, J. A., Fuxe, K., Santín, L., Díaz-Cabiale, Z., 2017. Galanin (1-15) enhancement of the behavioral effects of Fluoxetine in the forced swimming test gives a new therapeutic strategy against depression. *Neuropharmacology* 118, 233-241.

Fredriksson, I., Venniro, M., Reiner, D. J., Chow, J. J., Bossert, J. M., Shaham, Y., 2021. Animal Models of Drug Relapse and Craving after Voluntary Abstinence: A Review. *Pharmacol Rev* 73, 1050-1083.

Fu, R., Mei, Q., Zuo, W., Li, J., Gregor, D., Bekker, A., Ye, J., 2017. Low-dose ethanol excites lateral habenula neurons projecting to VTA, RMTg, and raphe. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 9, 217-230.

Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A. O., Calvo, F., Garriga, P., Tena, M., Narvaez, M., Millón, C., Parrado, C., Ciruela, F., Agnati, L. F., Narvaez, J. A., Díaz-Cabiale, Z., 2012. On the existence and function of galanin receptor heteromers in the central nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 127.

Fuxe, K., Marcellino, D., Guidolin, D., Woods, A. S., Agnati, L. F., 2008. Heterodimers and receptor mosaics of different types of G-protein-coupled receptors. *Physiology (Bethesda)* 23, 322-332.

Fuxe, K., Ogren, S. O., Jansson, A., Cintra, A., Härfstrand, A., Agnati, L. F., 1988. Intraventricular injections of galanin reduces 5-HT metabolism in the ventral limbic cortex, the hippocampal formation and the fronto-parietal cortex of the male rat. *Acta Physiol Scand* 133, 579-581.

García Pardo, M. P., Roger Sánchez, C., De la Rubia Ortí, J. E., Aguilar Calpe, M. A., 2017. Animal models of drug addiction. *Adicciones* 29, 278-292.

García-Durán, L., Flores-Burgess, A., Cantero-García, N., Puigcerver, A., Narváez, J., Fuxe, K., Santín, L., Millón, C., Díaz-Cabiale, Z., 2021. Galanin(1-15) Potentiates the Antidepressant-like Effects Induced by Escitalopram in a Rat Model of Depression. *Int J Mol Sci* 22.

García-Pérez, D., Núñez, C., Laorden, M. L., Milanés, M. V., 2016. Regulation of dopaminergic markers expression in response to acute and chronic morphine and to morphine withdrawal. *Addict Biol* 21, 374-386.

Gardner, E. L., 2011. Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med* 30, 22-60.

Genders, S. G., Scheller, K. J., Djouma, E., 2020. Neuropeptide modulation of addiction: Focus on galanin. *Neurosci Biobehav Rev* 110, 133-149.

Gilpin, N. W., Koob, G. F., 2008. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Res Health* 31, 185-195.

Gonzales, R. A., Job, M. O., Doyon, W. M., 2004. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther* 103, 121-146.

Grant, B. F., Goldstein, R. B., Saha, T. D., Chou, S. P., Jung, J., Zhang, H., Pickering, R. P., Ruan, W. J., Smith, S. M., Huang, B., Hasin, D. S., 2015. Epidemiology of DSM-5 Alcohol Use Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III. *JAMA Psychiatry* 72, 757-766.

GWC, P., 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.

Gómez-Coronado, N., Walker, A. J., Berk, M., Dodd, S., 2018. Current and Emerging Pharmacotherapies for Cessation of Tobacco Smoking. *Pharmacotherapy* 38, 235-258.

Habert-Ortoli, E., Amiranoff, B., Loquet, I., Laburthe, M., Mayaux, J. F., 1994. Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9780-9783.

Halladay, L. R., Kocharian, A., Piantadosi, P. T., Authement, M. E., Lieberman, A. G., Spitz, N. A., Coden, K., Glover, L. R., Costa, V. D., Alvarez, V. A., Holmes, A., 2020. Prefrontal Regulation of Punished Ethanol Self-administration. *Biol Psychiatry* 87, 967-978.

Hamati, R., El Mansari, M., Blier, P., 2020. Serotonin-2B receptor antagonism increases the activity of dopamine and glutamate neurons in the presence of selective serotonin reuptake inhibition. *Neuropsychopharmacology* 45, 2098-2105.

Han, C., Wang, S. M., Kato, M., Lee, S. J., Patkar, A. A., Masand, P. S., Pae, C. U., 2013. Second-generation antipsychotics in the treatment of major depressive disorder: current evidence. *Expert Rev Neurother* 13, 851-870.

Heberlein, A., Muschler, M., Frieling, H., Lenz, B., Wilhelm, J., Gröschl, M., Kornhuber, J., Bleich, S., Hillemacher, T., 2011. Decreased galanin serum levels are associated with alcohol-craving during withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 568-572.

Hedlund, L., Wahlström, G., 1998. Citalopram as an inhibitor of voluntary ethanol intake in the male rat. *Alcohol* 16, 295-303.

Hedlund, P. B., Yanaihara, N., Fuxe, K., 1992. Evidence for specific N-terminal galanin fragment binding sites in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 224, 203-205.

Heilig, M., 2023. Stress-related neuropeptide systems as targets for treatment of alcohol addiction: A clinical perspective. *J Intern Med* 293, 559-573.

Herbst, L. S., Gaigher, T., Siqueira, A. A., Joca, S. R. L., Sampaio, K. N., Beijamini, V., 2019. New evidence for refinement of anesthetic choice in procedures preceding the forced swimming test and the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 368, 111897.

Hinojosa, F. R., Spricigo, L., Izídio, G. S., Brüske, G. R., Lopes, D. M., Ramos, A., 2006. Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. *Behav Brain Res* 168, 127-136.

Ho, A. M., Qiu, Y., Jia, Y. F., Aguiar, F. S., Hinton, D. J., Karpyak, V. M., Weinshilboum, R. M., Choi, D. S., 2016. Combined Effects of Acamprosate and Escitalopram on Ethanol Consumption in Mice. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 1531-1539.

Hu, H., 2016. Reward and Aversion. *Annu Rev Neurosci* 39, 297-324.

Hu, H., Cui, Y., Yang, Y., 2020. Circuits and functions of the lateral habenula in health and in disease. *Nat Rev Neurosci* 21, 277-295.

Hunt, W. A., Barnett, L. W., Branch, L. G., 1971. Relapse rates in addiction programs. *J Clin Psychol* 27, 455-456.

Höflich, A., Michenthaler, P., Kasper, S., Lanzenberger, R., 2019. Circuit Mechanisms of Reward, Anhedonia, and Depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 22, 105-118.

Ihnatko, R., Theodorsson, E., 2017. Short N-terminal galanin fragments are occurring naturally in vivo. *Neuropeptides* 63, 1-13.

Ionescu, I. A., Dine, J., Yen, Y. C., Buell, D. R., Herrmann, L., Holsboer, F., Eder, M., Landgraf, R., Schmidt, U., 2012. Intranasally administered neuropeptide S (NPS) exerts anxiolytic effects following internalization into NPS receptor-expressing neurons. *Neuropsychopharmacology* 37, 1323-1337.

Iwanicka, K. A., Olajosy, M., 2015. [The concept of alcohol craving]. *Psychiatr Pol* 49, 295-304.

J.S, R., 2014. Co-occurring psychiatric disorders and alcoholism. In: Martin, P. R., (Ed), *Clin. Neurol*, pp. 573-588.

Jacobowitz, D. M., Kresse, A., Skofitsch, G., 2004. Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography--a historical review. *Peptides* 25, 433-464.

Janak, P. H., Chaudhri, N., 2010. The Potent Effect of Environmental Context on Relapse to Alcohol-Seeking After Extinction. *Open Addict J* 3, 76-87.

Jastrzębska-Więsek, M., Partyka, A., Rychtyk, J., Śniecikowska, J., Kołaczowski, M., Wesołowska, A., Varney, M. A., Newman-Tancredi, A., 2018. Activity of Serotonin 5-HT. *ACS Chem Neurosci* 9, 1040-1050.

Johnson, B. A., 2004. Role of the serotonergic system in the neurobiology of alcoholism: implications for treatment. *CNS Drugs* 18, 1105-1118.

Kadam, M., Sinha, A., Nimkar, S., Matcheswalla, Y., De Sousa, A., 2017. A Comparative Study of Factors Associated with Relapse in Alcohol Dependence and Opioid Dependence. *Indian J Psychol Med* 39, 627-633.

- Kalivas, P. W., Volkow, N. D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162, 1403-1413.
- Kaminska, K., Rogoz, Z., 2016. The antidepressant- and anxiolytic-like effects following co-treatment with escitalopram and risperidone in rats. *J Physiol Pharmacol* 67, 471-480.
- Kapur, J., 2011. Galanin receptors modulate seizures. *Epilepsy Curr* 11, 125-127.
- Karatayev, O., Baylan, J., Weed, V., Chang, S., Wynick, D., Leibowitz, S. F., 2010. Galanin knockout mice show disturbances in ethanol consumption and expression of hypothalamic peptides that stimulate ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 34, 72-80.
- Kehr, J., Yoshitake, T., Wang, F. H., Razani, H., Gimenez-Llort, L., Jansson, A., Yamaguchi, M., Ogren, S. O., 2002. Galanin is a potent in vivo modulator of mesencephalic serotonergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology* 27, 341-356.
- Kelai, S., Aïssi, F., Lesch, K. P., Cohen-Salmon, C., Hamon, M., Lanfumey, L., 2003. Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol* 38, 386-389.
- Kelai, S., Renoir, T., Chouchana, L., Saurini, F., Hanoun, N., Hamon, M., Lanfumey, L., 2008. Chronic voluntary ethanol intake hypersensitizes 5-HT(1A) autoreceptors in C57BL/6J mice. *J Neurochem* 107, 1660-1670.
- Kessler, R. C., Nelson, C. B., McGonagle, K. A., Liu, J., Swartz, M., Blazer, D. G., 1996. Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: results from the US National Comorbidity Survey. *Br J Psychiatry Suppl*, 17-30.
- Khantzian, E. J., 1985. The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence. *Am J Psychiatry* 142, 1259-1264.

- Kilian, C., O'Donnell, A., Potapova, N., López-Pelayo, H., Schulte, B., Miquel, L., Paniello Castillo, B., Schmidt, C. S., Gual, A., Rehm, J., Manthey, J., 2022. Changes in alcohol use during the COVID-19 pandemic in Europe: A meta-analysis of observational studies. *Drug Alcohol Rev* 41, 918-931.
- Kole, R., Krainer, A. R., Altman, S., 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 11, 125-140.
- Koob, G. F., 1992. Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654, 171-191.
- Koob, G. F., 2013. Addiction is a Reward Deficit and Stress Surfeit Disorder. *Front Psychiatry* 4, 72.
- Koob, G. F., Le Moal, M., 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24, 97-129.
- Koob, G. F., Volkow, N. D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217-238.
- Koob, G. F., Volkow, N. D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3, 760-773.
- Kramer, J., Dick, D. M., King, A., Ray, L. A., Sher, K. J., Vena, A., Vendruscolo, L. F., Acion, L., 2020. Mechanisms of Alcohol Addiction: Bridging Human and Animal Studies. *Alcohol Alcohol* 55, 603-607.
- Kranzler, H. R., Soyka, M., 2018. Diagnosis and Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorder: A Review. *JAMA* 320, 815-824.
- Kuteeva, E., Calza, L., Holmberg, K., Theodorsson, E., Ogren, S. O., Hökfelt, T., 2005. Distribution of galanin in the brain of a galanin-overexpressing transgenic mouse. *Neuropeptides* 39, 293-298.
- Kuteeva, E., Hökfelt, T., Wardi, T., Ogren, S. O., 2008. Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cell Mol Life Sci* 65, 1854-1863.

- Kuteeva, E., Wardi, T., Hökfelt, T., Ogren, S. O., 2007. Galanin enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 64-69.
- Lang, R., Gundlach, A. L., Kofler, B., 2007. The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease. *Pharmacol Ther* 115, 177-207.
- Lauretani, F., Giallauria, F., Testa, C., Zinni, C., Lorenzi, B., Zucchini, I., Salvi, M., Napoli, R., Maggio, M. G., 2024. Dopamine Pharmacodynamics: New Insights. *Int J Mol Sci* 25.
- Lavezzi, H. N., Zahm, D. S., 2011. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia* 1, 191-200.
- Le Foll, B., Goldberg, S. R., Sokoloff, P., 2005. The dopamine D3 receptor and drug dependence: effects on reward or beyond? *Neuropharmacology* 49, 525-541.
- Lebourgeois, S., González-Marín, M. C., Jeanblanc, J., Naassila, M., Vilpoux, C., 2018. Effect of N-acetylcysteine on motivation, seeking and relapse to ethanol self-administration. *Addict Biol* 23, 643-652.
- Lee, K., Kornetsky, C., 1998. Acute and chronic fluoxetine treatment decreases the sensitivity of rats to rewarding brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 60, 539-544.
- Leggio, G. M., Salomone, S., Bucolo, C., Platania, C., Micale, V., Caraci, F., Drago, F., 2013. Dopamine D(3) receptor as a new pharmacological target for the treatment of depression. *Eur J Pharmacol* 719, 25-33.
- Leibowitz, S. F., Avena, N. M., Chang, G. Q., Karatayev, O., Chau, D. T., Hoebel, B. G., 2003. Ethanol intake increases galanin mRNA in the hypothalamus and withdrawal decreases it. *Physiol Behav* 79, 103-111.
- Lewis, M. J., Johnson, D. F., Waldman, D., Leibowitz, S. F., Hoebel, B. G., 2004. Galanin microinjection in the third ventricle increases voluntary ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 28, 1822-1828.

Lewis, M. J., Rada, P., Johnson, D. F., Avena, N. M., Leibowitz, S. F., Hoebel, B. G., 2005. Galanin and alcohol dependence: neurobehavioral research. *Neuropeptides* 39, 317-321.

Lewis, R. G., Florio, E., Punzo, D., Borrelli, E., 2021. The Brain's Reward System in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol* 1344, 57-69.

Lu, X., Barr, A. M., Kinney, J. W., Sanna, P., Conti, B., Behrens, M. M., Bartfai, T., 2005. A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 874-879.

Marcinkiewicz, C. A., Lowery-Gionta, E. G., Kash, T. L., 2016. Serotonin's Complex Role in Alcoholism: Implications for Treatment and Future Research. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 1192-1201.

Marco, E. M., Ballesta, J. A., Irala, C., Hernández, M. D., Serrano, M. E., Mela, V., López-Gallardo, M., Viveros, M. P., 2017. Sex-dependent influence of chronic mild stress (CMS) on voluntary alcohol consumption; study of neurobiological consequences. *Pharmacol Biochem Behav* 152, 68-80.

Marcos, P., Díaz-Cabiale, Z., Cordon, M. P., Coveñas, R., Yanaihara, N., Fuxe, K., González-Barón, S., Narváez, J. A., 2001. Central galanin and N-terminal galanin fragment induce c-Fos immunoreactivity in the medulla oblongata of the anesthetized rat. *Peptides* 22, 1501-1509.

Markou, A., Kosten, T. R., Koob, G. F., 1998. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18, 135-174.

Markov, D. D., 2022. Sucrose Preference Test as a Measure of Anhedonic Behavior in a Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression: Outstanding Issues. *Brain Sci* 12.

Martin-Fardon, R., Weiss, F., 2013. Modeling relapse in animals. *Curr Top Behav Neurosci* 13, 403-432.

Maurel, S., De Vry, J., Schreiber, R., 1999. Comparison of the effects of the selective serotonin-reuptake inhibitors fluoxetine, paroxetine, citalopram and fluvoxamine in alcohol-preferring cAA rats. *Alcohol* 17, 195-201.

McClelland, R. C., Sarfaty, T., Hernandez, L., Hoebel, B. G., 1989. The appetite suppressant, d-fenfluramine, decreases self-stimulation at a feeding site in the lateral hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 32, 411-414.

McDevitt, R. A., Marino, R. A. M., Tejeda, H. A., Bonci, A., 2021. Serotonergic inhibition of responding for conditioned but not primary reinforcers. *Pharmacol Biochem Behav* 205, 173186.

McHugh, R. K., Weiss, R. D., 2019. Alcohol Use Disorder and Depressive Disorders. *Alcohol Res* 40.

Mekonen, T., Chan, G. C. K., Connor, J., Hall, W., Hides, L., Leung, J., 2021. Treatment rates for alcohol use disorders: a systematic review and meta-analysis. *Addiction* 116, 2617-2634.

Melander, T., Hökfelt, T., Rökaeus, A., Cuello, A. C., Oertel, W. H., Verhofstad, A., Goldstein, M., 1986. Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J Neurosci* 6, 3640-3654.

Merikangas, K. R., Gelernter, C. S., 1990. Comorbidity for alcoholism and depression. *Psychiatr Clin North Am* 13, 613-632.

Millón, C., Flores-Burgess, A., Castilla-Ortega, E., Gago, B., García-Fernandez, M., Serrano, A., Rodriguez de Fonseca, F., Narváez, J. A., Fuxe, K., Santín, L., Díaz-Cabiale, Z., 2019b. Central administration of galanin N-terminal fragment 1-15 decreases the voluntary alcohol intake in rats. *Addict Biol* 24, 76-87.

Millón, C., Flores-Burgess, A., Gago, B., Alén, F., Orio, L., García-Durán, L., Narváez, J. A., Fuxe, K., Santín, L., Díaz-Cabiale, Z., 2019a. Role of the galanin N-terminal fragment (1-15) in anhedonia: Involvement of the dopaminergic mesolimbic system. *J Psychopharmacol* 33, 737-747.

Millón, C., Flores-Burgess, A., Narváez, M., Borroto-Escuela, D. O., Gago, B., Santín, L., Castilla-Ortega, E., Narváez, J., Fuxe, K., Díaz-Cabiale, Z., 2017. The neuropeptides Galanin and Galanin(1-15) in depression-like behaviours. *Neuropeptides* 64, 39-45.

Millón, C., Flores-Burgess, A., Narváez, M., Borroto-Escuela, D. O., Santín, L., Gago, B., Narváez, J. A., Fuxe, K., Díaz-Cabiale, Z., 2016. Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system. *Brain Struct Funct* 221, 4491-4504.

Millón, C., Flores-Burgess, A., Narváez, M., Borroto-Escuela, D. O., Santín, L., Parrado, C., Narváez, J. A., Fuxe, K., Díaz-Cabiale, Z., 2014. A role for galanin N-terminal fragment (1-15) in anxiety- and depression-related behaviors in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.

Mitsukawa, K., Lu, X., Bartfai, T., 2008. Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cell Mol Life Sci* 65, 1796-1805.

Morton, E., Bhat, V., Giacobbe, P., Lou, W., Michalak, E. E., McInerney, S., Chakrabarty, T., Frey, B. N., Milev, R. V., Müller, D. J., Parikh, S. V., Rotzinger, S., Kennedy, S. H., Lam, R. W., Team, C.-B. I., 2021. Predictors of Quality of Life Improvement with Escitalopram and Adjunctive Aripiprazole in Patients with Major Depressive Disorder: A CAN-BIND Study Report. *CNS Drugs* 35, 439-450.

Muhonen, L. H., Lahti, J., Alho, H., Lönnqvist, J., Haukka, J., Saarikoski, S. T., 2011. Serotonin transporter polymorphism as a predictor for escitalopram treatment of major depressive disorder comorbid with alcohol dependence. *Psychiatry Res* 186, 53-57.

Nakajima, H., Kubo, T., Semi, Y., Itakura, M., Kuwamura, M., Izawa, T., Azuma, Y. T., Takeuchi, T., 2012. A rapid, targeted, neuron-selective, in vivo knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *J Biotechnol* 157, 326-333.

Naranjo, C. A., Knoke, D. M., 2001. The role of selective serotonin reuptake inhibitors in reducing alcohol consumption. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 20, 18-25.

Naranjo, C. A., Poulos, C. X., Bremner, K. E., Lanctôt, K. L., 1992. Citalopram decreases desirability, liking, and consumption of alcohol in alcohol-dependent drinkers. *Clin Pharmacol Ther* 51, 729-739.

Narváez, M., Millón, C., Borroto-Escuela, D., Flores-Burgess, A., Santín, L., Parrado, C., Gago, B., Puigcerver, A., Fuxe, K., Narváez, J. A., Díaz-Cabiale, Z., 2015. Galanin receptor 2-neuropeptide Y Y1 receptor interactions in the amygdala lead to increased anxiolytic actions. *Brain Struct Funct* 220, 2289-2301.

Neurobiología de la dependencia alcohólica Neurobiology of alcohol dependence S. Pérez-Riala, S. Ortíza, J. Manzanares a Hospital Universitario 12 de Octubre. Pabellón de Medicina Comunitaria. Servicio de Psiquiatría y Centro de Investigación. Avda de Córdoba s/n. 28041 Madrid Vol. 5. Núm. 1.páginas 4-12. Enero 2003.

Nevo, I., Hamon, M., 1995. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int* 26, 305-336; discussion 337-342.

Nieto, S. J., Grodin, E. N., Aguirre, C. G., Izquierdo, A., Ray, L. A., 2021. Translational opportunities in animal and human models to study alcohol use disorder. *Transl Psychiatry* 11, 496.

Nunes, E. V., Levin, F. R., 2004. Treatment of depression in patients with alcohol or other drug dependence: a meta-analysis. *JAMA* 291, 1887-1896.

O'Brien, C. P., Childress, A. R., McLellan, A. T., Ehrman, R., 1992. A learning model of addiction. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 70, 157-177.

Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (2021). Informe 2021. Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. Ministerio de Sanidad, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Madrid, España.

Owens, M. J., Knight, D. L., Nemeroff, C. B., 2001. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol Psychiatry* 50, 345-350.

- Panlilio, L. V., Goldberg, S. R., 2007. Self-administration of drugs in animals and humans as a model and an investigative tool. *Addiction* 102, 1863-1870.
- Pastoor, D., Gobburu, J., 2014. Clinical pharmacology review of escitalopram for the treatment of depression. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10, 121-128.
- Picciotto, M. R., 2008. Galanin and addiction. *Cell Mol Life Sci* 65, 1872-1879.
- Picciotto, M. R., Brabant, C., Einstein, E. B., Kamens, H. M., Neugebauer, N. M., 2010. Effects of galanin on monoaminergic systems and HPA axis: Potential mechanisms underlying the effects of galanin on addiction- and stress-related behaviors. *Brain Res* 1314, 206-218.
- Pinto, E., Reggers, J., Pitchot, W., Hansenne, M., Fuchs, S., Ansseau, M., 2002. Neuroendocrine evaluation of 5-HT1A function in male alcoholic patients. *Psychoneuroendocrinology* 27, 873-879.
- Pollak Dorocic, I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., Meletis, K., 2014. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron* 83, 663-678.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Pucilowski, O., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., Janowsky, D. S., 1993. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav* 54, 1215-1220.
- Rada, P., Avena, N. M., Leibowitz, S. F., Hoebel, B. G., 2004. Ethanol intake is increased by injection of galanin in the paraventricular nucleus and reduced by a galanin antagonist. *Alcohol* 33, 91-97.
- Rada, P. V., Mark, G. P., Hoebel, B. G., 1998. Dopamine release in the nucleus accumbens by hypothalamic stimulation-escape behavior. *Brain Res* 782, 228-234.

Reed, A. L., Happe, H. K., Petty, F., Bylund, D. B., 2008. Juvenile rats in the forced-swim test model the human response to antidepressant treatment for pediatric depression. *Psychopharmacology (Berl)* 197, 433-441.

Rehm, J., Shield, K. D., Gmel, G., Rehm, M. X., Frick, U., 2013. Modeling the impact of alcohol dependence on mortality burden and the effect of available treatment interventions in the European Union. *Eur Neuropsychopharmacol* 23, 89-97.

Richardson, N. R., Roberts, D. C., 1991. Fluoxetine pretreatment reduces breaking points on a progressive ratio schedule reinforced by intravenous cocaine self-administration in the rat. *Life Sci* 49, 833-840.

Richardson, N. R., Roberts, D. C., 1996. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66, 1-11.

Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., Ruano, A., García-Barceló, M., Rivera-Cervantes, M., García-Rodríguez, J., Sánchez-Mateos, S., 2016. [The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 33, 288-299.

Roy, A., Berrettini, W., Adinoff, B., Linnoila, M., 1990. CSF galanin in alcoholics, pathological gamblers, and normal controls: a negative report. *Biol Psychiatry* 27, 923-926.

Russo, S. J., Nestler, E. J., 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 14, 609-625.

Sanchis-Segura, C., Spanagel, R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11, 2-38.

Sari, Y., Johnson, V. R., Weedman, J. M., 2011. Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 98, 401-443.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.

Schneider, E. R., Rada, P., Darby, R. D., Leibowitz, S. F., Hoebel, B. G., 2007. Orexigenic peptides and alcohol intake: differential effects of orexin, galanin, and ghrelin. *Alcohol Clin Exp Res* 31, 1858-1865.

Serova, L. I., Laukova, M., Alaluf, L. G., Pucillo, L., Sabban, E. L., 2014. Intranasal neuropeptide Y reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 142-147.

Serova, L. I., Nwokafor, C., Van Bockstaele, E. J., Reyes, B. A. S., Lin, X., Sabban, E. L., 2019. Single prolonged stress PTSD model triggers progressive severity of anxiety, altered gene expression in locus coeruleus and hypothalamus and effected sensitivity to NPY. *Eur Neuropsychopharmacol* 29, 482-492.

Serova, L. I., Tillinger, A., Alaluf, L. G., Laukova, M., Keegan, K., Sabban, E. L., 2013. Single intranasal neuropeptide Y infusion attenuates development of PTSD-like symptoms to traumatic stress in rats. *Neuroscience* 236, 298-312.

Shah, A., Zuo, W., Kang, S., Li, J., Fu, R., Zhang, H., Bekker, A., Ye, J. H., 2017. The lateral habenula and alcohol: Role of glutamate and M-type potassium channels. *Pharmacol Biochem Behav* 162, 94-102.

Shahzad, N., Ahmad, J., Khan, W., Al-Ghamdi, S. S., Ain, M. R., Ibrahim, I. A., Akhtar, M., Khanam, R., 2014. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav* 117, 79-84.

Shin, C., Ko, Y. H., Shim, S. H., Kim, J. S., Na, K. S., Hahn, S. W., Lee, S. H., 2020. Efficacy of Bupirone Augmentation of Escitalopram in Patients with Major Depressive Disorder with and without Atypical Features: A Randomized, 8 Week, Multicenter, Open-Label Clinical Trial. *Psychiatry Investig* 17, 796-803.

- Sinha, R., 2011. New findings on biological factors predicting addiction relapse vulnerability. *Curr Psychiatry Rep* 13, 398-405.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D. M., 1985. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6, 509-546.
- Spanagel, R., 2017. Animal models of addiction. *Dialogues Clin Neurosci* 19, 247-258.
- Spitta, G., Garbusow, M., Buchert, R., Heinz, A., 2023. Dopamine and Alcohol: A Review of in vivo PET and SPECT Studies. *Neuropsychobiology* 82, 319-345.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.
- Storvik, M., Tiihonen, J., Haukijärvi, T., Tupala, E., 2006. Lower serotonin transporter binding in caudate in alcoholics. *Synapse* 59, 144-151.
- Swendsen, J. D., Tennen, H., Carney, M. A., Affleck, G., Willard, A., Hromi, A., 2000. Mood and alcohol consumption: an experience sampling test of the self-medication hypothesis. *J Abnorm Psychol* 109, 198-204.
- Tang, V. M., Yu, D., Weissman, C. R., Jones, B. D. M., Wang, G., Sloan, M. E., Blumberger, D. M., Daskalakis, Z. J., Le Foll, B., Voineskos, D., 2023. Treatment outcomes in major depressive disorder in patients with comorbid alcohol use disorder: A STAR*D analysis. *J Affect Disord* 339, 691-697.
- Tatemoto, K., Rökaeus, A., Jörnvall, H., McDonald, T. J., Mutt, V., 1983. Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164, 124-128.
- Tavares, G. E. B., Bianchi, P. C., Yokoyama, T. S., Palombo, P., Cruz, F. C., 2023. Involvement of cortical projections to basolateral amygdala in context-induced reinstatement of ethanol-seeking in rats. *Behav Brain Res* 448, 114435.

Tepper, J. M., Sun, B. C., Martin, L. P., Creese, I., 1997. Functional roles of dopamine D2 and D3 autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown in vivo. *J Neurosci* 17, 2519-2530.

Tesfa, S., Giru, B. W., Bedada, T., Gela, D., 2021. Mental Distress and Associated Factors Among Hospitalized Medical-Surgical Adult Inpatients in Public Hospitals, Addis Ababa, Ethiopia, 2020: Cross-Sectional Study. *Psychol Res Behav Manag* 14, 1235-1243.

Thorne, R. G., Emory, C. R., Ala, T. A., Frey, W. H., 1995. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res* 692, 278-282.

Torrens, M., Fonseca, F., Mateu, G., Farré, M., 2005. Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 78, 1-22.

Turner, S., Mota, N., Bolton, J., Sareen, J., 2018. Self-medication with alcohol or drugs for mood and anxiety disorders: A narrative review of the epidemiological literature. *Depress Anxiety* 35, 851-860.

Valyear, M. D., Villaruel, F. R., Chaudhri, N., 2017. Alcohol-seeking and relapse: A focus on incentive salience and contextual conditioning. *Behav Processes* 141, 26-32.

Visser, A. K., Kleijn, J., van Faassen, M. H., Dremencov, E., Flik, G., Kema, I. P., Den Boer, J. A., van Waarde, A., Dierckx, R. A., Bosker, F. J., 2015. Serotonin-2C antagonism augments the effect of citalopram on serotonin and dopamine levels in the ventral tegmental area and nucleus accumbens. *Neurochem Int* 81, 10-15.

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

Waugh, J., Goa, K. L., 2003. Escitalopram: a review of its use in the management of major depressive and anxiety disorders. *CNS Drugs* 17, 343-362.

West, A. P., 1990. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 14, 863-877.

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

Wiczak, W., Rekowski, P., Kupryszewski, G., Lubkowski, J., Oldziej, S., Liwo, A., 1996. Fluorescence and Monte Carlo conformational studies of the (1-15) galanin amide fragment. *Biophys Chem* 58, 303-312.

Wilcox, H. C., Conner, K. R., Caine, E. D., 2004. Association of alcohol and drug use disorders and completed suicide: an empirical review of cohort studies. *Drug Alcohol Depend* 76 Suppl, S11-19.

Wilson, K. E., Limburg, S., Duggan, M. K., Lawther, A. J., Williams, S. J., Lawrence, A. J., Hale, M. W., Djouma, E., 2018. The galanin receptor-3 antagonist, SNAP 37889, inhibits cue-induced reinstatement of alcohol-seeking and increases c-Fos expression in the nucleus accumbens shell of alcohol-preferring rats. *J Psychopharmacol* 32, 911-921.

Witkiewitz, K., Litten, R. Z., Leggio, L., 2019. Advances in the science and treatment of alcohol use disorder. *Sci Adv* 5, eaax4043.

Witkiewitz, K., van der Maas, H. L., Hufford, M. R., Marlatt, G. A., 2007. Nonnormality and divergence in posttreatment alcohol use: reexamining the Project MATCH data "another way.". *J Abnorm Psychol* 116, 378-394.

Witte, J., Bentley, K., Evins, A. E., Clain, A. J., Baer, L., Pedrelli, P., Fava, M., Mischoulon, D., 2012. A randomized, controlled, pilot study of acamprosate added to escitalopram in adults with major depressive disorder and alcohol use disorder. *J Clin Psychopharmacol* 32, 787-796.

Wright, K. C., 1997. Working with laboratory animals: general principles and practical considerations. *J Vasc Interv Radiol* 8, 363-373.

Yahyavi-Firouz-Abadi, N., See, R. E., 2009. Anti-relapse medications: preclinical models for drug addiction treatment. *Pharmacol Ther* 124, 235-247.

Yan, Y., Wang, Y. L., Su, Z., Zhang, Y., Guo, S. X., Liu, A. J., Wang, C. H., Sun, F. J., Yang, J., 2014. Effect of oxytocin on the behavioral activity in the behavioral despair depression rat model. *Neuropeptides* 48, 83-89.

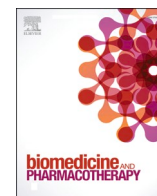
Yang, S. N., Wang, Y. H., Tung, C. S., Ko, C. Y., Liu, Y. P., 2015. Effects of Escitalopram on a Rat Model of Persistent Stress-Altered Hedonic Activities: Towards a New Understanding of Stress and Depression. *Chin J Physiol* 58, 404-411.

Yang, Y., Wang, H., Hu, J., Hu, H., 2018. Lateral habenula in the pathophysiology of depression. *Curr Opin Neurobiol* 48, 90-96.

Anexos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Galanin N-terminal fragment (1–15) reduces alcohol seeking and alcohol relapse in rats: Involvement of mesocorticolimbic system

Noelia Cantero-García^a, Antonio Flores-Burgess^a, Juan Pedro Pineda-Gómez^a, Laura Orio^b,
Antonia Serrano^c, Zaida Díaz-Cabiale^{a,*}, Carmelo Millón^{a,b,**}

^a Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Medicina, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

^b Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^c Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental e Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga 29010, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Alcohol
Galanin
Galanin (1–15)
Alcohol seeking
Relapse

ABSTRACT

Alcohol Use Disorder (AUD) is among the most prevalent mental illnesses, and due to the low efficacy of the current medication, it is essential to find new biological targets that could modulate alcohol consumption. Since Galanin (1–15) [GAL(1–15)] produces a loss of motivational behaviour by an artificial reinforcer and decreases the preference an alcohol consumption in a voluntary alcohol intake, we have studied the role of GAL(1–15) in alcohol-seeking behaviour and the involvement of the corticomesolimbic system as well as the role of GAL(1–15) in context-induced alcohol relapse. In rats, we have studied GAL(1–15)-effects on alcohol-seeking in self-administration, in fixed-ratio (FR1) and progressive-ratio (PR), and the involvement of GAL receptors using siRNA GALR1 or GALR2 knockdown animals. We have analysed the transcriptional changes of C-Fos, dopamine receptors, GAL receptors and 5HT1A receptors in the corticomesolimbic system. Also, we have examined the effect of GAL(1–15) in context-induced alcohol relapse. GAL(1–15) substantially reduced alcohol-seeking behaviour in the operant self-administration model in an FR1 protocol and at the breaking point in a PR schedule. GALR1 and GALR2 were involved in these effects, as indicated by the analysis by GALR2 antagonist and GALR1 and GALR2 knockdown animals. Notably, the mechanism of GAL(1–15)-mediated actions involved changes in C-Fos, Dopamine receptors and 5HT1A expression in the ventral tegmental area, accumbens nucleus and prefrontal cortex. Significantly, GAL(1–15) reduced the context-induced alcohol relapse. These results open up the possibility to use GAL(1–15) as a novel strategy in AUD.

1. Introduction

Alcohol Use Disorder (AUD) is among the most prevalent mental illnesses worldwide [1]. The total alcohol per capita consumption in the world's population over 15 years of age rose from 5.55.5 litres of pure alcohol in 2005–6.4 litres in 2016, resulting in some 3 million deaths (5.3% of all deaths) worldwide [2]. In 2016, 2.3 billion people were current drinkers.

Nowadays, the 2019 coronavirus disease (COVID-19) pandemic may also impact the population's alcohol use patterns [3–5]. Increased anxiety, depression, and stress in response to COVID-19 may be associated with increased alcohol use [5].

Another relevant factor of AUD patients is that more than 50% of new patients with alcohol abuse relapse within three months [6,7] being

the main trigger the stressful events, the drug-associated cues and context, or the re-exposure to a small amount of alcohol [7,8].

However, AUD remains severely undertreated, with less than 10% of adults with AUD in Europe receiving pharmacotherapy and/or psychotherapy treatment [9,10]. Moreover, pharmacotherapies have seen limited use in the treatment of AUD, partially due to the low efficacy of the medication [10]. Therefore, it is essential to find new biological targets that could modulate alcohol consumption.

Recent studies indicate that neuropeptidergic signalling, including Galanin (GAL), is involved in alcohol consumption [11].

Galanin (GAL) is a neuropeptide [12] widely distributed in neurons within the central nervous system (CNS) [13]. Three GAL receptor (GALR1–3) subtypes with high affinities for GAL exist [14,15].

GAL participates in several central functions [11,15–17] and also it is

* Correspondence to: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n., 29080 Málaga, Spain.

** Correspondence to: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n., 29080 Málaga, Spain.

E-mail addresses: zaida@uma.es (Z. Díaz-Cabiale), carmelomp@uma.es (C. Millón).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2022.113508>

Received 1 June 2022; Received in revised form 25 July 2022; Accepted 30 July 2022

Available online 4 August 2022

0753-3322/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).





Article

The Combination of Galanin (1–15) and Escitalopram in Rats Suggests a New Strategy for Alcohol Use Disorder Comorbidity with Depression

Noelia Cantero-García¹, Antonio Flores-Burgess¹, David Ladrón de Guevara-Miranda², Antonia Serrano³, Laura García-Durán¹ , Araceli Puigcerver², Kjell Fuxe⁴ , José Ángel Narváez¹, Luis Javier Santín² , Zaida Díaz-Cabiale^{1,*} and Carmelo Millón^{1,*}

- ¹ Facultad de Medicina, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Campus de Teatinos s/n, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain; noeliacg@uma.es (N.C.-G.); afburgess@uma.es (A.F.-B.); lauragd_24@uma.es (L.G.-D.); bueno@uma.es (J.Á.N.)
- ² Facultad de Psicología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Campus de Teatinos s/n, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain; david.lgm@uma.es (D.L.d.G.-M.); araceli@uma.es (A.P.); luis@uma.es (L.J.S.)
- ³ Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental e Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29010 Málaga, Spain; antonia.serrano@ibima.eu
- ⁴ Department of Neuroscience, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden; kjell.Fuxe@ki.se
- * Correspondence: zaida@uma.es (Z.D.-C.); carmelomp@uma.es (C.M.)



Citation: Cantero-García, N.; Flores-Burgess, A.; Ladrón de Guevara-Miranda, D.; Serrano, A.; García-Durán, L.; Puigcerver, A.; Fuxe, K.; Narváez, J.Á.; Santín, L.J.; Díaz-Cabiale, Z.; et al. The Combination of Galanin (1–15) and Escitalopram in Rats Suggests a New Strategy for Alcohol Use Disorder Comorbidity with Depression. *Biomedicines* **2022**, *10*, 412. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020412>

Academic Editors: Jean A. Boutin and James A. Marrs

Received: 3 December 2021

Accepted: 3 February 2022

Published: 9 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Alcohol use disorder (AUD) is highly prevalent, and over 50% of AUD patients also suffer major depressive disorders. Selective 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs) can reduce rodent ethanol drinking but exert modest clinical efficacy in alcoholic individuals. Finding new pharmacological strategies that could modulate alcohol consumption and depression is necessary. We have analyzed the effect of Galanin (1–15) [GAL(1–15)] on escitalopram (ESC)-mediated effect in alcohol consumption using the alcohol self-administration test, the nuclei involved in the effect, and whether GAL(1–15) + ESC modulated the response in despair or anxiety tests in animals under chronic alcohol intake. GAL(1–15) + ESC combination substantially reduced alcohol intake in the alcohol self-administration test and, moreover, enhanced the reduction of reward capacity of ESC on different reinforcers such as sucrose or saccharine. GAL(1–15) + ESC coadministration significantly decreases the number of C-Fos-IR TH cell bodies in the VTA, and PCA analysis suggests that one functional network, including VTA, RMTg and DR, is involved in these effects. Significantly in rats with chronic alcohol consumption, GAL(1–15) reversed adverse ESC-mediated effects in the depression-related behavioural test and forced swimming test. The results open up the possibility of using GAL(1–15) in combination with the SSRI Escitalopram as a novel strategy in AUD comorbidity with depression.

Keywords: Galanin (1–15); escitalopram; depression; alcohol

1. Introduction

Alcohol use disorder (AUD) is a highly prevalent psychiatric disorder, and over 50% of treated AUD patients also suffer from other psychiatric disorders, including major depressive disorders [1]. The rate of AUD and depression comorbidity have been assessed in epidemiologic studies that linked AUD to 3.7-fold higher odds of experiencing a depressive episode in the prior year [2], and individuals with a lifetime diagnosis of major depression to a 1.3-fold increased risk of AUD [3]. Furthermore, these studies found that major depression worsened the symptoms of AUD and vice versa [4], which may explain why people with comorbid depression and AUD are at greater risk for suicide [5,6].

Both psychiatric disorders, AUD and depression, are associated with dysregulated brain monoaminergic systems including the serotonergic (5-HT) system. A link between serotonergic neurotransmission and alcohol intake is suggested based on preclinical