



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga

Facultad de Medicina

TESIS DOCTORAL

Interacciones entre la Galanina (1-15) y los
receptores Serotoninérgicos 5HT1A en el Sistema
Nervioso Central: Implicación en la Depresión

Directores:

Prof. Dr. D. José Ángel Narváez Bueno

Prof. Dra. Dña. Zaida Díaz Cabiale

Memoria presentada por D. Carmelo Millón Peñuela para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Málaga.

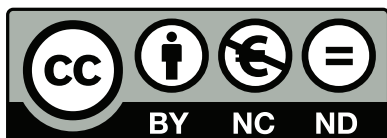
Málaga, Diciembre 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Carmelo Millón Peñuela

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

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



Don José Ángel Narvárez Bueno, Catedrático de universidad y Doña Zaida Díaz Cabiale, Profesora Titular de universidad del Departamento de Fisiología Humana y de la Educación Física y Deportiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN

Que **Don Carmelo Millón Peñuela**, Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo mi dirección el trabajo recogido en la presente Memoria titulada “Interacciones entre la Galanina (1-15) y los receptores Serotoninérgicos 5HT1A en el Sistema Nervioso Central: Implicación en la Depresión” para la obtención del Título de Doctor por la Universidad de Málaga.

Revisado el trabajo, considero que la presente memoria reúne todo los requisitos necesarios para ser sometida a juicio de la Comisión correspondiente.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Málaga a 17 de diciembre de dos mil catorce.

Fdo. D. José Ángel Narvárez Bueno

Fdo. Dña. Zaida Díaz Cabiale

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo y que sin su apoyo, confianza y consejos durante estos años este trabajo no hubiera llegado a su fin.

En primer lugar quisiera dar las gracias al Dr. José Ángel Narvárez por ofrecerme la posibilidad de formar parte de su grupo de investigación y poder realizar esta tesis doctoral, gracias por la confianza depositada en mí y por permitirme hacer de un sueño una realidad.

Sin la ayuda, plena dedicación y consejos de la Dra. Zaida Díaz Cabiale esta tesis doctoral no hubiese sido posible. Su continuo apoyo durante todos estos años me han motivado a seguir y me han ayudado a apreciar que he sido un afortunado al poder dedicarme a la ciencia, sus consejos me han hecho aprender y madurar, tanto a nivel científico como personal y su ejemplo ha determinado el espejo científico en el que quiero mirarme en el futuro. Gracias por todo Zaida.

Cabe destacar en mis agradecimientos a la Dra. Conchi Parrado, tengo que agradecerle además de su gran ayuda en la realización de esta tesis su ayuda incondicional en el momento más duro de mi vida, gracias a ella hoy puedo presentar este trabajo y lo más importante gracias a ella mi vida hoy es como es.

La realización de este trabajo no hubiera sido lo mismo sin mis compañeros de laboratorio el Dr. Manuel Narvárez y D. Antonio Flores. Gracias Manolo y Antonio por vuestro apoyo personal, vuestra ayuda en los experimentos de esta tesis y por las largas charlas sobre ciencia de las que tanto he aprendido, pero sobre todo por hacer que las jornadas de trabajo sean más llevaderas y haya resultado un placer ir a trabajar.

Quisiera dar las gracias al Dr. Luis Santín del departamento de Psicobiología por haberme ayudado tanto en tantos aspectos de esta tesis, gracias por tu guía en la realización de las pruebas de comportamiento y por haber estado ahí siempre que he necesitado tu ayuda. A la Dra. Araceli Puigcerver por su interés en esta tesis y a la Dra. Estela Castilla gracias por ser tan buena compañera y por tu disponibilidad para ayudarme.

Quiero dar las gracias a los miembros del departamento de Fisiología Humana y de la Educación Física y Deportiva, tanto a los profesores Dr. D. Salvador González-Barón, Dr. José Ángel Aguirre, Dr. Marc Estefan Dawid, Dr. Pablo Lara, Dra. Amelia Díaz, Dr. Miguel A. Barbancho, Dr. Manuel V. González y al Dr. Álvaro Milán como al personal de administración y servicios Dña. Isabel Barceló y Dña. Estrella Lara por su ayuda, interés y ánimo durante la realización de este trabajo y sobre todo por hacer que en el departamento me sienta como en casa. Especialmente quiero dar las gracias a la Dra. María García por su especial seguimiento de este trabajo y por sus consejos.

Al Dr. Kjell Fuxe quiero agradecer el haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio del Instituto Karolinska, haberme facilitado los medios necesarios para la realización de los experimentos pero sobre todo el poder haber aprendido tanto de él. Al Dr. Dasiel Borroto, agradecer su gran ayuda durante las estancias en Estocolmo, tanto por su ayuda en el laboratorio enseñándome nuevas metodologías como por su ayuda más personal durante las mismas. También quisiera dar las gracias a la Dra. Belén Gago por su ayuda durante la estancia en San Sebastián.

Merecen una especial mención los servicios de estabulario, radioisótopos, microscopía y biología molecular de la Universidad de Málaga, sin la ayuda de su personal muchos de los experimentos de esta tesis no hubieran sido posibles.

Todo este trabajo nunca hubiera sido posible sin el apoyo de toda mi familia incluida mi familia política. Agradezco en particular a mis padres por ser mi ejemplo en la vida y por permitirme estudiar y dedicarme a lo que me gusta. A mi hermano Antonio por estar siempre ahí, en los buenos y malos momentos. Especialmente a mi padre por enseñarme a ser curioso, por haberme despertado desde muy pequeño el interés por la ciencia y por haberme mostrado que el trabajo diario es lo que te permite alcanzar tus metas y realizarte como persona, gracias papa siempre estarás presente en mi vida.

El agradecimiento más profundo es para mi mujer, Mari Nieves, gracias por haber decidido pasar tu vida conmigo y por apoyarme siempre en todo aunque esto suponga robarle muchas horas a la familia, pero sobre todo gracias por la razón por la que soy feliz cada día, Carmelo y Martín. Sin vosotros la vida no tendría sentido.

Este trabajo ha sido subvencionado con ayudas procedentes de la Junta de Andalucía (Proyecto de excelencia CVI6476) y Fundación La Marató de TV3 (090130/31/32).

A mi mujer y mis hijos

A mi padre

“En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás.
Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas.
Se curioso.... Porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos.”

Walt Disney

Parte de los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes congresos:

C. Millón , M. Narváez , C. Parrado , A. Puigcerver , L. Santín , K. Fuxe , J. A. Narváez, Z. Díaz-Cabiale. The Role of the Galanin N-terminal fragment (1-15) in depression- and anxiety -related behavioural tests in rats. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neurociencia (SENC). Salamanca del 28 al 30 de Septiembre del 2011.

C. Millón , A. Flores , M. Narváez , C. Parrado , A. Puigcerver, R. Coveñas , L. Santín , K. Fuxe , J. A. Narváez , Z. Díaz-Cabiales. Galanin N-Terminal fragment (1-15) produces depressant- and anxiolytic- like actions in the rat Forced Swimming Test and Open Field Test. 8Th FENS Forum of European Neuroscience. Barcelona del 14 al 18 de Julio del 2012.

Carmelo Millón Peñuela. The role of Galanin(1-15) in anxiety and depression: Gal(1-15)/5-HT1A receptor interactions on behavioral functions. Reunión “La Marató de TV3” Proyecto “NUEVAS DIANAS TERAPEUTICAS EN LA DEPRESION. ESTUDIO DEL HETEROMERO RECEPTOR GALANINA-5HT1A EN EL CEREBRO” Málaga, 13 de Abril de 2012

Millón, C., Flores, A., Narváez, M., Santín, L. , Parrado, C., Puigcerver, A., Borroto-Escuela, D., Fuxe, K., Narváez., J.A., Díaz-Cabiale, Z. The administration of Galanin N-Terminal fragment (1-15) induces depressant- and anxiogenic effects in rats. Galanin SfN pre-meeting 2013. San Diego, Estados Unidos del 8-9 Noviembre de 2013 and 43rd annual meeting of Society for Neuroscience. San Diego, Estados Unidos del 9-13 Noviembre 2013

C. Millón , M. Narváez , A. Flores-Burgess , C. Parrado ¹, A. Puigcerver , R. Coveñas , L. Santín , DO. Borroto-Escuela , K. Fuxe , J. A. Narváez , Z. Díaz-Cabiale. Galanin N-Terminal fragment (1-15) induces a stronger effect than Galanin in depression- and anxiety- like related behavioural tests in rats. 9 FENS Forum of Neuscience. Milán, Italia del 5-9 Julio 2014.

INTRODUCCIÓN	1
1. Depresión	3
1.1 Diagnóstico y factores de riesgo de la depresión	3
1.2 Importancia socioeconómica de la depresión	5
1.3 Neurobiología de la depresión	6
1.4 Modelos animales en la depresión	13
2. Circuitos Neuronales implicados en la Depresión	17
2.1 Núcleos de Rafe	19
2.2 Hipocampo	23
3. Neurotransmisores y Neuropeptidos implicados en depresión	28
3.1 Serotonina	31
3.1.1 Receptor 5HT1A	35
3.2 Galanina	41
3.2.1 Fragmento N-terminal 1-15 de Galanina	50
4. Interacción Galanina/5HT1A	57
OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Metodología Animal	67
1.1 Animales de experimentación	67
1.2 Anestesia de los animales	67
1.3 Cirugía estereotáxica con implantación de cánula crónica Intracerebroventricular lateral	68
1.4 Inyecciones Intracerebroventricular	70
1.5 Inyecciones subcutáneas	71
1.6 Técnicas experimentales	71
1.6.1 Estudios de comportamiento animal	71
1.6.2 Procesamiento de tejido cerebral	80
1.6.3 Autorradiografía	82
1.6.4 Hibridación <i>in situ</i>	84
1.6.5 Técnicas inmunohistoquímicas	86
1.6.6 Ligazón por proximidad (PLA) en tejido	92

1.6.7 Generación de animales knockdown para el receptor GALR2	95
1.7 Grupos experimentales	100
1.7.1 Pruebas de comportamiento animal	100
1.7.2 Estudios a nivel de receptor: Autorradiografía	113
1.7.3 Estudios de expresión del receptor 5HT1A: Hibridación <i>in situ</i>	114
2. Metodología en cultivos celulares	115
2.1 Líneas celulares y transfección	115
2.2 Tráfico vesicular de GALR en células HEK-293 tras la incubación con GAL y GAL(1-15)	116
2.3 Inmunofluorescencia contra los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A en células RN33B	120
2.4 Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2, GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en células RN33B	121
2.5 Síntesis y almacenamiento de Serotonina (5HT) en células RN33B tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	123
2.6 Expresión de la proteína C-Fos y del receptor 5HT1A por inmunofluorescencia en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	124
2.7 Expresión de la proteína C-Fos y del receptor 5HT1A mediante la técnica de <i>in cell western</i> en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	125
3. Análisis Estadístico	127
RESULTADOS	129
RESULTADOS GAL(1-15)	131
1. Estudios de comportamiento animal	132
1.1 Efecto de la GAL(1-15) en pruebas de ansiedad y depresión animal	132
1.1.1 Test del campo abierto	132
1.1.2 Test del laberinto elevado en cruz	134
1.1.3 Test de la natación forzada	135
1.1.4 Test de la evitación pasiva	136
1.2 Comparación entre la acción de la GAL(1-15) y de la GAL en pruebas de comportamiento animal	138
1.2.1 Test del campo abierto	138
1.2.2 Test de la natación forzada	140
1.3 Acción del M871, antagonista de receptores tipo 2 de Galanina, en el efecto inducido por GAL(1-15) en las pruebas del Campo abierto y de la Natación Forzada	141

1.3.1 Test del campo abierto	141
1.3.2 Test de la natación forzada	143
2. Técnicas Inmunohistoquímicas	145
2.1 Inmunohistoquímica simple	145
2.1.1 Inmunohistoquímica de GALR1	145
2.1.2 Inmunohistoquímica de GALR2	149
2.2 Inmunofluorescencia doble GALR1/GALR2	152
3. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en tejido	157
4. Animales KnockDown para el receptor GALR2	160
4.1 Análisis de la expresión de GALR2 mediante Inmunohistoquímica en animales KnockDown de GALR2	160
4.2 Inmunofluorescencia doble GALR1/GALR2 en tejido de rata Knockdown GALR2	163
4.3 Análisis de la expresión de ARNm de GALR2 mediante RT-qPCR en animales KnockDown de GALR2	164
4.4 Efecto de la administración de la dosis efectiva de GAL(1-15) en animales Knockdown en las pruebas de la Natación Forzada y del Campo abierto	166
4.4.1 Test de la natación forzada	168
4.4.2 Test del campo abierto	170
4.5 Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en tejido de rata Knockdown GALR2	170
 RESULTADOS DE GAL(1-15) EN CULTIVOS CELULARES	 173
<i>Células HEK-293</i>	
1. Trafico vesicular de GALR1-YFP en células HEK-293 tras la incubación con GAL y GAL(1-15)	174
1.1 Internalización de GALR1-YFP en células HEK-293 que expresan GALR1-YFP o GALR1-YFP y GALR2 tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	174
1.2 Formación de endosomas tempranos (Rab5-RFP) en células HEK-293 que expresan los receptores GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15)	177
1.3 Formación de lisosomas (LAMP1-RFP) en células HEK-293 que expresan los receptores GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15)	179

Células derivadas del núcleo del Rafe: RN33B

2. Expresión de GALR1 y GALR2 en células en cultivo derivadas del núcleo del Rafe RN33B	181
3. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B	182
4. Síntesis y almacenamiento de Serotonina (5HT) en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	183
5. Expresión de la proteína C-Fos en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	184
5.1 Cuantificación de la proteína C-Fos por inmunofluorescencia	184
5.2 Cuantificación de la proteína C-Fos por <i>In cell western</i>	185
RESULTADOS DE LA INTERACCIÓN GAL(1-15)/5HT1A	187
1. Estudios de comportamiento animal	188
<i>Interacción GAL(1-15)/5HT1A</i>	
1.1 Estudios de comportamiento animal: Inyección de 8-OH-DPAT (sc. 20 min.) y GAL(1-15) (icv. 15 min.) antes de las pruebas de comportamiento	188
1.1.1 Efecto del 8-OH-DPAT en pruebas de ansiedad y depresión animal	188
1.1.1.1 Test de la natación forzada	188
1.1.1.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora	190
1.1.2 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en pruebas de comportamiento animal	190
1.1.2.1 Test de la natación forzada	191
1.1.2.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora	192
1.1.3 Efecto de la coadministración de la dosis no efectiva de GAL(1-15) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT en pruebas de comportamiento animal	192
1.1.3.1 Test de la natación forzada	192
1.1.3.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora	192
1.2. Estudios de comportamiento animal: Inyección de 8-OH-DPAT (sc. 60 min.) y GAL(1-15) (icv. 15 min.) antes de las pruebas de comportamiento	195
1.2.1 Efecto del 8-OH-DPAT en pruebas de ansiedad y depresión animal	195
1.2.1.1 Test de la natación forzada	195
1.2.1.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora	197

1.2.2 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en pruebas de comportamiento animal	197
1.2.2.1 Test de la natación forzada	197
1.2.2.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora	199
1.2.3 Efecto de la coadministración de la dosis no efectiva de GAL(1-15) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada	199
1.2.4 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en presencia del antagonista de receptores GALR2, en la prueba de natación forzada	201
<i>Interacción GAL/5HT1A</i>	
1.3 Estudios de comportamiento animal: <i>Inyección de 8-OH-DPAT (s.c 60 min) y GAL (icv. 15 min) antes de las pruebas de comportamiento</i>	203
1.3.1 Efecto de la GAL en la prueba de la natación forzada	203
1.3.2 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL y 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada	203
1.4 Efecto en el test de la natación forzada tras la coadministración de 8-OH-DPAT y GAL y de 8-OH-DPAT y GAL(1-15)	205
2. Estudios a nivel de receptor: Autorradiografía	207
2.1 Influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata	207
2.1.1 Acción del M871, antagonista de los receptores GALR2, en la influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata	210
2.2 Influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el núcleo del Rafe dorsal de rata	211
3. Estudios de la expresión del receptor 5HT1A: Hibridación <i>in situ</i>	212
3.1 Efecto de la GAL(1-15) sobre la expresión de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata	212
3.2 Efecto de la GAL(1-15) sobre la expresión de los receptores 5HT1A en el Rafe dorsal de rata	214
4. Técnicas inmunohistoquímicas	215
4.1 Inmunofluorescencia simple de 5HT1A	215
4.2 Inmunofluorescencia doble GALR2/5HT1A	216
5. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en tejido	221

RESULTADOS DE LA INTERACCIÓN GAL(1-15)/5HT1A EN CULTIVOS CELULARES	226
<i>Células derivadas del núcleo del Rafe: RN33B</i>	
1. Inmunofluorescencia simple contra 5HT1A en células en cultivo derivadas del núcleo del Rafe RN33B	227
2. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B	228
3. Expresión del receptor 5HT1A en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15)	229
3.1 Cuantificación de la expresión de 5HT1A por inmunofluorescencia	229
3.2 Cuantificación del receptor 5HT1A por <i>In cell western</i>	230
DISCUSIÓN	231
GAL(1-15)	233
1. Estudios de comportamiento animal	234
2. Técnicas inmunohistoquímicas y de ligazón por proximidad	243
3. Animales KnockDown GALR2: Bloqueo del heterodímero GALR1/GALR2	248
4. Cultivos celulares: Mecanismo de acción del heterodímero GALR1/GALR2	253
INTERACCIÓN GAL(1-15)/5HT1A	263
1. Estudio de la interacción GAL(1-15)/5HT1A en pruebas de comportamiento animal	264
2. Estudio de la interacción GAL(1-15)/5HT1A a nivel de receptor	272
3. Técnicas inmunohistoquímicas y de ligazón por proximidad	277
4. Interacción GAL(1-15)/5HT1A en cultivos celulares	280
CONCLUSIONES	283
SUMMARY	287
BIBLIOGRAFÍA	329

INTRODUCCIÓN

1. Depresión

La depresión es una de las enfermedades neuropsiquiátricas que presenta mayor incidencia dentro del grupo de enfermedades denominadas Trastornos del Estado de Ánimo. Ya Hipócrates en el siglo V a.C. hablaba del término melancolía, que significaba bilis negra, ya que desde la perspectiva hipocrática se pensaba que los estados de ánimo dependían del equilibrio entre cuatro humores: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra, y la depresión estaba causada por un exceso de bilis negra (Kandel et al., 2001).

De acuerdo con los criterios de diagnóstico actuales, la depresión es un síndrome caracterizado por un número de síntomas, entre los que se incluyen estado de ánimo deprimido, pérdida de interés o placer en casi todas las actividades (anhedonia), cambios de apetito o peso, del sueño y de la actividad psicomotora; falta de energía; sentimiento de infravaloración o culpa; dificultad para pensar, concentrarse o tomar decisiones, y pensamientos recurrentes de muerte o ideación, planes o intentos suicidas (Asociación Americana de Psiquiatría, DSM-V). La depresión no es una enfermedad homogénea, sino un fenómeno complejo, que comprende muchos subtipos y más de una etiología, incluyendo desde una predisposición a trastornos del estado del ánimo, a depresiones con diferencias en la intensidad de la sintomatología (desde cuadros ligeros a severos), con y sin características psicóticas, así como asociada a otros trastornos psiquiátricos y somáticos (Manji y Lenox, 2000).

1.1 Diagnóstico y factores de riesgo de la depresión.

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los trastornos mentales, editado por la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV,2000 y DSM-V,2013) un trastorno depresivo mayor es un curso clínico caracterizado por uno o más episodios depresivos sin historia de episodios maníacos. Donde un episodio depresivo mayor es un periodo de al menos 2 semanas durante el que hay un estado de ánimo deprimido o una pérdida de interés o placer en casi todas las actividades, acompañados de por lo menos cuatro síntomas más de una lista que incluye: alteración del peso corporal o de la ingesta, alteraciones en el sueño, agitación o enlentecimiento psicomotores, fatiga o pérdida de energía, sentimiento de inutilidad o culpa, disminución de la capacidad de pensar o concentrarse y pensamientos recurrentes de muerte o conducta suicida (Tabla 1).

Estado de ánimo depresivo*
Perdida de interés o placer*
Alteración del peso corporal y/o apetito
Alteración del sueño
Alteración o retardo psicomotor
Fatiga o pérdida de energía
Sentimiento de inutilidad o falta de valor
Indecisión, dificultad de concentración
Ideas suicidas

Tabla 1. Criterios de diagnóstico según DSM-IV y V de episodio de depresión mayor. Donde deben estar presente durante un periodo mínimo de dos semanas además de los dos primeros síntomas (*) otros cuatro síntomas de la lista.

Además esta misma guía diagnóstica hace una clasificación del trastorno depresivo mayor según sea producido por un único episodio depresivo o si es recidivante.

Uno de los factores para sufrir depresión es el componente genético. Estudios epidemiológicos en gemelos han demostrado que alrededor del 37% del riesgo de sufrir depresión mayor es genético (Sullivan et al., 2000). Algunos aspectos de la personalidad como son el pesimismo o la excesiva preocupación (Ansia) son también en parte heredables (Bouchard et al., 1994), siendo en parte responsables de la predisposición a padecer depresión (Kendler et al., 2006). Esto hace que la búsqueda de los genes implicados sea prioritaria, aunque existe una dificultad comparado con otras enfermedades mentales ya que la depresión es un complejo fenómeno con posiblemente muchos genes implicados.

Estudios genéticos han asociado varios genes con la heredabilidad de la depresión, como el gen del receptor de corticotropina (CRF1) que se encuentra presente en el cromosoma 18 (Segurado et al., 2003; Hamet et al., 2005) o una variante polimórfica del gen del transportador de Serotonina (5HTT), que causa una reducción en la captación de Serotonina (5HT) en las células presinápticas (Lesch et al., 1996) y confiere una predisposición a padecer depresión, pero únicamente asociado a una vida estresante (Caspi et al., 2003). Por tanto, algunos factores ambientales podrían conferir predisposición a la depresión por una afectación epigenética, por

ejemplo la conducta maternal en roedores causa un cambio epigenético en genes relacionados con el estrés (Weaver et al., 2004).

La vulnerabilidad a padecer depresión no es solo por una predisposición genética, también existen factores de riesgo no genéticos importantes como el estrés, traumas emocionales, infecciones virales (ej. Borna virus) y algunos procesos estocásticos durante el desarrollo del cerebro (Fava y Kendler, 2000; Nestler et al., 2002). Ocurren episodios depresivos, además, en el contexto de innumerables condiciones medicas como afectaciones endocrinas (Hiper- o Hipocortisolemia), enfermedades vasculares, Parkinson, cáncer y diabetes.

El papel del estrés es particularmente importante, ya que la depresión es a menudo descrita como una enfermedad relacionada con el estrés, habiendo evidencias de que a menudo los episodios depresivos ocurren en contextos con mucho estrés. Sin embargo el estrés *per se* no es causa suficiente para causar depresión ya que muchas personas bajo unas condiciones de gran estrés no cursa en un episodio depresivo, mientras que otras bajo un estrés leve si lo desarrollan (Nestler et al., 2002).

1.2 Importancia socioeconómica de la depresión.

Entre las patologías de la población general los trastornos mentales presentan una incidencia alta, con un elevado impacto socio-económico, afectando además severamente a la calidad de vida de los pacientes. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, la depresión en el año 2020 se convertirá en la segunda enfermedad con mayor carga social y supondrá un 15% de toda la carga por enfermedad, ocupando el segundo lugar tras las cardiopatías isquémicas (Kullkarni y Dhir, 2009). En España, la depresión es el trastorno mental más frecuente, con una prevalencia de entre el 5 y el 10%, es decir, entre dos y cuatro millones de personas, aunque los expertos estiman que podría haber hasta seis millones de afectados por esta patología, la mitad de los cuales no estarían diagnosticados. Los datos hablan de un padecimiento de la depresión por parte de la población con una ratio entre sexos de 5:2, siendo mucho más acusado en mujeres que hombres.

Desde el punto de vista del gasto económico, la depresión causa un alto impacto ya que los trastornos del estado del ánimo, de los cuales la depresión mayor es la principal patología, están a la cabeza del gasto producido en enfermedades mentales en Europa, donde se destinan aproximadamente 113 billones de euros al año entre gastos médicos directos y gastos indirectos (Smith, 2011).

El suicidio es un riesgo considerable de mortalidad dentro de la depresión, entre un 10 y un 20%, siendo la tasa de suicidios más alta entre las edades de 15-24 años. Además, numerosos estudios han demostrado una relación entre la depresión y aquellos trastornos cardiovasculares que presentan una mortalidad incrementada: la depresión incrementaría el riesgo de desarrollar alteraciones cardíacas, en particular relacionadas con la patología coronaria (Rustad et al., 2013).

Otro rasgo muy importante de la depresión es la alta tasa de comorbilidad compartida con otras alteraciones psiquiátricas y/o neurológicas. La ansiedad, en particular, está muy frecuentemente asociada con alteraciones afectivas (Katon y Roy-Byrne, 1991).

1.3 Neurobiología de la depresión.

A pesar de que la depresión es el trastorno neuropsiquiátrico diagnosticado con mayor frecuencia, todavía no se conocen con detalle las bases patogénicas y neurobiológicas (Manji et al., 2001; Nestler et al., 2002) de esta enfermedad. La mayor parte del conocimiento procede del estudio de las acciones de los fármacos eficaces en el tratamiento de la depresión, principalmente aquellos que modulan los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica (Nutt et al., 2002).

Hipótesis de las Monoaminas

La hipótesis de las monoaminas parte de la idea que los síntomas que producen la depresión son producidos por unos bajos niveles de neurotransmisores monoaminérgicos (Serotonina (5HT), Noradrenalina (NA) y Dopamina (DA)). El papel de la Serotonina (5HT) y la Noradrenalina (NA) en la depresión fue sugerido por la observación de la manipulación farmacológica de estos neurotransmisores y la inducción o reducción de los síntomas depresivos. Por ejemplo, estudios clínicos demostraron que el tratamiento con Iproniazida e Imipramina, medicamentos antituberculoso y antihistamina respectivamente, tenían un potente efecto antidepressivo en humanos, aumentando la transmisión central serotoninérgica y noradrenérgica. La Reserpina, un medicamento usado como antihipertensivo que disminuye el almacenamiento de monoaminas, bajando así los niveles, producía síntomas depresivos en pacientes (Krishnan y Nestler, 2008) sugiriéndose que la depresión fuera el resultado de la bajada de disponibilidad de 5HT y/o NA (Bunney and Davis, 1965; Schildkraut, 1965; Coppen, 1969).

Esta hipótesis de la depleción de las monoaminas fue ratificada por la aparición de los antidepressivos tricíclicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa, donde ambos producen un aumento del nivel de monoaminas en la sinapsis (Lanni et al.,

2009). Todas estas observaciones sugerían que el nivel de las monoaminas en particular la 5HT y la NA están estrechamente relacionados con la causa y tratamiento de la depresión (Shopsin et al., 1975; Delgado et al., 1994; Miller et al., 1996).

Otros estudios donde se disminuían los niveles de 5HT, mediante la administración de bebidas que contienen todos los aminoácidos excepto el Triptófano (Ruhe et al., 2007) muestran que, la disminución de la síntesis de 5HT no induce depresión en individuos sanos, sin embargo si puede causar episodios depresivos en pacientes que han sido tratados previamente con antidepresivos (Ruhe et al., 2007). Sugiriendo que la 5HT tiene un papel crítico en el tratamiento de la depresión pero que son necesarios factores neuroquímicos adicionales para causar depresión.

Como la medición directa de la neurotransmisión monoaminérgica no muestra resultados definitivos con respecto a la depresión, se estudiaron los efectos a nivel de receptor para estos neurotransmisores. Estudios postmortem muestran que la proteína p11, la cual aumenta la eficiencia de la señal del receptor 5HT_{1B}, receptor de serotonina localizado presinápticamente, está disminuida en cerebros de pacientes deprimidos (Svenningsson et al., 2006). El receptor de serotonina 5HT_{1A}, también se encuentra alterado en la depresión, reduciéndose la unión en los receptores 5HT_{1A} pre y post sinápticos, lo que sugiere una reducción de función del autorreceptor y una mala transmisión debida al receptor postsináptico (Drevets et al., 1999; Celada et al., 2004). Además, se observa que existe en pacientes deprimidos un aumento del número de autorreceptores 5HT_{1A}, lo que hace que disminuya la liberación de 5HT (Yates et al., 1990). Todas estas observaciones sugieren el importante papel que juegan las monoaminas, principalmente la 5HT en la depresión.

Antidepresivos

La hipótesis de las monoaminas ha sido fundamental en el desarrollo de los tratamientos antidepresivos, así la Imipramina y otros fármacos tricíclicos relacionados bloqueaban la recaptación de Noradrenalina (NA) (Iversen, 1965). Posteriormente Carlsson y colaboradores mostró que estas sustancias también bloqueaban la recaptación de Serotonina (Carlsson et al., 1968). Mostrándose por tanto los antidepresivos tricíclicos como potentes antidepresivos.

Siguiendo la línea de los antidepresivos tricíclicos inhibidores de la recaptación de NA y 5HT, se desarrollaron fármacos capaces de inhibir solo a uno de los neurotransmisores. El primer fármaco identificado con mayor selectividad para la 5HT

fue la Clomipramida, que resultó tener un efecto antidepresivo más potente que los fármacos tricíclicos originales. Esto estimuló el desarrollo de una serie de fármacos inhibidores de la recaptación de la 5HT (SSRIs) llegando al desarrollo de fármacos como la Fluoxetina que son algunos de los usados en la actualidad como tratamiento en la depresión. No obstante, los SSRIs eran menos efectivos que los fármacos tricíclicos iniciales en episodios de depresión severa (Anderson y Tomenson, 1994). Esto provocó que se desarrollaran fármacos que combinaban los efectos de la inhibición de la recaptación de NA y 5HT (SNRIs) con un efecto superior al de fármacos de generaciones anteriores (Nutt, 2002).

Se ha sugerido que el efecto beneficioso de los antidepresivos esté mediado por el aumento de la neurotransmisión serotoninérgica mediado, a su vez, por el receptor 5HT_{1A} (Nutt, 2002). Esta hipótesis está basada en la observación de que antagonistas de los receptores 5HT₃ no tienen efectos antidepresivos y los antagonistas de 5HT₂ tampoco tienen un efecto claro. Sin embargo, agonistas de los receptores 5HT_{1A}, como es la Bupiróna, puede tener algún efecto beneficioso en ciertas formas de depresión (Rickels et al., 1990; Stahl et al., 1998).

Finalmente, tras mostrar la evolución de los fármacos antidepresivos se puede proponer un mecanismo de acción antidepresiva universal, el cual consiste en la facilitación de la neurotransmisión noradrenérgica y serotoninérgica. Este efecto puede ser obtenido mediante inhibición del metabolismo de estas monoaminas, inhibiendo su recaptación o estimulando su liberación bloqueando sus autorreceptores presinápticos (Nutt, 2002).

Hipótesis neurotrófica y neurogénica

La disminución del volumen observado en el hipocampo y otras regiones cerebrales en pacientes deprimidos ha sugerido la hipótesis del decrecimiento de factores neurotróficos en la depresión, factores que a su vez regulan la plasticidad en el cerebro adulto (Monteggia et al., 2004; Duman et al., 2006). Estos estudios se han centrado en el papel del factor neurotrófico cerebral (BDNF), el cual es expresado abundantemente en estructuras límbicas. Estudios preclínicos muestran que varias formas de estrés reducen la cantidad de BDNF en el hipocampo, donde a su vez se ha visto que tratamientos crónicos con antidepresivos aumentan la señal mediada por este factor neurotrófico (Nestler et al., 2002; Duman et al., 2006). En estudios

postmortem en hipocampo de pacientes con depresión se muestran, efectos similares (Karege et al., 2005) así como una disminución en la concentración de BDNF en el suero (Duman et al., 2006).

El efecto antidepresivo del BDNF observado en roedores tras la infusión directa en el hipocampo parece confirmar la implicación de factores neurotróficos en la depresión (Shirayama et al., 2002). Este efecto se bloquea en animales carentes (knockout) del gen del factor BDNF (Monteggia et al., 2004; Monteggia et al., 2007). Sin embargo, algunos estudios preclínicos no reproducen el patrón de cambios generados por el estrés o por los antidepresivos, o incluso muestran efectos contrarios (Groves et al., 2007; Martinowich et al., 2007). Además, ratones carentes del factor neurotrófico BDNF o sus receptores no muestran comportamiento depresivo (Zorner et al., 2003; Monteggia et al., 2007) y en otras regiones, como el Área Ventral Tegmental (VTA) y núcleo Acumbens (NAc), el BDNF ejerce un efecto pro-depresivo (Eisch et al., 2003; Krishan et al., 2007), mientras que un animal carente del factor BDNF en ese circuito muestra efectos antidepresivos (Berton et al., 2006).

Estos resultados sugieren que la hipótesis del BDNF, puede ser muy simplista ya que este factor está implicado en la respuesta neuroplástica al estrés y al tratamiento antidepresivo, pero este depende de la región y del tipo de antidepresivo (Krishnan y Nestler, 2008).

Otro marcado efecto celular que se produce bajo el tratamiento de algunos antidepresivos es la inducción de la neurogénesis hipocampal adulta, proceso por el cual un precursor neural en la zona subgranular (SGZ) hipocampal forma una nueva neurona que se diferencia e integra en el giro dentado (Sahay et al., 2007; Pittenger et al., 2008). El bloqueo de esa neurogénesis hipocampal inhibe el efecto terapéutico de muchos antidepresivos en modelos animales (Sahay et al., 2007). Además el tratamiento con antidepresivos, posiblemente a través del regulador transcripcional CREB, incrementa la cantidad de varios factores de crecimiento en el hipocampo, lo que influencia la neurogénesis (Nestler et al., 2002; Pittenger et al., 2008). Entre estos se incluye el BDNF así como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y VGF, que a su vez tienen propiedades proneurogenicas y antidepresivas en roedores (Hunsberger et al., 2007; Thakker-Varia et al., 2007; Warner-Schmidt et al., 2007).

El mecanismo por el cual las nuevas neuronas pueden restaurar el estado de ánimo es aún desconocido. La neurogénesis puede incrementar la propagación de la actividad a través de las distintas zonas del hipocampo y permitir redes para adaptarse y aprender nuevas experiencias (Airan et al., 2007; Kempermann et al., 2008). Indicando este aumento, la posibilidad que la presencia de neurogénesis durante episodios estresantes medie un aprendizaje desadaptativo y así promover secuelas depresivas (Krishnan y Nestler, 2008). Sin embargo, la reducción de la neurogénesis

por si misma no produce depresión (Sahay et al., 2007; Surget et al., 2008). Estudios en roedores, donde la neurogénesis hipocampal ha sido bloqueada, no mostraron conducta depresiva o ansiosa (Santarelli et al., 2003; Zhao et al., 2008).

Por tanto, esto pone de relieve los puntos débiles de estas teorías de la depresión. Mecanismos de síntomas depresivos en respuesta al estrés difieren entre circuitos neurales y también pueden ser distintos de los cambios que están debajo de la depresión en ausencia de estrés externo (Krishnan y Nestler, 2008).

Hipótesis Neuroendocrina

Un destacado mecanismo por el cual el cerebro reacciona al estrés agudo y crónico es la activación del eje Hipotálamo- Hipofisario- Adrenal (HHA). Neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo secretan factor liberador de corticotropina (CRF), el cual estimula la síntesis y liberación de adrenocorticotropina (ACTH) por la adenohipófisis. La ACTH a su vez, estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides (Cortisol en el caso de los humanos y Corticosterona en roedores) por la corteza adrenal. Los Glucocorticoides ejercen un profundo efecto en el metabolismo y también en la conducta, vía acción directa de numerosas regiones cerebrales.

Estudios clínicos identificaron pequeños incrementos en la concentración de Glucocorticoides en el suero de pacientes deprimidos (Parker et al., 2003; Raison et al., 2003), alimentando el interés por conocer el papel de un disfuncional eje HHA en la patofisiología de la depresión. El estrés Físico o psicológico incrementa la concentración de Glucocorticoides en el suero, y algunos síntomas depresivos pueden ser producidos en roedores mediante la administración crónica de Glucocorticoides (Gourley et al., 2007). Se ha observado, que el exceso de glucocorticoides, a través de sus receptores, puede reducir la proliferación celular en la SGZ del giro dentado y producir cambios atróficos en subregiones del hipocampo (McEwens et al., 2007), lo cual podría contribuir a la reducción del volumen hipocampal observado en la depresión. Además, pacientes con el síndrome de Cushing, que presentan una alta concentración de cortisol circulante, también muestran síntomas depresivos y atrofia en el hipocampo (Nestler et al., 2002; McEwens et al., 2007). La hipercortisolemia en depresión se manifiesta en varios niveles, incluyendo una hiper-respuesta adrenal a la ACTH circulante y una hipersecreción de CRF (Nemeroff y Owens, 2002).

Estudios recientes sugieren que la hipercortisolemia es una característica casi exclusiva de episodios depresivos severos o acompañados de sintomatología psicótica (Nestler et al., 2002) en el cual antagonistas de glucocorticoides muestran eficacia terapéutica. Por el contrario, la depresión atípica, un subtipo caracterizada por

hiperfagia e hipersomnía, está asociada con hipocortisolemia (Gold et al., 2002; Brouwer et al., 2005).

Estos resultados sugieren la importancia de la regulación del eje HHA, y por tanto de los glucocorticoides en algunos síntomas de la depresión, reforzando el papel del estrés en la depresión.

Otras hipótesis

Además de las hipótesis expuestas anteriormente, existen multitud de estudios que relacionan la depresión o algunos de sus síntomas con otros sistemas de neurotransmisores o sustancias en el cerebro. En la Tabla 2 se muestran algunas teorías neurobiológicas adicionales, con algunas de sus evidencias y evidencias contradictorias, de la patofisiología de la depresión (Belmaker y Agram, 2008).

Aunque, como hemos visto anteriormente, existen varias teorías sobre la depresión, la hipótesis más relevante y la más extendida es la hipótesis de las monoaminas ya que en ella se basan la mayoría de tratamientos eficaces contra la depresión.

Teorías	Evidencias	Evidencias contradictorias
Alteración de la neurotransmisión glutamatérgica	Los niveles de glutamato y glutamina están reducidos en corteza prefrontal. El antagonista de NMDA Ketamina induce rápidos efectos antidepresivos. Reducción de los niveles corticales de mRNA del transportador de Glutamato y del enzima convertidor a Glutamina.	Los niveles de glutamato en el cortex occipital están incrementados. Ketamina se une a los receptores D2 de dopamina en estado de altaafinidad.
Reducción de la neurotransmisión GABAérgica	Los niveles de GABA en plasma, líquido cefalorraquídeo y corteza dorsolateral prefrontal y occipital están reducidos. Agentes moduladores de GABA tienen efectos en modelos animales de depresión. Antidepresivos afectan a la función GABAérgica. La inmunoreactividad de neuronas de GABA está reducida en corteza prefrontal.	El GABA está implicado en más del 30% de las sinapsis cerebrales, sugiriendo poca especificidad. La neurotransmisión GABAérgica puede ser relacionados con síntomas de ansiedad en la depresión.
Ritmos circadianos anormales	Deprivación del sueño y terapia con luz tienen efectos antidepresivos. Algunos pacientes deprimidos tienen ritmos circadianos anormales en humor, sueño, temperatura y secreciones neuroendocrinas. Roedores activos durante el día se convierten en depresivos cuando la luz del día es baja.	La asociación entre los genes relacionado con el ritmo circadiano y la depresión es inconsistente.
Síntesis deficiente de neuroesteroides	Los niveles de colesterol son bajos durante la depresión. DHEA tiene efectos antidepresivos en pacientes deprimidos.	Los hallazgos en esquizofrenia son similares. Los neuroesteroides afectan mayormente a la memoria y el sueño.
Fallo en la función opioide endógena	Agonistas del receptor δ -opioide tiene efectos antidepresivos en roedores y regula al alza los niveles de BDNF en el cerebro. Decrece la capacidad de unión de los receptores corticales μ -opioide en tristeza sostenida.	Estudios proponen que los opioides pueden ser efectivos en el tratamiento de la depresión, pero faltan ensayos exhaustivos que los respalden.
Las citoquinas median el diálogo entre el sistema inmune y el cerebro	La depresión es común en enfermedades autoinmunes. La exposición a citoquinas produce síntomas depresivos. Los antidepresivos tienen efectos antiinflamatorios. Las citoquinas afectan al eje HHA y a las monoaminas.	Los síntomas depresivos producidos por las citoquinas son temporales y no todos los estudios lo replican. El antagonista de la sustancia P no tiene efectos terapéuticos en la depresión.
Alteración de la Tirosina	La transtiretinina está reducida en el líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos. Las hormonas tiroideas regulan el sistema serotoninérgico en el cerebro.	La monoterapia con Tirosina es inefectiva. Muchos pacientes con hipotiroidismo no muestran depresión

Tabla 2. Algunas hipótesis adicionales de la patofisiología de la depresión. Modificado de Belmaker y Agram, 2008.

1.4 Modelos animales en depresión

Uno de los mayores impedimentos en la investigación de la depresión es la falta de modelos animales válidos (Nestler et al., 2002). Es muy difícil imaginar un modelo animal que recapitule perfectamente los síntomas de depresión en humanos, ya que los animales no solo carecen de la conciencia de si mismos, auto reflexión y consideración hacia los demás, sino también características de la enfermedad como estado de ánimo deprimido, baja autoestima o tendencias suicidas son difícilmente accesibles en animales no humanos (Deussing, 2006). Sin embargo, la depresión, como otras enfermedades mentales, está constituida por los llamados endofenotipos (Hasler et al., 2004) que pueden ser reproducidos independientemente y evaluados en animales, incluyendo alteraciones fisiológicas, endocrinológicas y neuroanatómicas así como algunos rasgos de comportamiento como por ejemplo la ansiedad o el comportamiento de desesperanza (Deussing,2006).

Los requerimientos mínimos para un modelo válido de depresión fueron propuestos por McKinney y colaboradores hace 40 años (McKinney y Bunney, 1969). En primer lugar el modelo debe ser razonablemente análogo al humano en cuanto a sintomatología (validez), que cause cambios comportamentales que puedan ser monitorizados objetivamente, producir cambios comportamentales que sean revertidos por las mismas modalidades de tratamiento que son efectivas en humanos y por último que estos modelos deben ser reproducibles entre investigadores. Originariamente, los modelos animales de depresión han sido diseñados como pruebas de detección para ensayar la eficacia de sustancias antidepresivas. Estos test descuidaban el aspecto de validez pero tienen una fuerte capacidad de identificación de sustancias antidepresivas.

Se han establecido numerosos paradigmas de comportamiento para construir un modelo de depresión válido, incluyendo pruebas de detección de antidepresivos. Algunas pruebas de comportamiento usadas para ensayar algunos fenotipos de depresión en roedores son el test de la natación forzada (Porsolt et al., 1977; Lucki, 1997), o los test basados en la ansiedad como el test del campo abierto o el laberinto elevado en cruz (Holmes, 2001; Nestler et al., 2002).

Así, se han establecido modelos animales de depresión en varias especies animales (ej. Hámster, topillos, musarañas, primates), pero las investigaciones psiquiátricas preclínicas claramente han favorecido a la rata como modelo animal de elección (Deussing,2006).

La prueba de comportamiento más ampliamente utilizada para el ensayo de conducta depresiva y antidepresiva es el **test de la natación forzada**, también conocido como test de Porsolt. Este test basado en la conducta de desesperanza fue

desarrollado por Porsolt y colaboradores en 1977 (Porsolt et al., 1977; Porsolt et al., 1978) como un modelo en roedores para predecir la eficacia clínica de sustancias antidepresivas (Bogdanova et al., 2013).

El procedimiento básico del test de la natación forzada implica dos sesiones con los animales puestos en un cilindro que contiene agua a 25°C, del cual no se pueden escapar. La primera sesión es un pre test de 15 minutos que es seguido 24 horas más tarde por un test de 5 minutos en la segunda sesión. El pre test es un estresor el cual induce en el animal un estado de desesperanza (Porsolt et al., 1978) o una estrategia pasiva de afrontamiento del estrés (West, 1990), dado que el animal realiza mas inmovilidad conforme va progresando la sesión. La postura típica de inmovilidad es caracterizada por mantenerse el animal flotando en el agua realizando sólo los movimientos necesarios para mantener la nariz sobre la superficie del agua. El tiempo de inmovilidad es la primera medida de este test (Castagne et al., 2009). Se ha demostrado que un amplio rango de fármacos antidepresivos inyectados entre el pre test y el test decrece la duración de inmovilidad en esta prueba (Cryan et al., 2005).

En 1996, Detke y colaboradores añadieron la evaluación de las conductas activas durante el test de la natación forzada, describiendo la conducta de escalada, como movimientos verticales contra las paredes del tubo; la conducta de natación, como movimientos horizontales a lo largo de la superficie del agua; y la conducta de buceo. Esta versión modificada de evaluar el test facilita la diferenciación entre los grandes grupos de antidepresivos en ratas. Los tratamientos antidepresivos cuya diana era la NA incrementaba la conducta de escalada en el test, mientras que los fármacos que influenciaban la neurotransmisión serotoninérgica aumentaba la conducta de natación (Detke y Lucki, 1996).

Algunos ejemplos de fármacos antidepresivos probados en el test de la natación forzada son el inhibidor de la recaptación de 5HT (SSRI) Citalopram, que es uno de los primeros fármacos de esta clase introducidos en el mercado y que es usado rutinariamente como antidepresivo en clínica (Cipriani et al., 2009, 2012). Otro fármaco SSRI como es la Fluoxetina administrada de forma crónica revierte la conducta depresiva, decreciendo la inmovilidad e incrementando la conducta de escape en rata en el test de la natación forzada (Chau et al., 2011), observando efectos similares inyectando el fármaco directamente en el núcleo del Rafe (Baudry et al., 2010). El fármaco Moclobemida, un inhibidor de la MAO-A, administrado de forma aguda también alivia la conducta depresiva en ratones por la reducción del tiempo de inmovilidad en el test de la natación forzada (Bourin et al., 1998). Ejemplos como estos apoyan la idea que la prueba de la natación forzada tiene validez farmacológica como modelo de depresión.

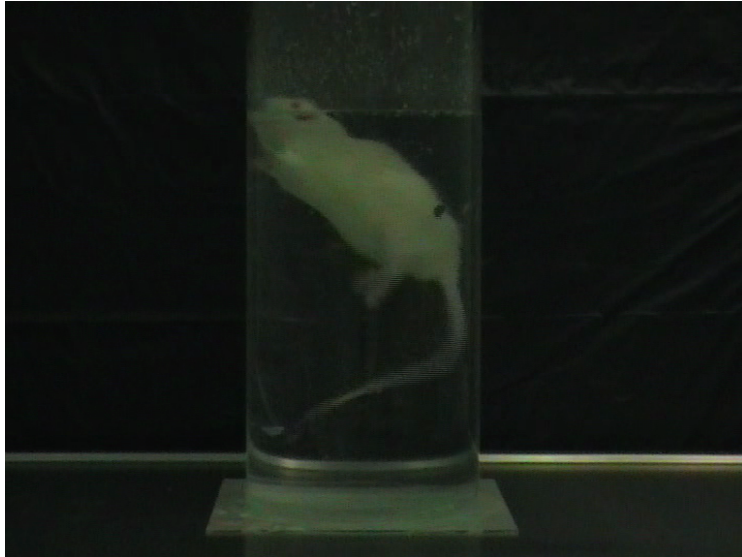


Figura 1. Fotografía de una rata durante la realización del test de la natación forzada. El animal, en el momento de la fotografía, estaba realizando conducta de inmovilidad.

La medida de la conducta de ansiedad en animales es una de las posibles vías para obtener información sobre el estado emocional del individuo. La ansiedad, tanto en humanos como en animales de laboratorio, no es un fenómeno unitario ya que incluye la ansiedad innata y la situación evocada o la experiencia relacionada con la expresión de la ansiedad, y cada uno es inseparable del otro. Se han desarrollado varios modelos comportamentales, denominados modelos animales de ansiedad, para ensayar los parámetros comportamentales que indican ansiedad (Charney, 2006).

Griebel en 1993 propuso distinguir los modelos animales de ansiedad en dos categorías, los basados en respuestas incondicionadas o innatas y los basados en respuestas condicionadas o aprendidas (Griebel et al., 1993). La primera categoría se subdivide en cuatro grupos basados en conductas exploratorias, sociales, reacciones somáticas y otros como el test de enterramiento. Los modelos condicionados o aprendidos se agrupan en test como el test de Vogel u otros como la **evitación pasiva**, donde participan núcleos como el hipocampo o la corteza prefrontal medial ya que al animal se le entrena para producir una respuesta determinada (Mikeda et al., 1984; Charney, 2006).

Los más frecuentemente utilizados son los modelos de ansiedad incondicionada, donde el animal es expuesto a un nuevo ambiente representado por el aparato del test. Este nuevo ambiente consiste en un compartimento aversivo o no aversivo. El indicador del nivel de ansiedad es el comportamiento del animal hacia el compartimiento aversivo. Uno de los test de ansiedad incondicionada más utilizados en la actualidad (Karakas et al., 2011) es el **test del campo abierto** (Hall, 1934; Walsh, 1976), donde el compartimento aversivo es el centro del aparato ya que las ratas son “agorafóbicas” en tanto que evitan los espacios abiertos de forma natural, siendo el área de la prueba muy amplia en relación al entorno que prefieren estos animales (Rodgers, 1997; Prut y Belzung, 2003). Por tanto se estudia la reacción del animal al ser expuesto a un estímulo estresante, en este caso un espacio extraño y desprotegido. Dada su tendencia a huir de espacios abiertos, los animales en la situación del campo abierto muestran una preferencia innata por la periferia de la caja (denominada tigmotaxia e interpretada como un comportamiento de ansiedad) en comparación con el área central (Prut y Belzung, 2003).

Otro test de ansiedad incondicionada es el test del **laberinto elevado en cruz** (Pellow, 1986) que está basado en un conflicto entre la tendencia de los animales a explorar nuevos entornos y las propiedades aversivas hacia los espacios abiertos y elevados (Pellow, 1986; Seillier et al., 2011). Los roedores, cuando se enfrentan a la elección entre áreas protegidas por paredes y áreas desprotegidas abiertas, prefieren explorar y permanecer en las áreas cerradas. Las medidas espaciotemporales aceptadas como índices indicadores de ansiedad son el registro de las entradas o el tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

Estos test han mostrado ser muy útiles en el estudio del comportamiento de ansiedad incondicionada por su correlato farmacológico ya que en el caso del campo abierto, fármacos clínicamente efectivos como es el caso de agonistas benzodiazepínicos de los receptores GABA tipo A, como el diazepam, o el agonista parcial de los receptores de serotonina 5HT_{1A}, Buspirona, muestran un aumento significativo del tiempo y número de entradas en la parte central del campo abierto (Siemiatkowski et al., 2000; Prut y Belzung, 2003). O en el caso del laberinto elevado en cruz, donde los agonistas del receptor GABA tipo A (Benzodiazepinas) reducen la evitación de los brazos abiertos (Handley y Mithani, 1984), o fármacos como el agonista de los receptores 5HT_{1A}, 8-OH-DPAT, también muestra un patrón ansiolítico en esta prueba (Lee y Rodgers, 1991; Zhang et al., 2010).

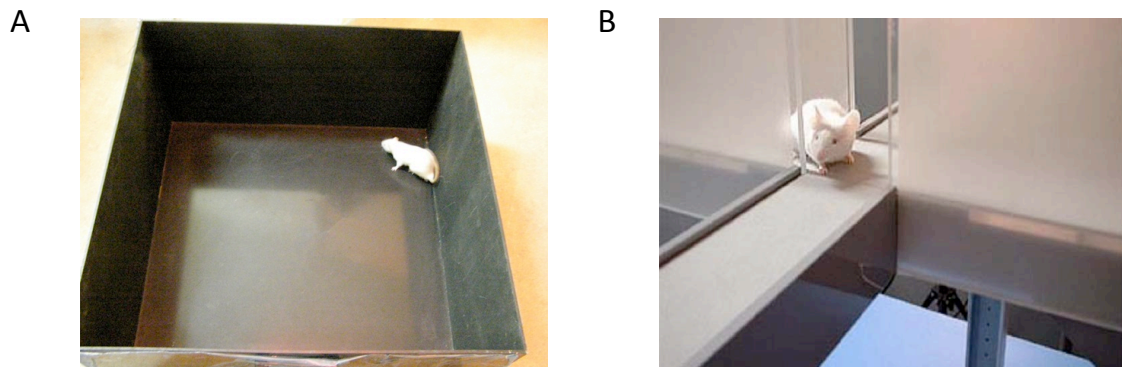


Figura 2. Imágenes donde se puede ver un ejemplo del animal en el aparato de campo abierto (A) y el laberinto elevado en cruz (B).

2. Circuitos neuronales implicados en la depresión.

Mientras muchas regiones cerebrales han sido implicadas en la regulación de las emociones, tenemos un conocimiento muy rudimentario de los circuitos neurales implicados en el estado de ánimo normal y las alteraciones del estado del ánimo que son el sello de la depresión. El sistema límbico fue identificado y jugó un papel importante a principio de los años 30 y en 1937 Papez describió el “sistema de las emociones”, la mayor ruta del sistema límbico, conectando un grupo de estructuras cerebrales que rodean el tronco cerebral (Giro cingulado, hipocampo, hipotálamo y núcleo talámico anterior). El entendió este circuito como una ruta funcional de comunicación entre las estructuras anteriores que permiten el control cortical de las emociones, así como con un papel en el almacenamiento de la memoria (Palazidou, 2012).

En ausencia de tecnología apropiada, muchos estudios para dilucidar las conexiones entre las estructuras cerebrales y, comportamiento y experiencias humanas se limitó a observaciones clínicas de los efectos de enfermedades neurológicas localizadas como golpes, tumores etc. La aparición de las técnicas de neuroimagen, como la resonancia magnética (MRI), la tomografía por emisión de positrones (PET) o la resonancia magnética funcional (fMRI), establece la importancia de los neurocircuitos de las emociones (Palazidou, 2012).

Estudios realizados mediante neuroimagen en humanos indican que muchas regiones cerebrales median los diversos síntomas de la depresión, ya que existen cambios en el flujo sanguíneo en varias áreas cerebrales incluyendo regiones de la corteza prefrontal y cingulada, hipocampo, estriado, amígdala y tálamo entre otras (Drevet, 2001; Liotti y Mayberg, 2001). De forma similar, estudios anatómicos en

cerebros de pacientes deprimidos, obtenidos en autopsias, han mostrado anomalías en muchas de estas regiones (Zhu et al., 1999; Rajkowska, 2000; Manji et al., 2001; Drevets, 2001).

El conocimiento de la función de estas áreas cerebrales en condiciones normales sugiere el aspecto en el que puede contribuir en la depresión. El neocortex y el hipocampo pueden mediar los aspectos cognitivos de la depresión, así como el deterioro de la memoria y sentimiento de inutilidad, desesperación, culpa, muerte y suicidio. El estriado (en particular el núcleo Acumbens (NAc)), la amígdala y áreas relacionadas, son importantes en la memoria emocional, y podrían mediar la anhedonia, ansiedad y la poca motivación, muy predominante en muchos pacientes. Los denominados síntomas neurovegetativos como, poco sueño, apetito y energía, así como un bajo interés sexual y en otras actividades placenteras pueden estar relacionadas con el hipotálamo. Estas regiones cerebrales operan en una serie de circuitos paralelos que interaccionan entre sí y que pueden formular un circuito implicado en la depresión (Figura 3) (Nestler et al., 2002).

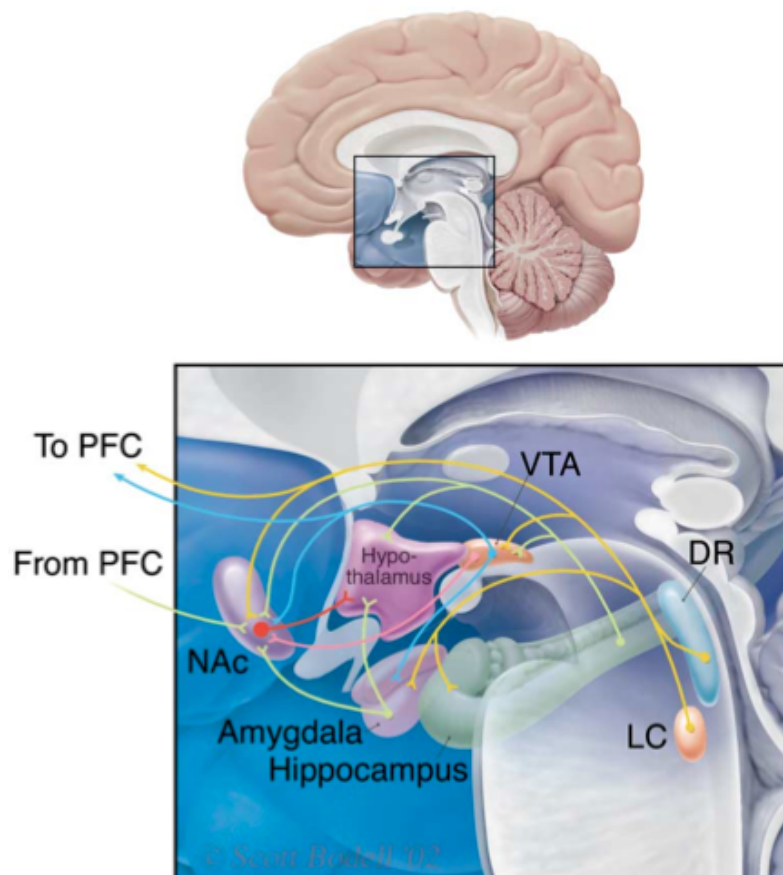


Figura 3. Circuitos neurales implicados en la depresión. La figura muestra de una forma muy simplificada un resumen de los circuitos cerebrales que pueden contribuir a los síntomas depresivos. Dorsal Rafe (DR), Locus Coeruleus (LC), Área tegmental ventral (VTA), Núcleo acumbens (NAc), Corteza prefrontal (PFC). Modificado de Nestler et al., 2002.

2.1 Núcleos del Rafe

Los núcleos del Rafe son una colección de neuronas con unos límites citoarquitectónicos pobremente definidos. Estas se encuentran en la línea media a lo largo de la extensión rostrocaudal del tronco cerebral, tanto en animales como en humanos (Hornung, 2003). En 1964 Dahlström y Fuxe, usando la técnica de histofluorescencia de Falck-Hillarp, observaron que la mayoría de los somas de las células serotoninérgicas se encontraban en estos grupos de neuronas que forman los núcleos del Rafe (Dahlström y Fuxe, 1964). Se describieron nueve grupos de células que contenían cuerpos celulares de neuronas serotoninérgicas, denominándose como B₁-B₉ (Dahlström y Fuxe, 1964). Sin embargo, no todos los somas de células serotoninérgicas se encuentran en los núcleos del Rafe y no todos los cuerpos celulares del Rafe son Serotoninérgicos (Descarries et al., 1982; Hensler, 2006).

El mayor grupo de células serotoninérgicas es el B₇ seguido por un grupo mas pequeño de células serotoninérgicas que es el B₆. Los grupos B₆ y B₇ se consideran un mismo núcleo llamado Rafe dorsal. Otro grupos prominentes de cuerpos de células serotoninérgicas son el B₈ y B₅, los cuales corresponde con el Rafe mediano. El grupo B₉ forma una extensión lateral de Rafe mediano. Los otros núcleo del Rafe, B₁-B₄, se encuentran situados más caudalmente y contienen un reducido número de células serotoninérgicas, las cuales proyectan sus axones hacia el tronco cerebral y la médula espinal (Hensler, 2006; Lesch y Waider, 2012).

Las proyecciones serotoninérgicas ascendentes que inervan las regiones anteriores del cerebro, incluyendo las áreas límbicas, parten primordialmente del Rafe dorsal, Rafe mediano y del grupo B₉ (Parent et al., 1981; Kohler y Steinbusch, 1982; Hensler, 2006).

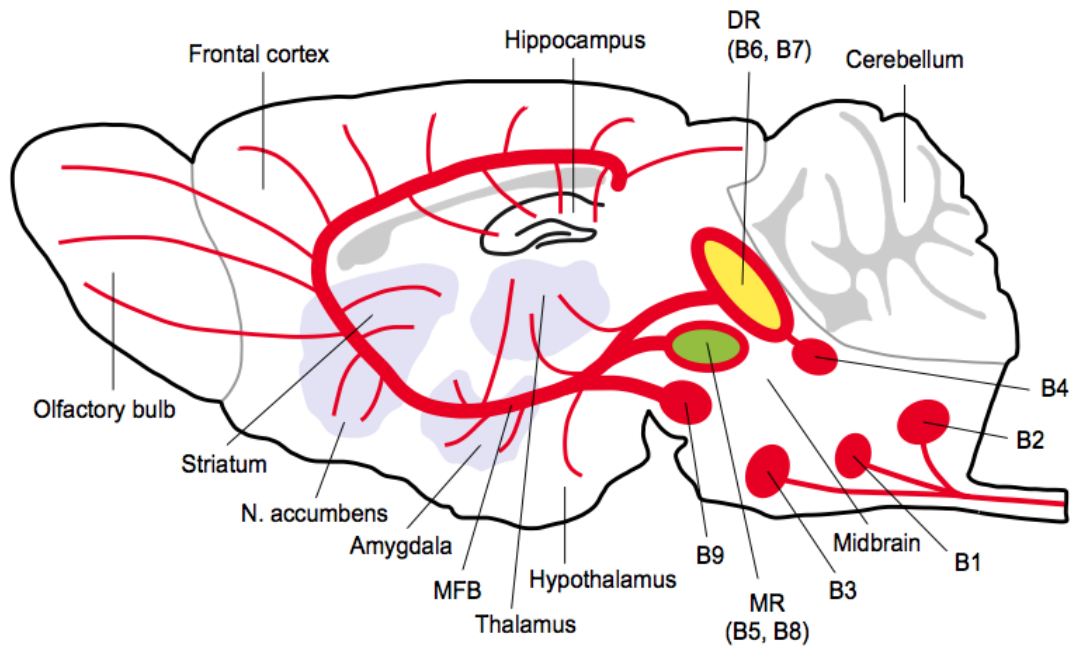


Figura 4. Esquema del sistema Serotoninérgico en roedores. Los somas de las células serotoninérgicas se organizan en nueve grupos, B1-B9. Los más caudales (B1-B3) proyectan hacia la médula, mientras los más rostrales representan los principales núcleos del Rafe, el Rafe dorsal (B6,B7, Amarillo) y el Rafe mediano (B5, B8, Verde) los cuales proyectan hacia las zonas anteriores del cerebro. DR, Rafe dorsal; MR, Rafe mediano; MFB, Haz medial frontal. Modificado de Lesch y Waider, 2012.

Dentro de los núcleos del Rafe existen conexiones entre los distintos grupos de células, como conexiones entre el núcleo del Rafe dorsal con el Rafe mediano (Hensler, 2006) o la existencia de sinapsis serotoninérgicas dendro-dendriticas en el mismo Rafe dorsal, sugiriendo la interacción local entre neuronas serotoninérgicas en este núcleo (Descarries et al., 1982; Hensler, 2006). Estas conexiones entre núcleos del Rafe o incluso entre las células del mismo núcleo del Rafe dorsal tienen relevancia fisiológica y farmacológica, ya que la liberación de 5HT en los alrededores de los somas de las células serotoninérgicas esta regulada por los autorreceptores somatodendriticos (Hensler, 2006).

Núcleo del Rafe Dorsal

El **Rafe dorsal** es un núcleo bilateral, heterogéneo, localizado en la parte ventral de la sustancia gris periaqueductal. Se ha estimado que el Rafe dorsal en humanos contiene aproximadamente unas 235.000 neuronas, de las cuales aproximadamente el 70% contienen como neurotransmisor mayoritario Serotonina (Michelsen et al., 2007).

El Rafe dorsal se divide en subregiones basado en criterios citoarquitectónicos, llamadas, dorsal (DRD), ventral (DRV), ventrolateral (DRVL), caudal (DRC) e interfascicular (DRI) (Baker et al., 1990; Michelsen et al., 2007). Además, se han observado cuatro tipos de neuronas en este núcleo, pequeñas y redondas, medianas y fusiformes o bipolares, grandes y fusiformes, y muy grandes y multipolares (Steinbusch, 1984; Lowry et al., 2008), aunque las células medianas se encuentran uniformemente por todos los núcleos, otros tipos celulares se encuentran preferentemente en subregiones específicas (Lowry et al., 2008).

Aunque como hemos comentado antes, una gran mayoría de las neuronas del Rafe dorsal son serotoninérgicas, a mediado de los 70, se descubrieron neurotransmisores adicionales en este núcleo, como son la Dopamina, el GABA, el Glutamato y el Oxido Nítrico. Además se demostró la presencia de diversos neuropéptidos como el Neuropéptido Y (NPY), la Sustancia P, la Encefalina y la Galanina (Michelsen et al., 2007).

El neuropéptido Galanina está presente en el núcleo del Rafe dorsal como se ha comprobado mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicas (Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Jacobowitz et al., 2004). Además, la Galanina colocaliza con la Serotonina en este núcleo. De hecho, se ha descrito que una gran proporción de las neuronas serotoninérgicas del Rafe dorsal también contienen Galanina (Melander et al., 1986). La Galanina está también presente en fibras serotoninérgicas en áreas diana del Rafe dorsal como la corteza (Skofitsch y Jacobowitz, 1985) o en el hipocampo, concentrándose en la capa granular del giro dentado ventral (Melander et al., 1986).

Las fibras que surgen del núcleo del Rafe dorsal son característicamente muy finas y con pequeñas varicosidades, las cuales son granulares o fusiformes. Este tipo de fibras se las denominan de tipo D. Esto contrasta con las fibras que provienen del Rafe mediano, las cuales presentan varios grosores y las varicosidades son grandes y esféricas, denominándose fibras de tipo M. Estas diferencias en las fibras de las células serotoninérgicas se muestra mediante la inmunorreactividad a la serotonina, lo que puede ayudar a conocer el origen de los axones en preparaciones inmunohistoquímicas (Kosofsky y Molliver, 1987; Michelsen et al., 2007).

El núcleo del Rafe dorsal presenta proyecciones ascendentes y descendentes, las cuales, muchas de ellas son compartidas con otros núcleos del Rafe. Las principales vías descendentes que llegan al Rafe dorsal son, la vía bulboespinal, la vía cerebelar, la vía propriobulbar y una vía que inerva el locus coeruleus, el núcleo dorsal tegmental y el Rafe pontino (Michelsen et al., 2007).

Dentro de las vías ascendentes, las cuales tienen como diana áreas del cerebro anterior, hay tres principales, la vía ascendente dorsal, la vía medial y la vía ventral (Michelsen et al., 2007) (Figura 5).

La **vía ascendente dorsal**, parte de la zona medial y caudal del Rafe dorsal e inerva el estriado y el globo pálido (GP)(Anden et al., 1965; Michelsen et al., 2007).

La **vía ascendente medial**, proyecta primordialmente sobre la sustancia negra (SN), con proyecciones que parten de la zona más rostral del Rafe dorsal (Imai et al., 1986; Michelsen et al., 2007).

A través de la **vía ascendente ventral** , el Rafe dorsal inerva muchas áreas. Esta vía también contiene fibras de otros núcleos del Rafe, especialmente del Rafe mediano (Michelsen et al., 2007). Los principales objetivos de esta vía son el hipotálamo, el tálamo, la habenula, el septum, la amígdala (AM), la corteza (CTX) y el bulbo olfatorio (OB) (Michelsen et al., 2007). También existen proyecciones del Rafe dorsal sobre el hipocampo (HPC) (Segal y Landis, 1974; Azmitia y Segal, 1978; Mamounas et al., 1991; Michelsen et al., 2007). Estas proyecciones eferentes parten predominantemente de la parte más caudal del Rafe dorsal y consta de neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas (Kohler y Steinbusch, 1982; Michelsen et al., 2007).

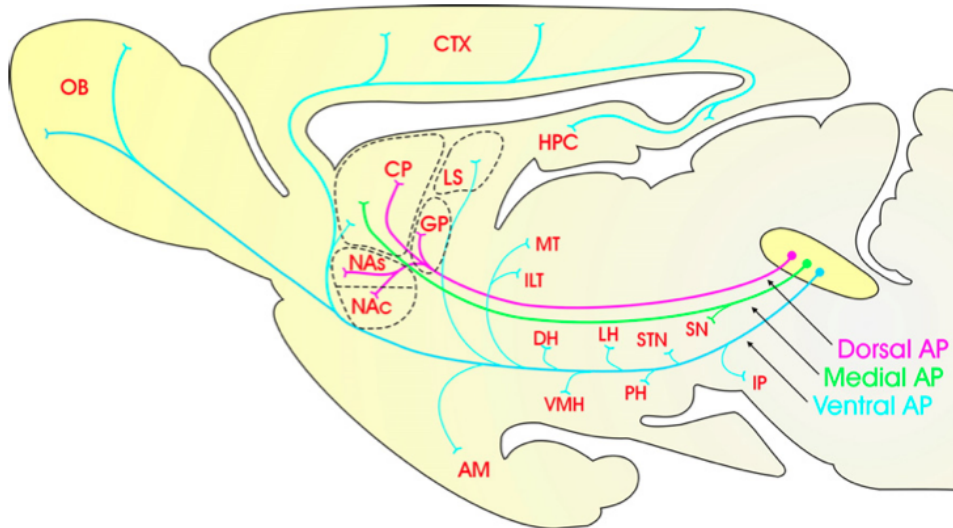


Figura 5. Esquema de las vías ascendentes (AP) del Rafe dorsal. Detalles en el texto. Modificado de Michelsen et al., 2007.

2.2 Hipocampo

El término hipocampo (derivado del griego caballo de mar) fue acuñado durante el siglo XVI por el anatomista italiano Arantius (1587), el cual consideraba la forma tridimensional del hipocampo humano como la reminiscencia de una criatura marina (Walther, 2002; Amaral y Lavanex, 2007) (Figura 6).

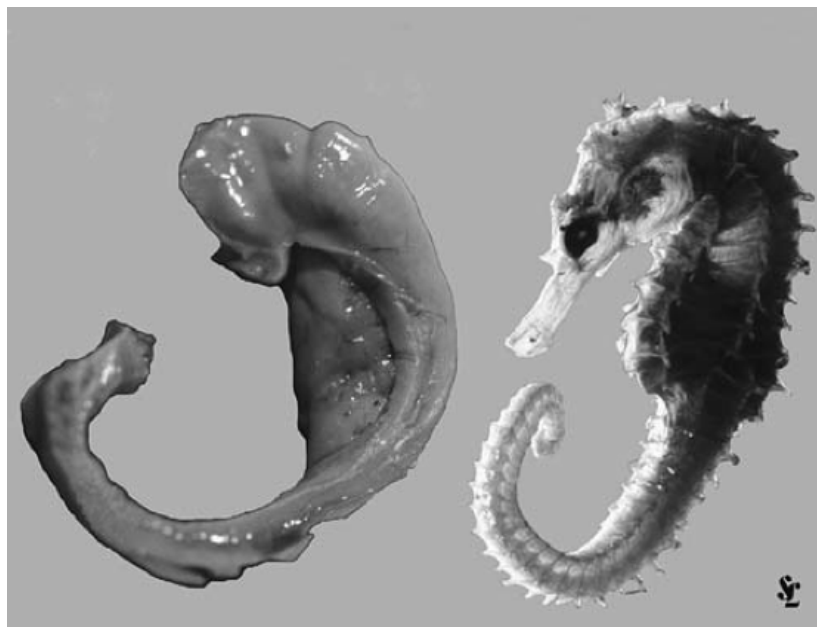


Figura 6. Hipocampo humano diseccionado (Izquierda) y comparado con un ejemplar de caballito de mar *Hippocampus leia* (derecha). Modificado de Andersen et al., 2007.

El hipocampo forma parte de la llamada formación hipocámpal, estructura compleja, que en rata presenta forma de C. Esta a su vez, está formada por cuatro regiones corticales, donde se incluyen el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho (el cual se subdivide en tres regiones CA1, CA2 y CA3), el complejo subicular (que a su vez se divide en subiculum (S), presubiculum (PrS) y parasubiculum (PaS) y la corteza entorrinal (EC) (Amaral y Witter, 1989) (Figura 7).

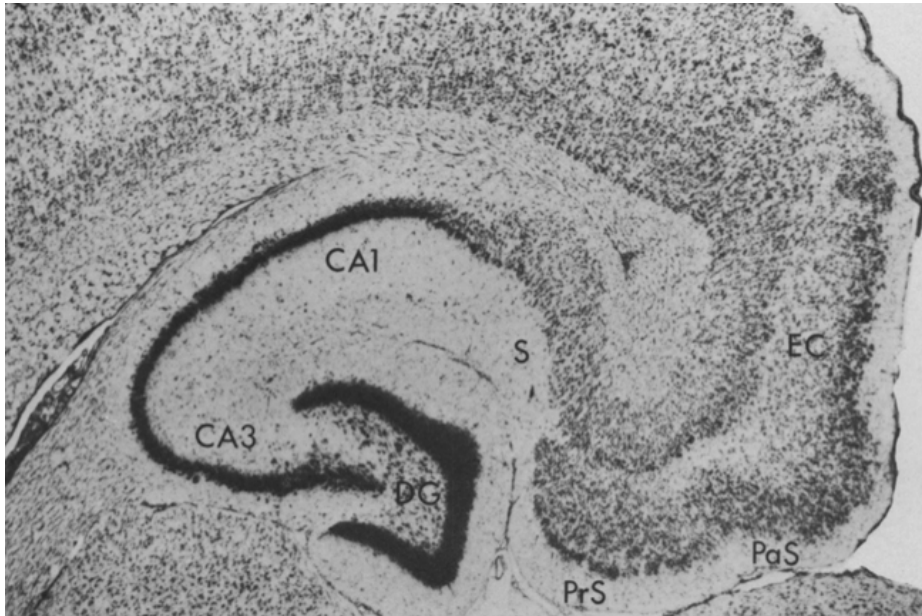


Figura 7. Formación hipocámpal en una sección horizontal de cerebro de rata teñida con tiónina. CA1 y 3: cuerno de Amón 1 y 3; GD: Giro dentado; S: Subiculum; PrS: Presubiculum; PaS: Parasubiculum; EC: Corteza entorrinal. Modificado de Amaral y Witter, 1989.

Ya Ramón y Cajal en 1893 describió la estratificación de varios sistemas aferentes y dibujó una distinción entre células con axón largo y corto en el hipocampo (Figura 8A). Estas observaciones indicaba que las neuronas hipocámpales podrían influenciar una gran cantidad de células diana y áreas. Tras la definición de sinapsis en 1897, Ramón y Cajal se fijó en la implicación funcional que podía tener la laminación, y llegó a sugerir un circuito funcional en el hipocampo, cuyas muchas de sus características han resistido el paso del tiempo (Andersen et al., 2007). Cuarenta años después, el discípulo de Ramón y Cajal, Lorente de Nó (1934) construyó sobre el trabajo de Cajal un extenso análisis de los tipos celulares del hipocampo y sus patrones axonales y dendríticos, describiendo detalladamente redes de neuronas interconectadas (Figura 8B). Según esto, dividió el hipocampo en unas regiones bien definidas que acuñó como Cuerno de Amón 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3) (Amaral y Lavanex, 2007).

Las conexiones neuronales descritas en estudios clásicos, pueden resumirse de la siguiente manera. Las regiones de la formación hipocampal se encuentran vinculadas mediante una única y gran conexión unidireccional principalmente excitatoria, también denominada “Circuito Trisináptico” (Andersen et al., 1971; Amaral y Witter, 1989; Amaral y Lavanex, 2007) (Figura 8C). El Giro dentado recibe su mayor input de la corteza entorrinal, a través de la llamada *vía perforante*. Las células granulares del Giro dentado proyectan a través de las llamadas *fibras musgosas* a la capa CA3 del hipocampo. Las células piramidales de la capa CA3 dirigen sus axones, conocidos como *colaterales de Schaffer* al área CA1. Finalmente las neuronas del CA1 proyectan la información a la corteza entorrinal de forma directa o a través del subiculum (Amaral y Witter, 1989; Amaral y Lavanex, 2007).

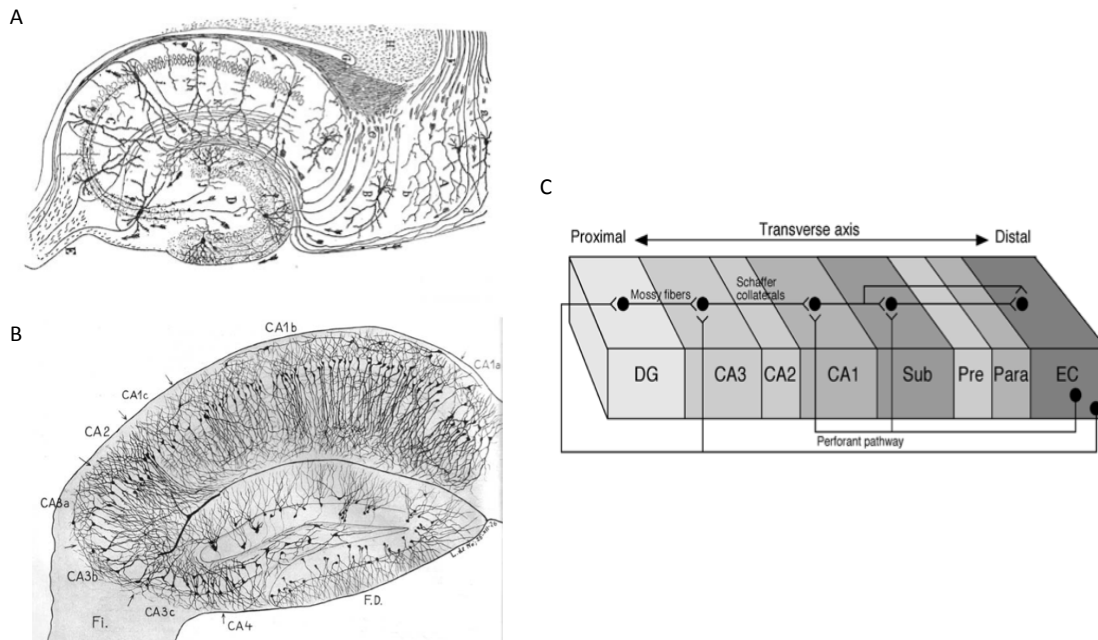


Figura 8. (A) Dibujo de Santiago Ramón y Cajal sobre el hipocampo del libro *Histologie de Systeme Nerveux* 1911 (modificado de Andersen et al., 2007). (B) Diagrama de Rafael Lorente de Nó, sobre los tipos celulares y las subdivisiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo (modificado de Andersen et al., 2007). (C) Proyecciones a lo largo del eje transverso de la formación hipocampal (Circuito Trisináptico) (modificado de Amaral y Lavanex, 2007).

Aunque la formación hipocampal esta compuesta por distintas regiones, como hemos explicado anteriormente, en esta tesis nos centraremos en el Giro dentado y en el Hipocampo propiamente dicho.

El **Giro dentado** es una estructura trilaminar con una forma característica en V o U. Está compuesto por tres capas, una más superficial y prácticamente libre de células denominada *Capa Molecular*. La principal capa celular del giro dentado es la *Capa Granular*, se encuentra debajo de la capa molecular y es una capa celular densa y compacta formada por de cuatro a ocho células de espesor. La capa molecular y granular presentan una estructura en forma de V o U que rodea a una región celular denominada *Capa Polimórfica o Hilus*, que representa la tercera capa del Giro dentado (Amaral y Lavanex, 2007) (Figura 7).

El principal tipo celular del giro dentado es la célula granulada, que forman mayoritariamente la capa granular. Presenta una forma de árbol cónico cuyas dendritas se dirigen hacia la capa superior, la capa molecular (Amaral y Lavanex, 2007). La capa molecular está ocupada principalmente por dendritas de las células granulares, y células polimórficas así como axones y terminales axónicos de la corteza entorrinal y otras áreas, aunque se han encontrado, por lo menos, dos tipos celulares presentes en esta capa (Amaral y Lavanex, 2007). Por último, en la capa polimórfica existe una variedad de tipos de neuronas, pero se sabe poco de muchas de ellas (Amaral, 1978). El tipo celular más común es la célula Musgosa, una célula glutamatérgica que presenta un soma grande y una forma celular triangular o multipolar, cuyas dendritas se extienden por largas distancias en la capa polimórfica aunque nunca penetra en la capa adyacente CA3 (Amaral y Lavanex, 2007).

El Giro dentado recibe su mayor input de la corteza entorrinal a través de la llamada Vía Perforante (Ramón y Cajal, 1983), pero también recibe aferencias de otras áreas cerebrales como del núcleo Septal (Mosko et al., 1973; Amaral y Lavanex, 2007), áreas hipotalámicas como el área supramamilar (Magloczky et al., 1994; Amaral y Lavanex, 2007) o áreas del tronco cerebral como el Locus coeruleus (Loughlin et al., 1986; Amaral y Lavanex, 2007) y núcleos del Rafe dorsal y medial, que proyectan fibras serotoninérgicas que terminan en la capa polimórfica del Giro dentado (Conrad et al., 1974; Moore y Halaris, 1975; Köhler y Steinbusch, 1982; Vertes et al., 1999; Amaral y Lavanex, 2007), donde preferencialmente inervan neuronas GABAérgicas (Amaral y Lavanex, 2007).

El Giro dentado no presenta eferencias hacia ninguna región del cerebro salvo a la capa CA3 del hipocampo, mediante las fibras musgosas, que parten exclusivamente de las células granulares y terminan en la capa piramidal de CA3 (Blackstad et al., 1970; Claiborne et al., 1986; Amaral y Lavanex, 2007).

La estructura del **hipocampo** ya ha sido previamente descrita en esta tesis. El hipocampo se divide en tres regiones CA1, CA2 y CA3, además presenta una organización laminar donde la principal capa celular se denomina *Capa piramidal*. La capa piramidal esta herméticamente empaquetada en CA1, mientras que es más laxa en CA2 y CA3. La capa superior a la capa piramidal, es una capa relativamente libre de células denominada *Stratum oriens*, esta contiene dendritas de las células piramidales y varios tipos de interneuronas. El *Stratum radiatum* está localizado debajo de la capa piramidal y es donde se localizan las conexiones CA3 con CA1 mediante las conexiones colaterales o de Schaffer (Amaral y Lavanex, 2007).

El principal tipo neuronal en el hipocampo es la célula piramidal, la cual constituye la capa piramidal. Estas células presentan un árbol dendrítico que se extiende en el Stratum oriens, y un árbol dendrítico basal que se extiende a la fisura hipocámpal (Amaral y Lavanex, 2007). Las células piramidales de las regiones CA2 y CA3 son más heterogéneas en cuanto a la longitud de sus dendritas y organización mientras que las células piramidales de CA1 son más homogéneas y de un tamaño menor que las de CA3 (Ishizuka et al., 1995; Pyapali et al., 1998). Aunque las neuronas piramidales son las más numerosas del hipocampo, también existe un grupo muy heterogéneo de interneuronas que se encuentran dispersas a lo largo de todas las capas del hipocampo (Freund y Buzsaki, 1996).

Una de las características de la conectividad del hipocampo es que muchos de los inputs provienen de sus propias fibras, y presentan relativamente pocos inputs externos (Amaral y Lavanex, 2007). El hipocampo recibe inputs de la corteza entorrinal, esta presenta proyecciones hacia CA2-CA3 y hacia CA1, aunque estas son distintas de las anteriores (Amaral y Lavanex, 2007). Al mismo tiempo el hipocampo envía proyecciones de retorno a la corteza entorrinal, aunque se piensa que sólo parten de CA1 (Naber et al., 2001). Otros áreas en el que se presentan conexiones con el hipocampo es el neocortex y el complejo amigdalino, desde donde recibe inputs CA3 (Pitkanen et al., 2000; Amaral y Lavanex, 2007). El Septum proporciona el mayor input subcortical a CA3, al igual que con el Giro dentado. Además las células piramidales de CA1 proyectan sobre el núcleo septal (Amaral y Lavanex, 2007). Referente a las conexiones hipotalámicas, CA2 recibe inervación del área supramamilar, aunque no hay evidencias que CA2 retorne proyecciones a esta región (Amaral y Lavanex, 2007).

El hipocampo como el Giro dentado recibe inputs noradrenérgicos y serotoninérgicos del tronco cerebral. Fibras y terminales noradrenérgicos llegan del Locus coeruleus a CA3. Sin embargo, las fibras serotoninérgicas se distribuyen de forma más difusa y separada por CA3, pudiéndose observar dos tipos de fibras con características distintas (Amaral y Lavanex, 2007).

Desde el punto de vista neuroquímico, el hipocampo presenta un contenido en neurotransmisores amplio, donde se incluyen, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, GABA, y Glutamato entre otros (Swanson et al., 1987). Al mismo tiempo, se muestran una gran variedad de neuropéptidos y otros marcadores químicos para caracterizar las subpoblaciones GABAérgica de interneuronas. Dentro de los péptidos que colocalizan con GABA en las interneuronas están VIP, somatostatina, neuropéptido Y, CRF, y la Galanina entre otros (Amaral y Lavanex, 2007).

3. Neurotransmisores y Neuropéptidos implicados en la depresión.

Existe una gran variedad de sistemas de neurotransmisión implicados en la depresión, algunos, de los que ya hemos hablado en esta tesis, son el sistema Serotoninérgico, Noradrenérgico y Dopaminérgico. Otros neurotransmisores que han demostrado tener alguna implicación en la patofisiología de la depresión son, el Glutamato, el GABA y la Acetilcolina, así como diversos neuropeptidos como el CRF, la Arginina Vasopresina, la sustancia P, el Neuropéptido Y, la Neurotensina y la Galanina, entre otros (Lanni et al., 2009).

El *Glutamato* es el mayor neurotransmisor excitador en el cerebro. En el cerebro humano, las neuronas glutamatérgica proyectan hacia y desde la corteza a regiones subcorticales como el Locus coeruleus, el núcleo del Rafe y la sustancia negra, áreas donde se modulan las vías monoaminérgicas (Lanni et al., 2009). Se conoce que el funcionamiento anómalo del sistema glutamatérgico está implicado en la patofisiología de varias enfermedades incluyendo ansiedad y trastornos del estado del ánimo como la depresión (Sanacora et al., 2008; Lanni et al., 2009), donde se han observado anomalías de este sistema en plasma, suero, líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral de sujetos afectados por trastornos del estado del ánimo (Kim et al., 1982; Mitani et al., 2006; Levine et al., 2000; Francis et al., 1989; Lanni et al., 2009). De hecho, antagonistas del receptor glutamatérgico NMDA como la ketamina (Zarate et al., 2006) o la memantina (Ferguson y Shingleton, 2007) han demostrado ser efectivos en pacientes con depresión.

Otro neurotransmisor implicado en la depresión es el *Ácido Gamma-aminobutírico (GABA)*, este neurotransmisor ampliamente distribuido por el cerebro, está presente en interneuronas que modulan los circuitos neuronales noradrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos (Petty, 1995). Existen evidencias que indican que el GABA actúa como modulador de la función neuronal y procesos conductuales relacionados con el sueño, conducta sexual, dolor, actividad locomotora y estado de ánimo (Paredes et al., 1992; Sanacora et al., 2000; Krystal et al., 2002; Lanni et al., 2009), este último basado en la reducción de GABA en el líquido cefalorraquídeo y en

el plasma de pacientes deprimidos (Petty et al., 1992; Roy et al., 1991; Lanni et al., 2009).

El *sistema colinérgico* en el cerebro también aparece asociado a varias conductas alteradas, como psicosis, cambios de personalidad y depresión (Lanni et al., 2009). La Acetilcolina juega un papel relevante en la regulación neuroendocrina emocional y fisiológica ante el estrés, facilitando la liberación de corticosterona, ACTH y CRF (Lanni et al., 2009), sugiriendo una interacción entre los sistemas colinérgicos y monoaminérgicos en la regulación del estado de ánimo, ya que muchos pacientes deprimidos presentan una alteración en su sistema neuroendocrino probablemente como resultado de una prolongada respuesta al estrés (Mitchel, 1998; Nemeroff, 1998). Por tanto la depresión podría ser una manifestación de la predominancia del sistema colinérgico (Janowsky et al., 1972; Lanni et al., 2009).

Además de los neurotransmisores mencionados anteriormente, también se ha visto que algunos neuropéptidos median respuestas al estrés o están implicados en la depresión (Lanni et al., 2009) siendo estos sistemas peptidérgicos una diana terapéutica atractiva para la depresión y ansiedad (Griebel, 1999; Lanni et al., 2009).

Uno de los péptidos implicados en la depresión es el *factor liberador de corticotropina CRF*, el cual inicia la respuesta al estrés a través del eje Hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA). Este neuropéptido ha sido frecuentemente objeto de estudio en la patofisiología y tratamiento de la depresión y la ansiedad, debido a las evidencias que relacionan el estrés con un incremento en la vulnerabilidad de sufrir depresión (Brown et al., 1987; Hammen et al., 1992; Lanni et al., 2009). Uno de los mecanismos moleculares asociados con la depresión es una actividad anómala del eje HHA impulsado por neuronas que contiene CRF, las cuales comienzan a coexpresar vasopresina cuando son activadas crónicamente, lo que aumenta la acción del CRF (Pariante, 2003; Lanni et al., 2009). En pacientes con depresión se ha observado que el cortisol se encuentra incrementado durante la mañana y la tarde, mientras que individuos sanos presentan un pico en la concentración de cortisol en plasma durante la mañana. Esta anomalía en los niveles de cortisol se debe a un defecto en la regulación de la liberación del CRF (Lanni et al., 2009).

La *arginina vasopresina (AVP)* actúa sinérgicamente con CRF, como hemos comentado anteriormente, en la secreción de ACTH en condiciones fisiológicas de estrés (Aguilera y Rabadan-Diehl, 2000). El sistema vasopresinérgico consiste en células que contiene AVP en regiones hipotalámicas como los núcleos paraventricular y supraóptico así como neuronas extrahipotalámicas en sistema límbico y amígdala, y puede estar implicado en la etiopatogenia de la depresión, como demuestran estudios postmortem en pacientes con depresión (Merali et al., 2006). Estudios en

roedores muestran que neuronas del núcleo paraventricular son capaces de coexpresar CRF y AVP, y el estrés tiende a incrementar la producción de AVP (Spinedi et al., 1997).

Otro neuropéptido implicado en la depresión es la *Sustancia P (SP)*. Este péptido pertenece a la familia de las Taquikininas, y las neuronas que contienen SP se encuentran ampliamente distribuidas por el sistema nervioso central. Se ha sugerido, que la SP está implicada en la etiopatología de enfermedades mentales, incluyendo los trastornos afectivos, basándose en datos de estudios en animales y humanos (Herpfer y Lieb, 2003; Stout et al., 2001; Herpfer et al., 2007), donde existen evidencias de un incremento de SP en plasma y líquido cefalorraquídeo en pacientes con depresión (Bondy et al., 2003; Rimon et al., 1984). Además, se ha visto que el receptor NK1 se expresa en regiones cerebrales implicadas en estrés, miedo y respuesta afectiva, como hipotálamo y corteza prefrontal, además de colocalizar con neurotransmisores como la 5HT, NA y DA (Herpfer y Lieb, 2005; Sergejev et al., 1999). Se ha hipotetizado con que el bloqueo del receptor NK1 pudiera tener efectos ansiolíticos y antidepresivos, de hecho se han desarrollado antagonistas de estos receptores que han demostrado su utilidad en pacientes con depresión mayor y alta ansiedad (Kramer et al., 1998), sin embargo dejan de ejercer efectos antidepresivos en ensayos clínicos en fase III (Keller et al., 2006). Otro miembro de la familia de las Taquikininas, la neurokinina A, la cual actúa a través del receptor NK2 se está investigando por su potencial papel en la depresión y la ansiedad (Steinberg et al., 2001; Louis et al., 2008).

El neuropéptido Y (NPY) entre otras cosas modula la actividad neuronal y la función del eje HHA y está implicado en procesos cognitivos y de memoria, los cuales están desregulados en algunos trastornos psiquiátricos (Jimenez-Vazquez et al., 2000; Eaton et al., 2007; Lanni et al., 2009; Narváez et al., 2014). Algunos estudios muestran que el NPY se encuentra reducido en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con depresión (Eaton et al., 2007) o que el tratamiento con antidepresivos incrementa el NPY en el hipocampo de rata y en el líquido cefalorraquídeo en humanos (Mathé et al., 2007). Además, cuando se inyecta NPY en rata, se observa un efecto antidepresivo, que a su vez es antagonizado por bloqueadores del receptor NPY-Y1 (Mathé et al., 2007).

Otro péptido el cual se piensa que tiene un papel en la depresión es la *Neurotensina (NT)*. Este está implicado en la locomoción, recompensa, estrés y en la patofisiología de la esquizofrenia y la depresión (Geisler et al., 2006). Los efectos locomotores y de recompensa dependen de la estimulación del receptor NT-1 y el sistema dopaminérgico (Nemeroff, 1980). Aunque el papel de la NT en psicosis está bien documentada el posible papel de esta en la depresión no está muy dilucidado (Cervo et al., 1992; Lanni et al., 2009).

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio del sistema serotoninérgico, particularmente en el receptor de serotonina 5HT1A, así como en el neuropéptido Galanina, principalmente en su fragmento N-terminal 1-15, debido a las múltiples evidencias de implicación de la Galanina y del receptor 5HT1A en la depresión así como de interrelación entre ambos, por lo que describiremos en detalle este neurotransmisor y su receptor 5HT1A así como el neuropéptido GAL.

3.1 Serotonina

La 5-hidroxitriptamina (5HT, Serotonina) es una amina biógena que fue aislada e identificada en el plasma en 1948 (Rapport et al., 1948). Se localiza y sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en las neuronas serotoninérgicas del Sistema Nervioso Central (SNC) (Florez y Pazos, 1997).

La síntesis se produce a partir del aminoácido L-triptófano que proviene de la dieta y es captado por la célula. El L-triptófano una vez en la célula, se transforma mediante la enzima Triptófano-hidroxilasa, en 5-hidroxitriptófano (5-HTP), este paso es limitante en la síntesis de serotonina. Posteriormente el 5-HTP, mediante la enzima L-aminoácido-descarboxilasa lo convierte en 5-hidroxitriptamina (5HT) (Figura 9). Una vez sintetizada la 5HT, se almacena en estructuras vesiculares que las protegen de enzimas intracelulares como la monoamina oxidasa (MAO) (Florez y Pazos, 1997).

En las células serotoninérgicas del SNC, la 5HT se libera al terminal sináptico, donde, parte actúa sobre los receptores, parte difunde al espacio extracelular y parte es recaptada por la propia terminación nerviosa (Florez y Pazos, 1997). Esta recaptación puede ser inhibida por diversos fármacos como hemos visto en apartados anteriores (ej. SSRIs).

La 5HT se metaboliza principalmente por la MAO, sobre todo del subtipo A, para convertirse en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que difunde al espacio extracelular y al líquido cefalorraquídeo (Florez y Pazos, 1997).

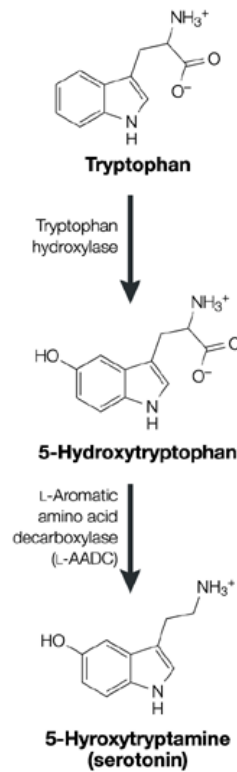


Figura 9. Síntesis de 5-Hidroxitriptamina a partir del aminoácido L-triptófano. Modificado de Goridis y Rohrer, 2002.

El sistema serotoninérgico dentro del SNC está constituido por los somas de las neuronas serotoninérgicas que se encuentran en los núcleos del Rafe y por sus proyecciones que llegan a multitud de áreas cerebrales, entre ellas las relacionadas con la depresión, como se ha explicado en apartados anteriores de esta tesis.

La serotonina, como hemos comentado en apartados anteriores, está implicada en multitud de procesos en el SNC, como en la regulación del estado de ánimo, percepción, recompensa, agresión, apetito, memoria y sexualidad entre otras cosas (Berger et al., 2009). Pero la serotonina, que esta presente a nivel periférico, también está relacionada en multitud de procesos fuera del SNC. Así se ha visto que la serotonina está implicada, entre otras cosas, en el control vascular, incluyendo vasoconstricción, presión sanguínea y función plaquetaria, también regula diferentes aspectos de la función cardiaca. Referente al sistema endocrino la serotonina está relacionada con el metabolismo y el balance de energía así como en el desarrollo de órganos endocrinos como las glándulas mamarias. Además, está implicada en la percepción del dolor y tiene un papel importante en el sistema gastrointestinal ya que

el 95% de la serotonina que se produce a nivel sistémico es liberada por las células enterocromafines del intestino (Berger et al., 2009).

La serotonina produce sus efectos a través una variedad de receptores de membrana que se encuentran, al igual que el propio neurotransmisor, tanto en el sistema nervioso central y periférico (Hoyer et al., 2002).

La clasificación de los receptores de 5HT empezó a mediados de los años 50 cuando se demostró que la respuesta funcional del íleon de cobaya era parcialmente bloqueada por morfina mientras que el resto de la respuesta era bloqueada por dibenzilina, esto hizo proponer una subdivisión de los receptores denominados D y M (Hoyer et al., 2002). Posteriormente y tras el uso de técnicas más modernas como técnicas de radioligado y técnicas moleculares se fueron proponiendo varias clasificaciones de receptores de 5HT, que finalmente concluyó con la clasificación realizada por un comité de la Unión Internacional de Farmacología (NC-IUPHAR) donde se establecían siete familias de receptores de 5HT (5HT1-5HT7), algunos de los cuales tienen varios subtipos. Seis de esos grupos de receptores de 5HT son receptores acoplados a proteína G, mientras que el receptor 5HT3 se encuentra asociado a un canal iónico (Hoyer et al., 1994; Hoyer et al., 2002; Berumen 2012).

Los *receptores 5HT1*, están compuestos a su vez por cinco subtipos de receptores (5HT1A, 5HT1B, 5HT1D, 5HT1E y 5HT1F), los cuales se acoplan preferentemente a proteínas $G_{i/o}$ produciendo una disminución en la formación de AMPc. Los receptores 5HT1E y 5HT1F, son receptores de los cuales aún no se conoce bien su papel fisiológico. Por el contrario los receptores 5HT1A, 5HT1B y 5HT1D se han demostrado funcionalmente en varios tipos tisulares de varias especies (Hoyer et al., 2002). El papel del receptor 5HT1A se desarrollará en apartados posteriores, ya que es uno de los receptores objeto de estudio de esta tesis.

Los *receptores 5HT2*, lo componen los subtipos 5HT2A, 5HT2B y 5HT2C, que preferentemente actúan sobre proteínas $G_{q/11}$ para incrementar la hidrólisis de Inositol Fosfato y elevar la concentración citosólica de Ca^{2+} . Estos subtipos de receptores de encuentran tanto a nivel central como periférico y están implicados en diversas funciones fisiológicas (Hoyer et al., 2002).

La clase de *receptores 5HT3* ha sido asignado a la superfamilia de receptores ionotrópicos regulados por ligando, basándose en sus características electrofisiológicas y de secuencia. Estos receptores se encuentran en neuronas, tanto centrales como periféricas, donde desencadenan una despolarización rápida debida a entrada de Na^+ y Ca^{2+} seguido de una posterior salida de K^+ (Hoyer et al., 2002). Es la única clase de la familia de receptores de 5HT que no ejerce su acción a través del acoplamiento a proteína G.

Por último los *receptores 5HT4, 5HT6 y 5HT7* se pueden agrupar debido a que todos se acoplan preferentemente a proteínas G_s que promueve la formación de AMPc, aunque su similitud de secuencia es muy bajo (<35%) (Hoyer et al., 2002).

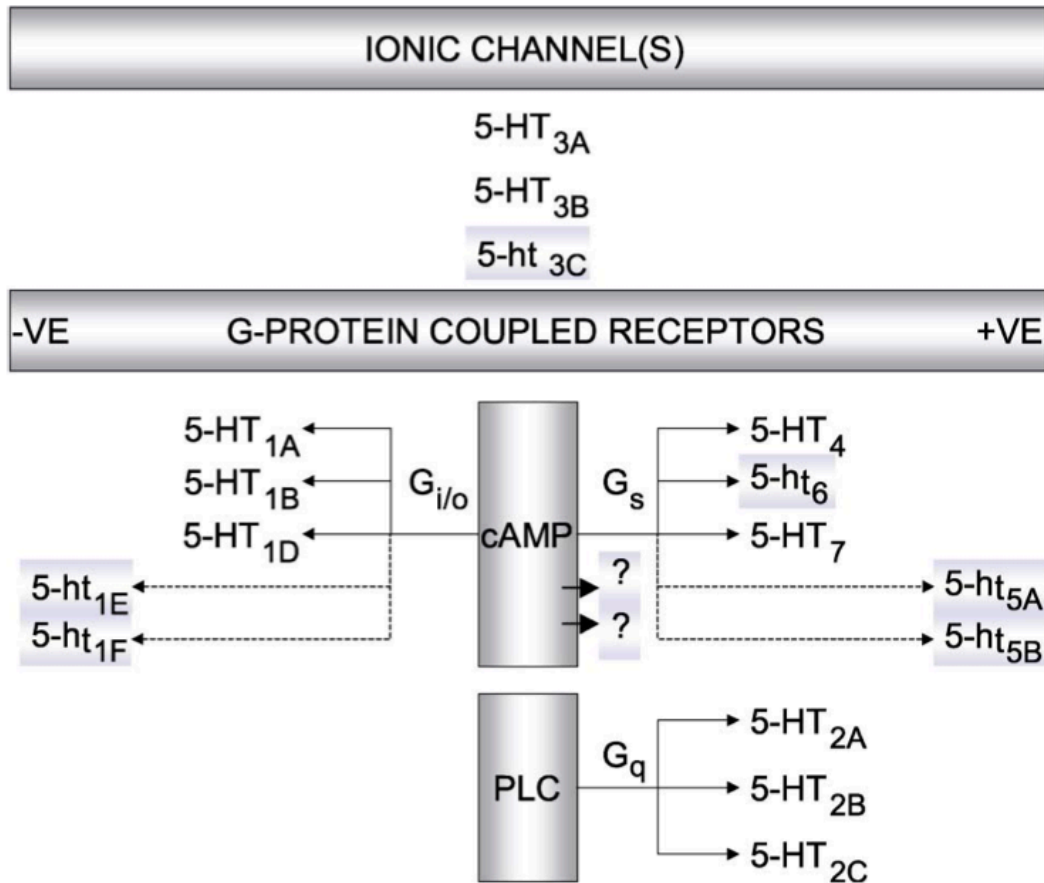


Figura 10. Representación gráfica de la clasificación de receptores de 5HT. Los receptores representados en minúscula y en cajas sombreadas indican que hay un bajo conocimiento de su función fisiológica.-VE: estímulo negativo;+VE: estímulo positivo. Modificado de Hoyer et al., 2002.

La función de los receptores de 5HT puede ser modulada, añadiendo otro nivel de complejidad, mediante la formación de complejos homo-heterodimericos de receptores (Hoyer et al., 2002; Herrick-Davis, 2013). Se ha constatado que algunos receptores de 5HT forman complejos con otros receptores de 5HT o receptores de otros neurotransmisores o neuropeptidos, como por ejemplo los heterodímeros formados por los receptores 5HT1B-5HT1D (Hoyer et al., 2002), o los formados por el receptor 5HT1A con el receptor FGFR1 (Borroto-Escuela et al., 2012), con el μ opioide (Cussac et al., 2012), con el A2a de adenosina (Lukasiewicz et al., 2007) o con los receptores de Galanina (Borroto-Escuela et al., 2010; Fuxe et al., 2012).

3.1.1 Receptor 5HT1A

El receptor 5HT1A es uno de los receptores mejor caracterizados dentro de la familia de receptores de 5HT, debido al gran número de funciones biológicas en que se encuentra implicado, así como la implicación que ha demostrado tener en distintas patologías psiquiátricas como la depresión.

Después de la identificación de los sitios de unión del receptor 5HT1A mediante técnicas de unión con radioligando (Pedigo et al., 1981; Middlemiss y Fozard, 1983; Barnes y Sharp, 1999) el conocimiento sobre la farmacología y función del receptor progresó rápidamente. Esto fue posible gracias a la temprana identificación de un agonista selectivo de los receptores 5HT1A, el (\pm)-8-hidroxi-2-(di-N-propilamino) tetralin (8-OH-DPAT) (Barnes y Sharp, 1999) y la síntesis de [3 H]-8-OH-DPAT, mediante los cuales se pudo proporcionar un primer perfil farmacológico del receptor 5HT1A (Gozlan et al., 1983; Barnes y Sharp, 1999). Estos primeros avances junto con el descubrimiento que la Buspirona y una serie de ligandos estructurales del 5HT1A presentaban características ansiolíticas y antidepresivas en la clínica (Robinson et al., 1990; Barnes y Sharp, 1999), explican, por que el 5HT1A es uno de los receptores de 5HT mejor conocidos.

Desde el punto de vista de la **estructura**, el 5HT1A fue uno de los primeros Receptores Acoplado a Proteína G (GPCRs) para el cual el cDNA y el gen fueron clonados (Kobilka et al., 1987; Raymond et al., 2001). El gen no presenta intrones y codifica para una proteína de 422 aminoácidos. Las secuencias del receptor 5HT1A en humano y en rata presenta una homología alta (88%), mientras que estas secuencias comparten baja homología con otros receptores de 5HT, como el 5HT2A (19%), 5HT2C (18%) y el 5HT1D (43%) (Kobilka et al., 1987; Fujiwara et al., 1990; Raymond et al., 2001).

El 5HT1A presenta una estructura típica de GPCR, con siete dominios transmembrana, y se encuentra orientada en la membrana plasmática con el extremo N-terminal hacia el espacio extracelular y con el extremo C-terminal hacia el interior de la célula, atravesando la membrana plasmática siete veces. Los dominios estructurales implicados en el acoplamiento del receptor a las proteínas G y en la desensibilización del mismo, por distintas proteínas quinasa, se encuentran localizados en las regiones intracelulares del receptor 5HT1A. En este sentido el segundo bucle intracelular y ciertas regiones del tercero presentan lugares claves para el acoplamiento del receptor a la proteína G y sitios de fosforilación por Proteínas Quinasa C (PKC) que conducirán a la desensibilización del receptor (Lembo y Albert, 1995; Lanfumey y Hamon, 2000). Además, presenta ciertos sitios de glicosilación localizados en el extremo N-terminal (Figura 11) (Lanfumey y Hamon, 2000).

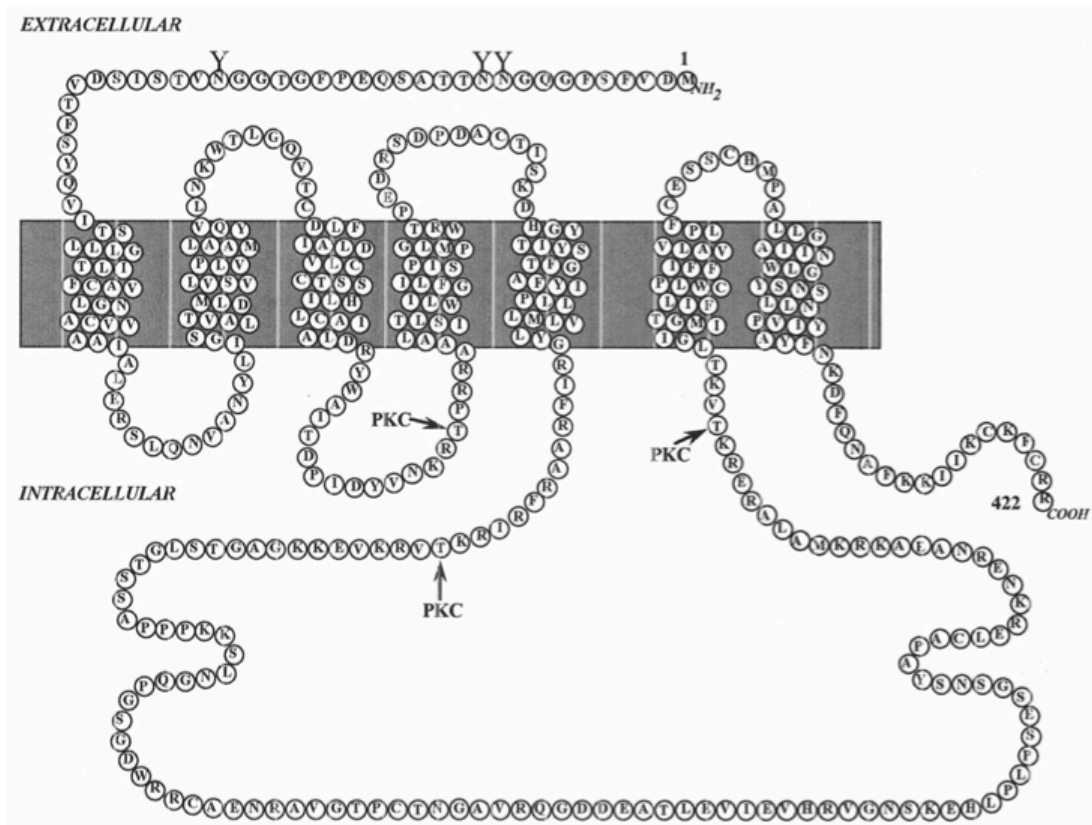


Figura 11. Organización molecular del receptor 5HT1A. Modificado de Lanfumey y Hamon, 2000.

El receptor 5HT1A ejerce su acción activando a varios mecanismos de señalización intracelular, de los cuales dos han recibido más atención, la inhibición de la actividad adenilato ciclasa, reduciendo la formación de AMPc y la apertura de canales de K^+ , por el cual se produce una hiperpolarización celular (Barnes y Sharp, 1999; Raymond et al., 2001; Artigas, 2013), aunque ambos efectos están producidos por un acoplamiento del receptor a una proteína $G_{i/o}$ (Lanfumey y Hamon, 2000). Aunque la inhibición de la actividad adenilato ciclasa es la vía de señalización más común, en las células que presentan 5HT1A del núcleo del Rafe, la inhibición de la adenilato ciclasa no parece ser la vía de señalización más importante en esa región actuando el receptor mediante la apertura de canales de K^+ (Clarke et al., 1996; Barnes y Sharp, 1999). Además diversos trabajos también han demostrado el acoplamiento del receptor 5HT1A a la estimulación de la actividad adenilato ciclasa en células del hipocampo (Shenker et al., 1983; Barnes y Sharp, 1999), sin embargo, es posible que ese efecto haya sido atribuido por error al 5HT1A, debido a su semejanza con otros

receptores, particularmente con el 5HT7 o debido al efecto de combinación de receptores (Barnes y Sharp, 1999).

La **distribución del receptor 5HT1A** en el SNC se ha estudiado utilizando distintos métodos, en primer lugar se estableció un mapeo del 5HT1A en cerebro de rata utilizando la técnica de autorradiografía, gracias a la pronta aparición del radioligando [³H]-8-OH-DPAT (Gozlan et al., 1983; Hall et al., 1985), específico para los receptores 5HT1A. Posteriormente otros radioligandos fueron sintetizados, entre ellos el [³H]-WAY 100635 (Gozlan et al., 1995), un antagonista específico del receptor y con el cual también se estudio la localización del 5HT1A en el cerebro. Estos estudios mostraron que el 5HT1A presentaba sitios de unión en el cerebro de rata, especialmente abundante en hipocampo, sobre todo en CA1 y Giro dentado, en el septum lateral, corteza entorrinal y prefrontal, y en el Rafe dorsal (Figura 12A) (Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000).

También se corroboró la localización del 5HT1A en el cerebro mediante estudios de distribución de mRNA por técnicas de hibridación *in situ*. En estos estudios se utilizaron sondas marcadas con ³²P correspondientes a porciones altamente selectivas en el tercer lazo intracelular y el extremo N-terminal del receptor 5HT1A (Lanfumey y Hamon, 1999), mostrando la localización del mRNA del receptor en la mismas zonas, previamente descritas, donde se localizaban los receptores (Figura 12B). Este dato sugiere que el 5HT1A no es transportado a largas distancias de su lugar de síntesis (Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000).

Además, debido a la generación de anticuerpos específicos contra los receptor 5HT1A, se pudo estudiar la localización subcelular del receptor. Estos anticuerpos fueron usados para un mapeo, mediante inmunohistoquímica, del 5HT1A en el cerebro de rata (El Mestikawy et al., 1990), encontrándose alta densidad de inmunotinción en áreas límbicas, sobre todo en hipocampo (CA1 y Giro dentado), septum lateral, corteza entorrinal y prefrontal, además del Rafe dorsal, coincidiendo con los datos obtenidos mediante autorradiografía (Figura 12C) (Kia et al., 1996a; Lanfumey y Hamon, 2000). Además, inmunohistoquímicas dobles, contra el receptor 5HT1A y contra 5H muestran que todas las células que presentan el receptor 5HT1A en el núcleo del Rafe dorsal son células serotoninérgicas (Sotelo et al., 1990). Posteriormente se estudió la distribución celular y subcelular del 5HT1A en el Rafe dorsal y en el hipocampo, donde en el Rafe dorsal el receptor 5HT1A se encontraba exclusivamente en el soma neuronal y en dendritas, especialmente en porciones extrasinápticas de la membrana plasmática y en el hipocampo se mostraba en somas y dendritas de células piramidales y granulares (Kia et al., 1996b; Kia et al., 1996a; Riad et al., 2000; Lanfumey y Hamon, 2000).

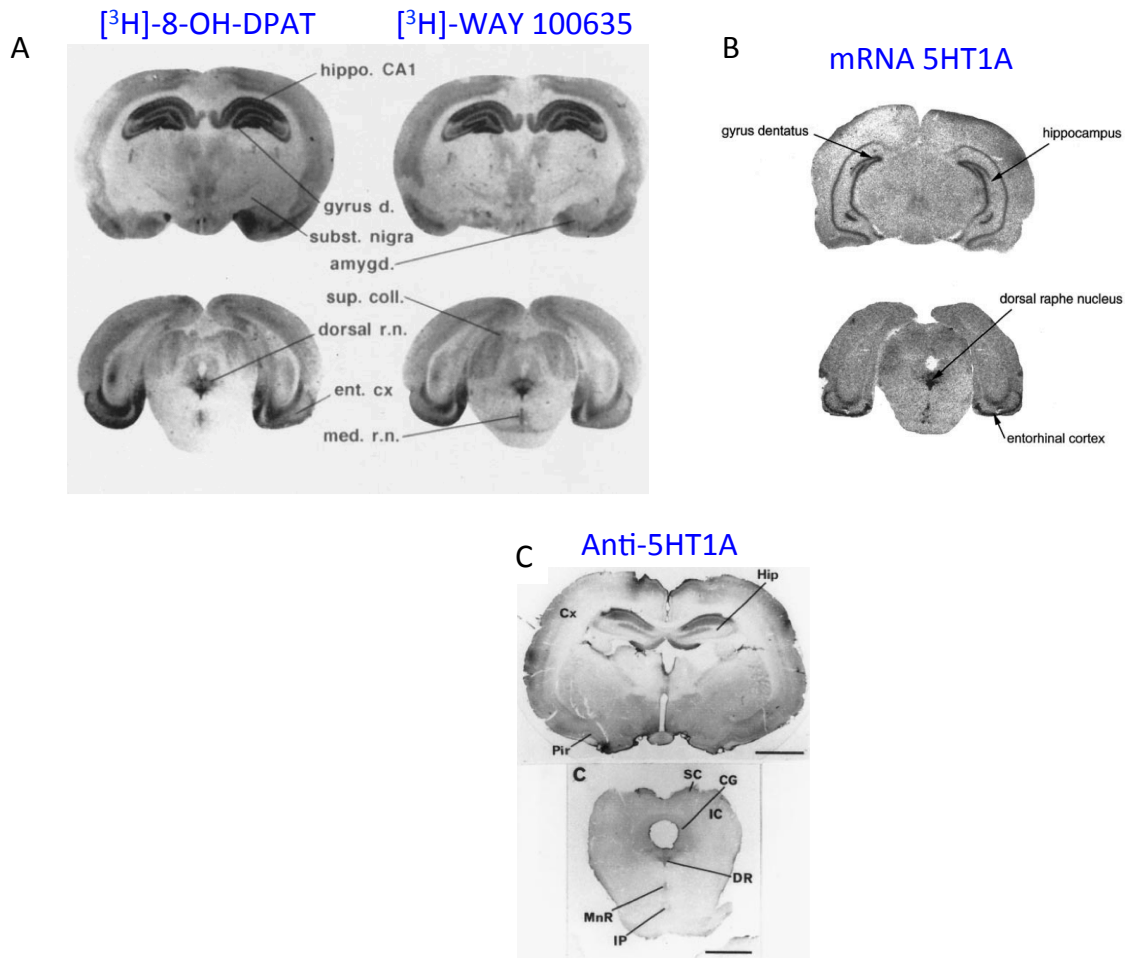


Figura 12. Distribución del receptor 5HT1A mediante autorradiografía (A), hibridación *in situ* (B) e inmunohistoquímica (C). Modificado de Lanfumey y Hamon, 2000.

Los receptores 5HT1A se encuentran en dos poblaciones principales, una en neuronas serotoninérgicas en el núcleo del Rafe donde actúa como autorreceptor somatodendrítico (presináptico) y otra en áreas donde llegan las proyecciones serotoninérgicas, principalmente en el hipocampo y otras áreas corticolímbicas, donde actúan como receptores postsinápticos (Lanfumey y Hamon, 2000; Artigas, 2013). Aunque los receptores 5HT1A actúan produciendo una hiperpolarización celular mediante la apertura de canales de K^+ , la 5HT y los agonistas 5HT1A tienen un efecto dual en la neurotransmisión serotoninérgica, ya que al actuar sobre los autorreceptores somatodendríticos, en el núcleo del Rafe, inhiben la actividad eléctrica de las neuronas serotoninérgicas y por tanto se reduce la liberación de 5HT. Por el contrario, cuando se activan directamente los receptores 5HT1A postsinápticos en el hipocampo, los agonistas imitan el efecto de la 5HT liberada, facilitando la neurotransmisión serotoninérgica (Lanfumey y Hamon, 2000).

Desde el punto de vista **farmacológico**, varios agonistas muestran selectividad por el receptor 5HT_{1A}, pero particularmente el 8-OH-DPAT, el cual actúa como agonista total en muchos sistemas, mientras que los ansiolíticos, buspirona y gepirona, y otros ligandos como el MDL 72832, entre otros, actúan como agonistas parciales del receptor (Hoyer et al., 2002). La síntesis de un antagonista selectivo para el receptor 5HT_{1A} ha demostrado ser más difícil. Uno de los antagonistas que presentan una alta afinidad por el receptor 5HT_{1A} es el WAY 100635 (Forster et al., 1995; Fletch et al., 1996).

La **función de los receptores 5HT_{1A}** es bien conocida ya que estos juegan una importante función en la regulación del sistema serotoninérgico y por tanto tienen un papel importante en la depresión (Artigas, 2013). Como hemos explicado antes, la activación de los receptores 5HT_{1A} produce una apertura de canales de K⁺ en la membrana plasmática y por tanto una hiperpolarización en la célula, la cual produce una disminución de la tasa de descargas de la célula (Artigas, 2013). Esta disminución en la tasa de descargas producidas por la estimulación del 5HT_{1A} se traduce rápidamente en una amplia reducción de liberación de 5HT en muchas regiones del cerebro, con un efecto principal en las áreas de inervación del Rafe dorsal (Hjorth y Sharp, 1991; Adell et al., 1993; Casanovas y Artigas, 1996; Artigas, 2013).

La Activación de los autorreceptores 5HT_{1A} por la 5HT endógena juega un papel fundamental en el control fisiológico de la actividad de las células serotoninérgicas ascendentes. Las neuronas serotoninérgicas muestran una tasa de descargas lenta y regular (Jacobs y Azmitia, 1992), bajo condiciones de excesivos inputs excitatorios, como los que se producen en condiciones de estrés, se produce un aumento de liberación de 5HT en los alrededores de los cuerpos celulares, que producen una activación de la respuesta inhibitoria producida por los autorreceptores 5HT_{1A}, ayudando a mantener las descargas neuronales bajas y regulares, así los autorreceptores 5HT_{1A} ayudan a mantener la homeostasis del sistema (Adell et al., 1997; Celada et al., 2001; Artigas, 2013). Este mecanismo de retroalimentación negativa va en detrimento del mecanismo de acción de algunos antidepresivos, ya que estos producen un aumento de 5HT en el Rafe (Artigas, 2013), el cual activa a los 5HT_{1A} somatodendríticos y reduce las descargas de las células serotoninérgicas y la liberación de 5HT (Blier y Montigny, 1994; Artigas et al., 1996; Romero et al., 1996; Artigas, 2013). Este efecto negativo en el mecanismo de los antidepresivos es superado con el tratamiento prolongado de estos ya que se produce una desensibilización de los 5HT_{1A} en el Rafe (Blier y Montigny, 1994; Hervas et al., 2001; Artigas, 2013), el cual permite el aumento extracelular de 5HT. Este mecanismo de retroalimentación negativa probablemente puede explicar la acción clínica lenta y retardada de los antidepresivos (Artigas et al., 1996; Artigas, 2013).

En pacientes con depresión mayor se ha comprobado la importancia de estos receptores 5-HT_{1A} presinápticos en su patología, así en estudios postmortem se observó un aumento en la densidad de los receptores presinápticos 5-HT_{1A} en los sujetos depresivos (Boldrini et al, 2008). Del mismo modo, se ha comprobado en estudios genéticos que individuos con alta densidad o elevada actividad de los receptores presinápticos 5-HT_{1A}, incluyendo aquellos con un polimorfismo funcional en el promotor de la región del gen *Htr1a*, son más susceptible a la depresión y al suicidio y responden mal a los antidepresivos (Lemondé et al, 2003; Neff et al, 2009). Los modelos animales también confirman la participación de los receptores 5-HT_{1A} presinápticos en la depresión, ratones transgénicos con una reducción moderada en estos receptores tenían comportamientos antidepresivos (Richardson-Jones et al., 2010) y la supresión aguda, mediante siRNAs, de los receptores 5-HT_{1A} presinápticos produce también efectos antidepresivos (Ferrés-Coy et al., 2013).

En cambio, como ya hemos mencionado, los receptores 5-HT_{1A} también existen a nivel postsináptico en áreas corticolímbicas y al contrario que los presinápticos parecen ser beneficiosos para el tratamiento de la depresión. El tratamiento crónico con SSRIs activa de forma tónica a los receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo (Haddjeri et al., 1998) y se ha demostrado en estudios genéticos que los receptores postsinápticos 5-HT_{1A} son suficientes para los efectos antidepresivos de los SSRIs en roedores (Richardson-Jones et al., 2011).

Existe una gran cantidad de evidencias del efecto antidepresivo que producen los agonistas del 5HT_{1A} en diferentes test de comportamiento animal (Blier y Ward, 2003; Carr y Lucki, 2011). Así, el agonista específico de los receptores 5HT_{1A}, 8-OH-DPAT, produce una disminución de la inmovilidad en el FST, indicativo de la conducta de desesperanza (Cervo y Samanin, 1987; Lucki et al., 1994; Cryan et al., 2005; Carr y Lucki, 2011), además de un incremento de la conducta activa de natación (Estrada-Camarena et al., 2006), característica que indicaría una afectación del sistema de neurotransmisión de 5HT (Detke et al., 1995; Lucki et al., 1997; Estrada-Camarena et al., 2006). Además, los efectos producidos por el 8-OH-DPAT en el FST son bloqueados mediante antagonistas del receptor 5HT_{1A} (Cryan et al., 2005; Estrada-Camarena et al., 2006).

Se ha visto que la administración crónica de SSRIs y otros antidepresivos modifican la respuesta del receptor 5HT1A postsináptico y presináptico. Estudios electrofisiológicos han mostrado que la administración crónica de antidepresivos facilitan la transmisión a través del 5HT1A en regiones límbicas como el hipocampo (Burnet et al., 1995; Chaput et al., 1991; Haddjeri et al., 1998; Shen et al., 2002; Carr y Lucki, 2011), enfatizando así en la importancia que tiene el receptor 5HT1A postsináptico en el efecto antidepresivo (Cryan et al., 2005; Carr y Lucki, 2011). Esta idea es también reforzada por el hecho que la desensibilización de los receptores 5HT1A presinápticos, producida tras la administración de varias semanas con antidepresivos, es el factor clave que permite aumentar la transmisión en áreas límbicas a través del 5HT1A postsináptico y producir una atenuación de los síntomas de la depresión (Carr y Lucki, 2011).

3.2 Galanina

El neuropéptido Galanina (GAL) es un péptido de 29 aminoácidos, 30 en humanos, que fue aislada de intestino de cerdo en 1983 (Tatemoto et al., 1983). La GAL es procesada proteolíticamente de un pro-péptido precursor de 123 aminoácidos en humanos y 124 en murinos junto con un péptido de 59-60 aminoácidos llamado Péptido Mensajero Asociado a GAL (GMAP), el cual ha sido implicado únicamente en la nocicepción en la columna vertebral (Lang et al., 2007). El péptido precursor de la GAL está codificado por un gen organizado por 6 pequeños exones abarcando sobre 6 Kb de DNA genómico (Figura 13 A) (Kofler et al., 1996). La GAL presenta un fragmento N-terminal de 15 aminoácidos común 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).

Los otros miembros de la familia de péptidos de la GAL son, el Galanin-like peptide (GALP), péptido de 60 aminoácidos originalmente descubierto como ligando endógeno de receptores de GAL presentes en hipotálamo y tracto gastrointestinal de cerdo, aunque ha sido identificado en otras especies incluyendo rata y humanos. El gen del GALP presenta una estructura muy similar al de la GAL, con seis exones y los residuos 9-21 del GALP son homólogos a los residuos 1-13 de la GAL (Figura 13 B) (Lang et al., 2007). La Alarina, péptido de 25 aminoácidos originado del corte y empalme (splicing) del mRNA del GALP es otro de los miembros de la familia de péptidos de la GAL (Figura 13 B) (Lang et al., 2007).

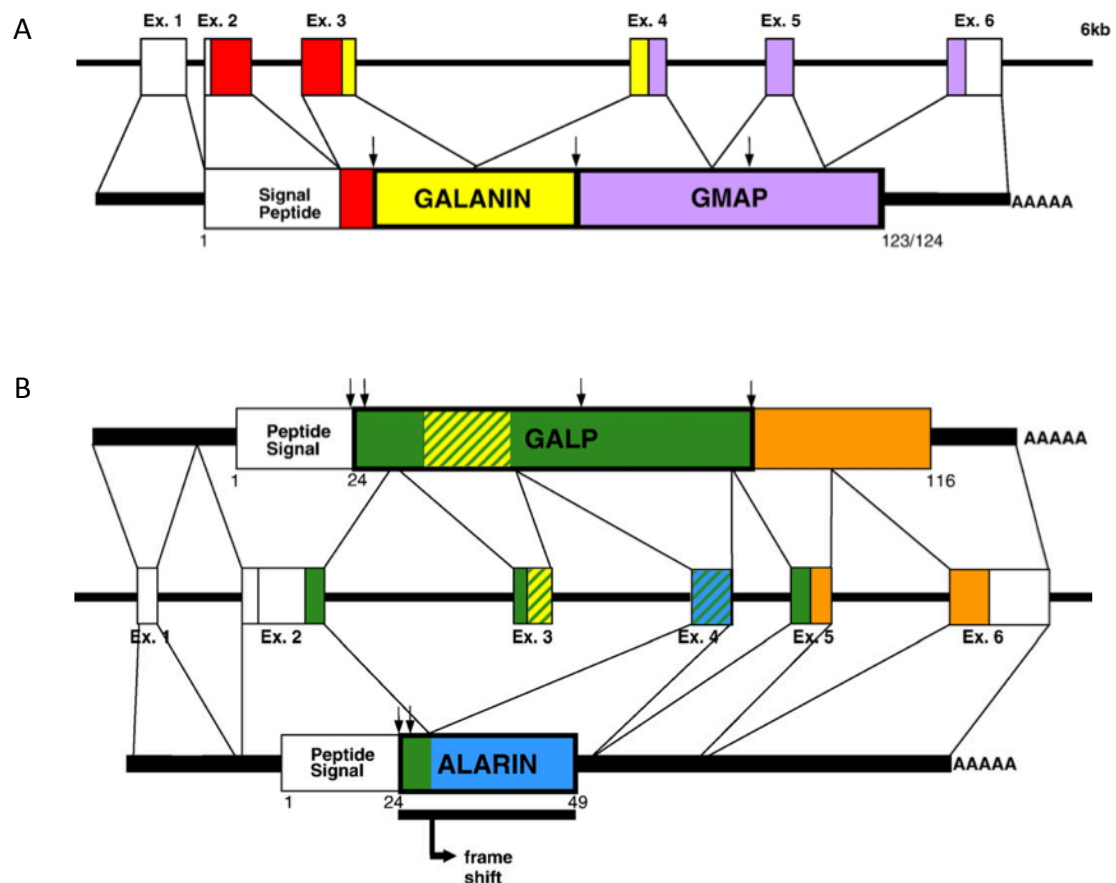


Figura 13. Organización del gen de la GAL (A) y del gen del GALP y Alarina (B). Modificado de Lang et al., 2007.

La **Galanina** está ampliamente **distribuida** por el SNC (Lang et al., 2007). Mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* se ha visto que la GAL está presente, entre otros núcleos, en zonas implicadas en la depresión, como los núcleos del Rafe, hipotálamo, amígdala, Locus coeruleus, septum, corteza cerebral e hipocampo (Figura 14) (Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Jacobowitz et al., 2004). Además la GAL coexiste en muchos de estos núcleos con neurotransmisores que a su vez están implicados en la fisiopatología de la depresión (Figura 14), como la 5HT en el Rafe dorsal, donde una gran cantidad de células serotoninérgicas contiene GAL o el hipocampo donde se han visto fibras donde coexisten GAL y 5HT, concentradas en la capa granular del Giro dentado (Melander et al., 1986), o en el Locus coeruleus, donde la GAL coexiste con la NA (Holets et al., 1988).

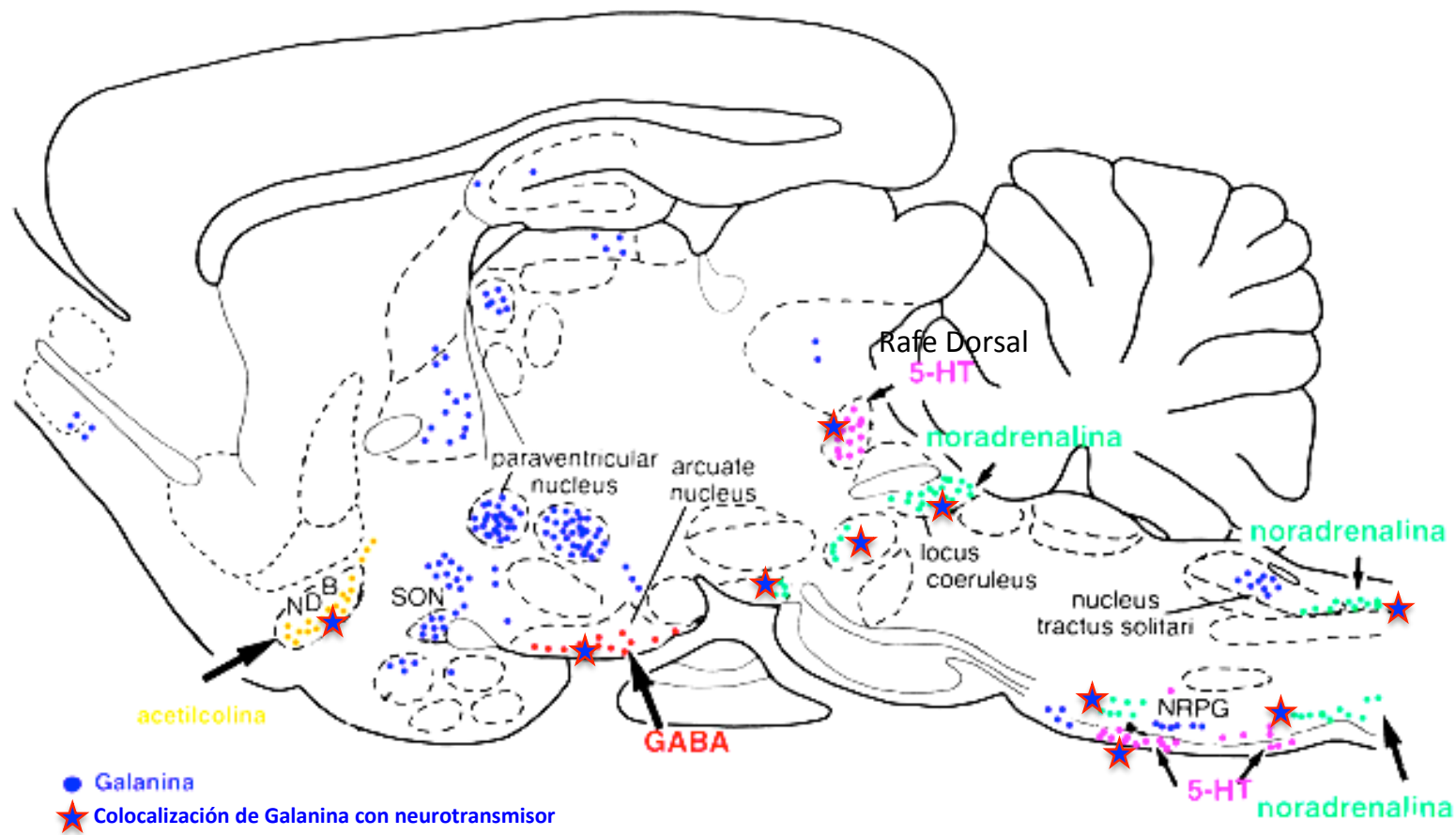


Figura 14. Distribución de GAL en una sección sagital de cerebro de ratona. Los puntos azules indican presencia de células positivas de GAL y las Estrellas indican coexistencia de GAL con otro neurotransmisor. Modificado de Bartfai et al., 1992.

La **Galanina** media su acción a través de tres subtipos de **receptores**, que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Se han identificado tres subtipos de receptores GALR1, GALR2 y GALR3 mediante clonaje molecular y caracterización farmacológica (Branche et al., 2000). GALR1 fue el primer receptor de GAL clonado y se clonó del melanoma humano de Bowes (Habert-Ortoli et al., 1994), mientras que GALR2 y GALR3 se clonaron de hipotálamo de rata (Howard et al., 1997; Smith et al., 1997; Wang et al., 1997). Mediante hibridación *in situ* y autorradiografía se ha descrito que su distribución es amplia, heterogénea, aunque a veces solapada, lo que sugiere que cada receptor puede mediar diferentes funciones en las que participa este neuropéptido (Branchek et al., 1998, 2000; O'Donnell et al., 1999; Lang et al., 2007; Mitsukawa et al., 2010).

El receptor *GALR1* contiene 346 aminoácidos, en el caso de ratas, y presenta un alto grado de similaridad con el receptor GALR1 de humanos (92%) y con los receptores GALR2 (42%) y GALR3 (38%). En su estructura existen diferentes sitios de N-glicosilación en la región extracelular y sitios de fosforilación en la región intracelular. (Figura 15A) (Branchek et al., 2000). GALR1 está acoplado a proteínas G tipo $G_{i/o}$, por tanto la activación del receptor produce la inhibición de la actividad adenilato ciclasa, que reduce la concentración de AMPc, además de mediar la apertura de canales rectificadores de K^+ , produciendo hiperpolarización neuronal. Por otro lado, produce la estimulación de la vía de las MAP quinasas (Figura 16) (Branchek et al., 2000; Lang et al., 2007).

El receptor GALR1 está ampliamente distribuido en el SNC, con una alta expresión en el hipotálamo, la amígdala, la corteza, la medula espinal y ganglios espinales, además de núcleos implicados en la depresión como son el hipocampo y el núcleo dorsal del Rafe, entre otros (Waters y Krause., 2000; Mitsukawa et al., 2010).

El receptor *GALR2* esta formado por una estructura de 372 aminoácidos, que incluye tres sitios extracelulares de N-glicosilación y varios lugares de fosforilación intracelular, distintos de GALR1 (Figura 15B). El receptor GALR2 de rata, muestra una alta similitud con el receptor GALR3 (55%) y una menor similitud con el GALR1 (40%) (Branchek et al., 2000).

El GALR2 posee una alta capacidad moduladora, ya que puede acoplarse a dos tipos de proteínas G diferentes, $G_{i/o}$ o $G_{q/11}$, lo que significa que este subtipo de receptor de GAL puede mediar efectos tanto inhibitorios como excitatorios. Cuando se acopla a $G_{i/o}$ la estimulación del receptor reduce la concentración de AMPc a través de la vía $G_{i/o}$ -AC-PKA. Por otra parte, al acoplarse a la proteína $G_{q/11}$, el receptor activa a la fosfolipasa C (PLC), aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular, modulando canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} . Además, puede activar la vía de la MAP quinasas (MAPK) (Figura 16) (Branchek et al., 2000; Lang et al., 2007).

El receptor GALR2 es también en general expresado ampliamente en el CSN, encontrándose altos niveles de expresión en el hipocampo, particularmente en el giro dentado y en CA3, así como en el hipotálamo y corteza piriforme, además de encontrarse también presente en el núcleo dorsal del Rafe (O'Donnell et al., 1999; Waters y Krause, 2000; Mitsukawa et al., 2010).

El receptor GALR3 está formado por una estructura de 370 aminoácidos con una similitud con GALR1 del 36 % y con GALR2 del 55 %. El receptor presenta, al igual que los demás receptores de GAL, sitios de N-glicosilación y múltiples sitios de fosforilación intracelular (Figura 15C) (Branchek et al., 2000).

Al igual que el receptor GALR1, media efectos inhibitorios, al acoplarse a proteínas $G_{i/o}$ (Figura 16)(Branchek et al., 2000).

En cuanto su distribución, es relativamente abundante en tejidos periféricos, pero su expresión en el SNC es más limitada (Lang et al., 2007), presentando una distribución similar a la de GALR1 (Mitsukawa et al., 2010).

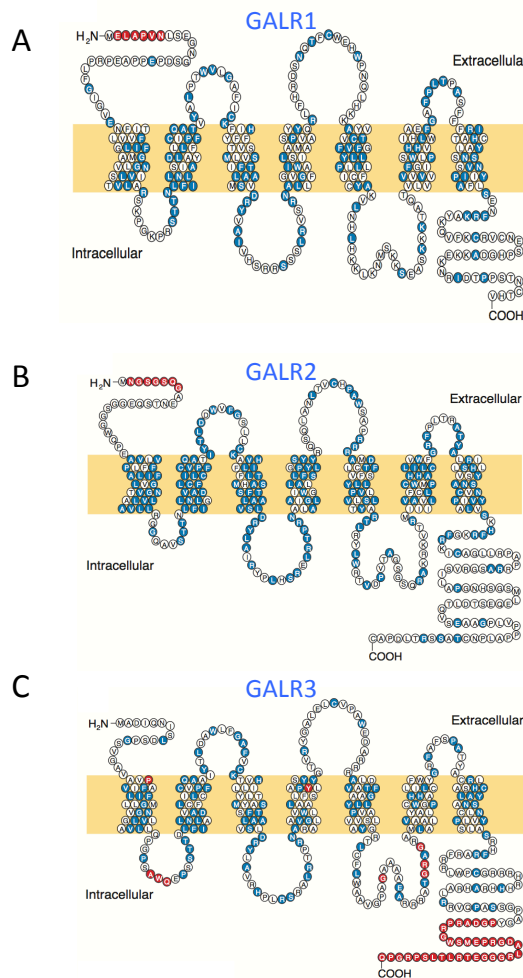


Figura 15. Diagrama de la estructura de los receptores GALR1 (A), GALR2 (B) y GALR3 (C) de rata. Modificado de Branchek et al., 2000

Se han descrito diferentes agonistas y antagonistas de los receptores de GAL (Mitsukawa et al., 2010). Los agonistas más ampliamente utilizados para estudiar los receptores de GAL son los péptidos endógenos porcino, de rata/ratón y humano. La GAL de humano tiene 30 aminoácidos mientras que la porcina y la de rata/ratón presenta 29, aunque todas las GAL endógenas presentan una alta afinidad por los tres subtipos de receptores de GAL (Lu et al., 2005). Otros agonistas de los receptores de GAL son los fragmentos de esta, así los fragmentos N-terminales GAL(1-16) y GAL(1-15) han demostrado poseer capacidad como agonistas sobre los tres subtipos de receptores de GAL (Lu et al., 2005; Lang et al., 2007), aunque todos muestran una mayor afinidad por la GAL que por los fragmentos N-terminales (Branchek et al., 1998). El fragmento GAL(2-11) conocido como AR-M1896 fue introducido como un agonista específico de GALR2, aunque recientemente se ha demostrado que también se une a GALR3 (Lu et al., 2005) por lo que ha sido redefinido como un ligando no GALR1 (Lang et al., 2007). Otro tipo de agonistas son los agonistas no peptídicos, aquí destacan el Galnon y el Galmic que son sistémicamente activos además de ser más resistentes a la degradación que otros agonistas de receptores de GAL haciendo posible su aplicación de forma sistémica, aunque han demostrado no ser selectivos de receptores de GAL pudiendo interactuar con otros tipos de receptores (Lu et al., 2005).

Por otro lado están los péptido quimera, como es el caso de los antagonistas de los receptores de GAL M15, M35 y M40 sintetizados a partir del fragmento GAL(1-13) junto con otras moléculas bioactivas (Lang et al., 2007), estos ayudaron a definir muchos aspectos de la acción de la GAL *in vivo*, aunque se ha visto que en algunas dosis se presentan como agonistas parciales (Lu et al., 2005). Una modificación del M35 es el agonista específico de los receptores GALR1, M617, que presenta 25 veces más selectividad por los receptores GALR1 que por los GALR2, sin que haya sido testado para GALR3 (Lang et al., 2007) mostrando además efectos prodepresivos en modelos animales de depresión (Kuteeva et al., 2008). El desarrollo en los últimos años de ligandos específicos ha permitido discernir alguna de las funciones del receptor GALR2. Un antagonista específico de estos receptores es el M871 el cual se une a GALR2 30 veces con más afinidad que a GALR1, indicando que M871 es un ligando específico de GALR2, sin que haya sido testado para GALR3 (Lang et al., 2007).

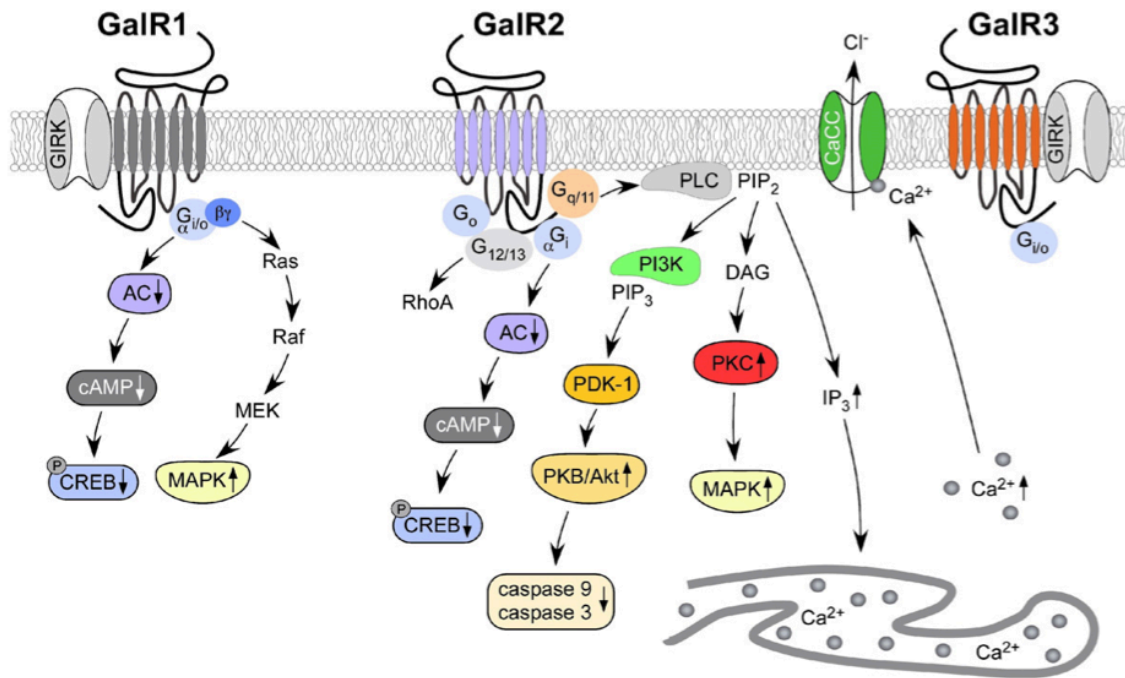


Figura 16. Cascadas de señalización de los receptores de GAL. Modificado de Lang et al., 2007.

Las **funciones de la Galanina** son muy diversas, debido a su amplia distribución por el SNC. Algunas de ellas se resumen a continuación, aunque nos centraremos en la ansiedad y depresión, objetivos de esta tesis.

La GAL *estimula la ingesta de alimentos* (Leibowitz et al., 1998, 2007) y participa en el *control central cardiovascular* (Diaz-Cabiale et al., 2005). Además, GAL participa en la modulación de la sensibilidad nociceptiva, describiéndose *efectos pronociceptivos o analgésicos* según el modelo estudiado (Lui et al., 2001; Jimenez-Andrade et al., 2006; Jung et al., 2009).

La GAL también presenta un *efecto anticonvulsivante*, siendo el GALR1 el que afecta a la fase de iniciación, mientras que el GALR2 afecta a la fase de mantenimiento del estatus epiléptico (Lerner et al., 2008). La GAL también tiene un papel inhibitorio del *aprendizaje y la memoria* (Fuxe et al., 1998; Wynick et al., 2001; Holmes et al., 2003).

Se ha relacionado a la GAL con efecto *neuroprotector y promotor de la neurogénesis*, que parece estar mediado por el receptor GALR2 (Hobson et al., 2008). Este receptor parece estar también implicado en la prevención de la muerte neuronal inducida por acúmulo de Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Crawley, 2008). Así mismo, el receptor GALR2 se implica como tratamiento potencial en los cánceres de cabeza y cuello, por su inducción de la apoptosis (Kanazawa et al., 2009).

Se ha visto que la Galanina y sus receptores participan en la *modulación de la respuesta a la ansiedad* a través de diversas estructuras cerebrales, modificando diferentes neurotransmisores, como la NA o la 5HT (Wrenn y Holmes, 2006; Fuxe et al., 2012). El papel de la GAL en la ansiedad depende de la vía y sitio de administración, además de las condiciones de estrés previo (Holmes et al., 2003; Holmes y Picciotto, 2006). Se han descrito efectos ansiolíticos tras la administración icv de GAL en el test de conflicto de Vogel (Bing et al., 1993), mientras que inyecciones realizadas directamente en la amígdala producían un efecto contrario en el mismo test (Moller et al., 1999). Por otro lado, se ha visto que la administración de GAL en la amígdala produce un efecto ansiolítico en el test del laberinto elevado en cruz, pero únicamente en animales bajo condiciones estresantes (Morilak et al., 2003; Barrera et al., 2005).

Los distintos efectos que produce la GAL en la ansiedad pueden ser explicados, en parte, por la acción y distribución diferencial de sus receptores (Holmes y Picciotto, 2006; Bailey et al., 2007). Se ha observado, que ratones carentes del receptor GALR1 presentan un incremento de la conducta ansiosa en el test del laberinto elevado (Holmes et al., 2003) y los ratones knock-out del receptor GALR2 muestran comportamiento ansioso o no, dependiendo del fondo genético de los mutantes (Bailey et al., 2007; Lu et al., 2008). Además, recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que la GAL actúa a través del receptor GALR2 aumentando el efecto ansiolítico producido por el receptor Y1 del NPY en ratas (Narváez et al., 2014). Por otro lado, también se ha comprobado la implicación del receptor GALR3 en la ansiedad, estudios muestran que antagonistas del receptor GALR3 producen efectos ansiolíticos en varias pruebas de comportamiento animal (Swanson et al., 2005) aunque otros estudios más recientes muestran que animales carentes del receptor GALR3 exhiben un fenotipo de ansiedad (Brunner et al., 2014).

La primera noción de la implicación de la **Galanina en la depresión** se observó mediante la interacción entre la GAL y el sistema serotoninérgico sugiriendo que la GAL podría tener un papel relevante en la depresión (Hedlund et al., 1991, 1992, 1994; Fuxe et al., 1998, 2008, 2012). La primera evidencia farmacológica que implicaba a la GAL en el comportamiento depresivo, se observó tras la infusión de GAL en el área tegmental ventral (VTA) en rata, donde la GAL producía un incremento de la inmovilidad en la prueba del FST (Weiss et al., 1998; Wrenn y Crawley, 2001; Kuteeva et al., 2008), Además, también la GAL administrada vía icv producía un efecto pro-depresivo en la misma prueba de comportamiento (Kuteeva et al., 2007). El efecto producido tanto por la inyección de GAL en VTA como icv, fue bloqueada mediante la coadministración con antagonistas de los receptores de GAL, indicando que este efecto estaba mediado por los receptores de GAL (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2007).

Otra evidencia de la implicación de la GAL en la depresión, fue el estudio en ratas Flinders, un modelo genético de depresión. Estas ratas muestran una alta inmovilidad en el FST, y mostraron un aumento de la densidad de los receptores de GAL en el núcleo dorsal del Rafe (Bellido et al., 2002), así como una reducción de GAL en el hipocampo e hipotálamo (Husum et al., 2003; Kuteeva et al., 2008). Sin embargo, los niveles de GAL en el hipocampo e hipotálamo se mantenían normales en ratas Flinders tratadas con antidepresivos, sugiriendo que la transmisión anómala de GAL podría estar relacionada con el comportamiento depresivo en este modelo animal (Husum et al., 2003; Kuteeva et al., 2008).

Se han realizado estudios con ratones mutantes que sobreexpresan GAL, donde los ratones que sobreexpresan GAL bajo el promotor PDGF-B (Ratones GalOE-P) muestran un incremento de la inmovilidad en la prueba del FST, sugiriendo un incremento de la conducta depresiva (Kuteeva et al., 2005). Además, ratones carentes del receptor GALR1, así como, mutantes que sobreexpresan GAL bajo el promotor de la dopamina- β -hidroxilasa (ratón GalOE-D) no mostraron comportamiento depresivo en la prueba del test de suspensión de la cola (Holmes et al., 2005). Cabe destacar, que el ratón mutante de sobreexpresión de GAL GalOE-P, el cual mostraba un comportamiento depresivo en el FST, mostró un aumento de la liberación de 5HT y NA en el hipocampo tras el estrés de la natación, mientras que en el mutante GalOE-D no se produjo ese aumento (Yoshitake et al., 2004; Kuteeva et al., 2008).

La disponibilidad y el uso de agonistas y antagonistas de los receptores de GAL ha permitido conocer el papel de los subtipos de receptores en la depresión. Así, se sugiere que los receptores GALR1/GALR3 pueden contribuir al efecto pro-depresivo de la GAL, ya que el agonista de los receptores GALR1 M617 incrementa el tiempo de inmovilidad en el FST, de una forma similar a la GAL (Kuteeva et al., 2008b). También antagonistas del receptor GALR3 ejercen una acción antidepresiva en varios modelos animales de depresión, incluyendo una disminución del tiempo de inmovilidad y un aumento del tiempo de natación en el FST (Swanson et al., 2005; Barr et al., 2006).

Por otro lado, una estimulación del receptor GALR2 puede producir un efecto antidepresivo, contrario al efecto de los otros subtipos de receptores. Así, el tratamiento crónico con el antidepresivo SSRI Fluoxetina, produce un aumento del RNAm del receptor GALR2, pero no del GALR1, acompañado de un aumento en la densidad del receptor en el núcleo dorsal de Rafe y el Locus coeruleus (Lu et al., 2005). Además, la administración icv del agonista de GALR2 AR-M1896 en ratas, produce una disminución del tiempo de inmovilidad en el FST, de una manera similar a la Fluoxetina (Kuteeva et al., 2008b).

Hasta la fecha, no disponemos de mucha información del papel que tiene la GAL en depresión en humanos. Un único estudio, donde se administraba GAL vía intravenosa a hombres voluntarios sanos, mostraba un efecto antidepresivo de la GAL (Murck et al., 2004). Un estudio reciente muestra que las variantes en los genes de GAL y sus receptores confieren un mayor riesgo de depresión y ansiedad en personas que experimentaron situaciones de adversidad en la niñez o acontecimientos vitales negativos recientes (Juhász et al., 2014)

3.2.1 Fragmento N-terminal 1-15 de Galanina

En la mayoría de los neuropéptidos conocidos se ha comprobado si sus fragmentos tienen actividad biológica y la secuencia de aminoácidos mínima necesaria para su actividad biológica se localiza en la porción C-terminal de la molécula. Esto hace que en ocasiones los fragmentos C-terminales de algunos neuropéptidos actúen como agonistas de la molécula completa, como ocurre con la Sustancia P (Bailey et al., 1986), o incluso como antagonistas como ocurre con el Neuropéptido Y (Aguirre et al., 1991).

Se ha observado que algunos fragmentos de la GAL también tienen actividad biológica. Existen fragmentos C-terminales de GAL que presentan actividad biológica, pero se localizan en la musculatura lisa gastrointestinal, donde hay una alta densidad de lugares de unión específicos para estos fragmentos (Fox et al., 1988; Rossowski et al., 1990). Sin embargo, en el resto de tejidos, incluyendo el SNC, los fragmentos C-terminales son inactivos y se ha demostrado que los fragmentos N-terminales presentan actividad biológica (Lagny-Pourmir et al., 1989; Fisone et al., 1989; Crawley et al., 1990).

Dado que en la mayoría de las secuencias de GAL que se conocen, los 15 primeros residuos están muy conservados (Figura 17), se ha propuesto que la parte de la GAL esencial para la interacción con sus receptores es la parte N-terminal (Bedecs et al., 1995). Esto se observa en preparaciones de células de músculo liso de rata, donde el fragmento GAL(1-10) producía una respuesta de contracción (Ekblad et al., 1985) y en estudios realizados en membranas de hipocampo, donde el fragmento GAL(1-16) demostró comportarse como un agonista total con sólo cinco veces menos afinidad por los receptores de GAL que la molécula completa de GAL (Bedecs et al., 1995). Los fragmentos N-terminales también mostraron ser agonistas con alta afinidad en la línea celular pancreática Rin m F5 (Lagny-Pourmir et al., 1989). A nivel de SNC el fragmento N-terminal de GAL más corto que ha demostrado actividad sobre los receptores de GAL ha sido GAL(1-12), produciendo una inhibición de la liberación de Acetilcolina inducida por Escopolamina en el hipocampo, de una manera similar a como lo hace el fragmento GAL(1-16), mientras que el fragmento C-terminal GAL(17-29) no producía ningún efecto (Girotti et al., 1993).

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 Hombre	Val	-Gly	-Asn	-His	-Arg	-Ser	-Phe	-Ser	-Asp	-Lys	-Asn	-Gly	-Leu	-Thr	-Ser

Figura 17. Secuencia de la GAL en distintas especies, donde se observa que el fragmento 1-15 es común en todas las especies. Modificado de Wiczek et al., 1996.

La determinación de la vida media, así como, la respuesta a enzimas peptidasas, son aspectos importantes para conocer la posible actividad como agonista de un péptido. De esta forma se ha estudiado la estabilidad metabólica de la GAL y del fragmento GAL(1-16), mostrando que la GAL es un péptido estable con una vida media de 100 minutos en preparaciones de membranas de hipotálamo de rata, mientras que el fragmento GAL(1-16) se degradaba más rápidamente. Además, durante la digestión de la GAL, solo aparecieron pequeños fragmentos N-terminales, sin la aparición del fragmento N-terminal GAL(1-16), esto puede deberse a que el estudio se realizó en preparación de membranas de hipotálamo, y por tanto se descartaron algunas enzimas proteolíticas solubles extra e intra celulares, las cuales también pueden influir en la degradación de la GAL. Sin embargo, en la digestión del fragmento GAL(1-16) durante una incubación corta, se encontró el fragmento GAL(1-14), desapareciendo éste en fragmentos más cortos en incubaciones con mayor duración (Land et al., 1991).

Estudios más recientes, donde se combinaban la microdialisis inversa con la espectrometría de masas, para estudiar los sitios de escisión in vivo de la GAL humana en hipocampo de rata, revelan que el mayor punto de escisión de la GAL está localizado entre la Ala¹⁵ y la Val¹⁶, localizado en el centro del péptido, produciendo el fragmento N-terminal GAL(1-15) y el C-terminal (16-30), con una señal más intensa de GAL(1-15). Por el contrario, el fragmento GAL(1-16) producía sólo una señal débil (Richter y Schuchardt, 2008).

Se ha comprobado que los tres subtipos de receptores de GAL muestran una mayor afinidad por la GAL que por los fragmentos N-terminales como el GAL(1-15) (Branchek et al., 1998). Sin embargo, hay que destacar la existencia de lugares de unión específicos de alta afinidad para el fragmento GAL(1-15), descritos en experimentos autorradiográficos mediante el fragmento GAL(1-15) marcado con I¹²⁵ (Figura 18), donde estos sitios de unión específicos para el fragmento presentan una baja densidad de sitios de unión de la molécula completa GAL, como es el caso del hipocampo dorsal, el neocortex y el neocortecio, áreas donde los sitios de unión mostraron una alta selectividad por el fragmento GAL(1-15) y no por la GAL. En otros casos existe un solapamiento entre los sitios de unión para ambas moléculas de GAL, como es el caso del núcleo del Rafe dorsal (Hedlund et al., 1992).

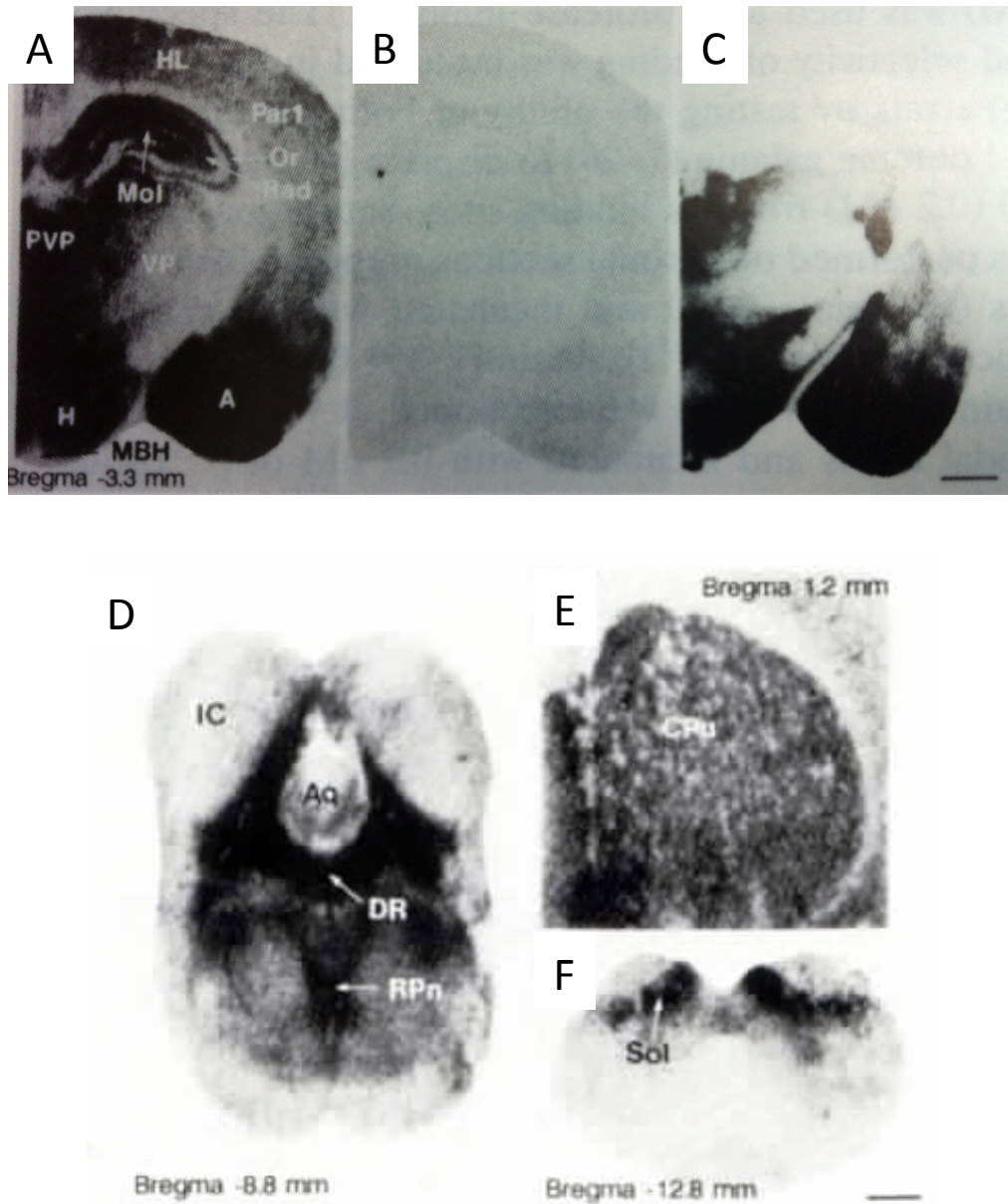


Figura 18. Autorradiograma representativo de secciones incubadas con [125 I]-GAL(1-15) (A,B,D,E,F) y [125 I]-GAL (C). (B) representa las uniones no específicas. En (A y C) se pueden observar los sitios de unión específico de GAL(1-15) en el hipocampo dorsal. En (D, E y F) se muestra el bindig de GAL(1-15) en el Rafé dorsal, caudado putamen y núcleo del tracto solitario, respectivamente. Modificado de Hedlund et al., 1992.

Nuestro grupo de investigación, ha estudiado el papel tanto de la GAL como del fragmento GAL(1-15) en el control central cardiovascular demostrando la existencia de un papel diferencial entre ambos en diversos aspectos (Diaz-Cabiale et al., 2005b). La GAL produce un efecto taquicardico y ligeramente vasopresor mientras que la GAL(1-15) produjo taquicardia y un efecto vasopresor mucho más potente que se mantuvo durante todo el periodo de registro (Diaz et al., 1996). Así el antagonista de receptores de GAL M40 bloqueaba el aumento de la frecuencia cardiaca y el efecto vasopresor producido por la administración del fragmento GAL(1-15), mientras que no se bloquearon los efectos inducidos por la GAL (Narváez et al., 2000). Por otro lado, la administración de GAL y GAL(1-15) producía un patrón diferencial, tanto espacial como temporal, en la inducción de la proteína C-Fos en la médula oblongata, ampliamente observada en el núcleo del tracto solitario, sugiriendo que esta área podría estar implicado en control central cardiovascular mediado por estas moléculas (Marcos et al., 2001; Diaz-Cabiale et al., 2005b).

El mecanismo responsable del efecto cardiovascular de la GAL y del fragmento GAL(1-15) también parece ser diferente ya que en animales pretratados con propranolol, un β -antagonista, se bloqueó la taquicardia y el efecto vasopresor producido por GAL(1-15), pero no el producido por la GAL, mientras que en ratas pretratadas con atropina, un antagonista colinérgico, no modifico los efectos cardiovasculares producidos por la GAL(1-15), pero si los producidos por la GAL (Diaz-Cabiale et al., 2002).

Además interaccionaban de forma diferente con otros neurotransmisores y neuropeptidos involucrados en la respuesta cardiovascular (Diaz-Cabiale et al., 2005b), por tanto se evaluó la posible interacción de estos neurotransmisores y neuropeptidos con la GAL y la GAL(1-15). La coadministración del agonista $\alpha 2$ -adrenergico, clonidina, con GAL indujo taquicardia y una rápida respuesta vasopresora, sin embargo, la coadministración con el fragmento GAL(1-15) no resultó en respuesta cardiovascular alguna (Diaz-Cabiale et al., 2000), sugiriendo la existencia de un efecto antagónico de GAL, pero no de GAL(1-15), en la respuesta hipotensiva mediada por el receptor $\alpha 2$ -adrenergico, posiblemente debida una interacción receptor-receptor entre los receptores de GAL y el $\alpha 2$ -adrenergico en el núcleo del tracto solitario (Diaz-Cabiale et al., 2005b).

Por otro lado también ha sido descrita la interacción diferencial del receptor de Angiotensina II (Ang II) con la GAL y la GAL(1-15) observándose una acción facilitadora de la Ang II sobre la GAL(1-15), mientras que el efecto vasopresor causado por la GAL desaparece en presencia de Ang II (Diaz-Cabiale et al., 2005a).

También se ha observado un efecto facilitador de la GAL(1-15) sobre los receptores Y2 del NPY. De modo que, la coinyección de GAL(1-15) con un agonista de los receptores Y2 induce un incremento en la presión arterial media similar al producido por la coadministración de GAL(1-15) con el NPY (Diaz-Cabiale et al., 2006). Además la GAL(1-15) aumentaba significativamente el ligado del agonista Y2 en el núcleo del tracto solitario, efecto que se bloqueaba mediante el antagonista de los receptores de GAL M40 (Diaz-Cabiale et al., 2010). Mientras que la coinyección de la molécula completa GAL con el agonista de los receptores Y2 no produjo ninguna acción ni a nivel cardiovascular ni a nivel de receptor en el núcleo del tracto solitario (Diaz-Cabiale et al., 2006).

4. Interacción Galanina/5HT1A

Como se ha mencionado en apartados anteriores de esta tesis, la Galanina y la 5HT colocalizan en distintos núcleos, entre ellos en el Rafe dorsal, núcleo donde se encuentran la mayoría de los somas de las neuronas serotoninérgicas y por tanto de gran importancia en la patofisiología de la depresión. Este hecho inspiró al grupo del Dr. Fuxe a evaluar el metabolismo y los niveles de 5HT en distintas regiones tras la inyección intraventricular de GAL, produciéndose una reducción en el metabolismo de 5HT en la corteza límbica ventral, formación hipocámpal y la corteza fronto-parietal, probablemente a través de una acción inhibitoria en las células serotoninérgicas del Rafe dorsal, reduciendo su tasa de disparos (Fuxe et al., 1988a; Revisión Fuxe et al., 2012). Estos resultados sugieren que la GAL, a través de sus receptores, puede contribuir a la depresión mediante la reducción de los disparos en las neuronas serotoninérgicas ascendentes (Kehr et al., 2002). De esta forma, antagonistas de los receptores de GAL podrían ejercer un efecto antidepresivo (Revisión Fuxe et al., 2012).

Al mismo tiempo, otro estudio mostró que en preparaciones de membranas límbicas, la GAL reducía la afinidad de los receptores 5HT1A postsinápticos y por tanto el reconocimiento y señal de este receptor en el sistema límbico (Fuxe et al 1988b; Fuxe et al., 2012). Esto indica que la GAL también puede contribuir al estado de depresión, debido a que la activación del receptor 5HT1A postsináptico produce efectos de elevación del estado de ánimo (Fuxe et al., 2012). El resultado de la modulación de los receptores de GAL en la unión del agonista 5HT1A a su receptor dio la primera indicación de la posible existencia de heterómeros GALR/5HT1A, donde los receptores de GAL antagonizan el reconocimiento y señal de los receptores 5HT1A postsinápticos a través de una interacción receptor-receptor (Zoli et al., 1993; Fuxe et al., 2008, 2012).

Por otro lado, se encontró que la activación de los receptores 5HT1A en preparaciones de membranas y en secciones producía un aumento de la afinidad de los receptores de GAL en áreas di y telencefálicas (Hedlund et al., 1991), indicando que la interacción receptor-receptor puede ser recíproca (Fuxe et al., 2012).

La interacción antagónica de la GAL sobre los receptores 5HT1A también se observó en estudios de conducta animal, donde la GAL producía efectos antagónicos sobre la acción inducida por el agonista de 5HT1A 8-OH-DPAT en el test de evitación pasiva, siendo el hipocampo el núcleo clave de esta interacción (Razani et al., 2001).

Al analizar el efecto de la GAL sobre los receptores 5HT1A en el núcleo del Rafe dorsal se observó una acción moduladora, donde la GAL producía una rápida reducción de la afinidad de los receptores 5HT1A a los 10 minutos en las células serotoninérgicas (Razani et al., 2000), demostrándose así la interacción antagónica GALR/5HT1A a nivel somatodendrítico en células serotoninérgicas en el Rafe dorsal (Fuxe et al., 2012). Sin embargo, esta interacción antagónica no produce un aumento en las descargas de las neuronas 5HT al limitar la acción del autorreceptor 5HT1A, dado que la GAL, por ella misma, causa hiperpolarización en estas células (Xu et al., 1998), por tanto, esto podría representar un mecanismo para evitar la inhibición excesiva de las células 5HT en el Rafe dorsal (Fuxe et al., 2012).

Además, a las 2 horas se producía un aumento en la densidad de los receptores 5HT1A, probablemente debido a que existen heterómeros entre GALR y 5HT1A por la reducción en la internalización en los complejos GALR/5HT1A (Razani et al., 2000) y/o debido a que la GAL induce un incremento en la maduración e inserción de estos heterómeros en la membrana plasmática (Fuxe et al., 2012).

Recientemente, se ha demostrado la existencia del heterodímero GALR1/5HT1A en células HEK-293, donde estas células co-transfectadas con los receptores GALR1-YFP y 5HT1A-GFP2 producían un aumento significativo de la señal de FRET en comparación con las células que expresaban únicamente uno de los dos receptores. Además se comprobó que se trataba de un heterodímero constitutivo, al no verse alterado el ratio de FRET mediante el tratamiento con agonistas (Borroto-Escuela et al., 2010).

Al realizar un análisis de la señalización intracelular mediante CRE-luciferasa y SER-luciferasa se encontró que la señalización vía AC o MAPK resultó en una transinhibición que bloqueaba una activación excesiva de la proteína $G_{i/o}$ y una inhibición exagerada de la AC o estimulación de la actividad MAPK (Figura 19) (Borroto-Escuela et al., 2010).

Además, se estudió la especificidad del heterodímero GALR1/5HT1A mediante la presencia del receptor GALR2 sin marcar, observándose que la presencia del receptor GALR2 no solo no bloqueaba la señal FRET desarrollada por el heterómero GALR1-YFP/5HT1A-GFP2 sino que la aumentaba, sugiriendo la posibilidad de la existencia de un mosaico de receptores formado por GALR1/GALR2/5HT1A (Borroto-Escuela et al., 2010; Fuxe et al., 2012).

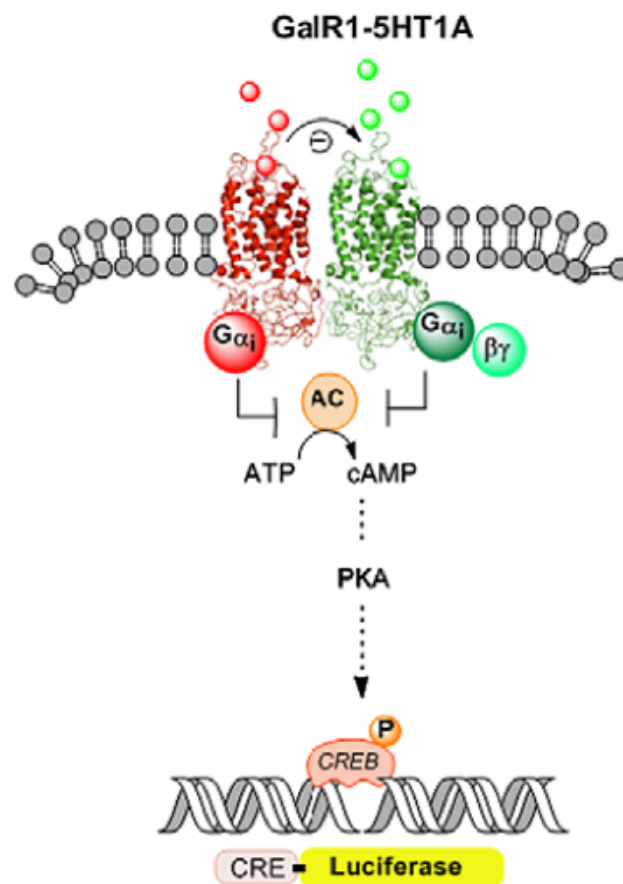


Figura 19. Esquema de la interacción receptor-receptor del heterómero GALR1/5HT1A resultando en la reducción de la activación de la proteína G $_{i/o}$ y la inhibición de la AC. Modificado de Borroto-Escuela et al., 2010.

En relación a la interacción entre los receptores 5HT1A y el fragmento GAL(1-15), se observa una papel diferencial con respecto a la GAL ya que únicamente GAL(1-15) y no la molécula completa, puede modular antagónicamente los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal, siendo este efecto bloqueado por el antagonista de los receptores de GAL M35 (Hedlund et al., 1994). Además, el fragmento N-terminal GAL(1-16) antagonizó a los receptores 5HT1A en la corteza ventral límbica de forma más potente que la GAL (Diaz-Cabiale et al., 2000). Estos efectos también se bloquearon mediante antagonistas específicos de los receptores de GAL (Diaz-Cabiale et al., 2000). Lo que sugiere que no sólo la GAL sino también el fragmento GAL(1-15) puede modular a los receptores 5HT1A.

OBJETIVOS

Como se ha descrito previamente la Galanina (GAL) y sus receptores participan en la depresión y en la modulación de la respuesta de ansiedad (Wrenn y Holmes, 2006; Kuteeva et al., 2008; Fuxe et al., 2012), produciendo un efecto pro-depresivo en la prueba de la natación forzada (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2008) y describiéndose efectos ansiolíticos o ansiogénicos dependiendo del lugar de administración y de la existencia de estrés previo (Holmes et al., 2003; Holmes y Picciotto, 2006; Morilak et al., 2003; Barrera et al., 2005). Además, la GAL y la serotonina (5HT) colocalizan en distintos núcleos implicados en la depresión especialmente en el núcleo dorsal del Rafe donde existe más del 70% de colocalización entre GAL y 5HT (Melander et al., 1986). Se ha demostrado la existencia de interacciones antagónicas de la GAL sobre los 5HT_{1A} tanto a nivel de receptor como a nivel funcional, probablemente a través de heterómeros GALR/5HT_{1A} (Fuxe et al., 1988b; Zoli et al., 1993; Razani et al., 2000; Razani et al., 2001; Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012).

La GAL posee un fragmento N-terminal 1-15 [GAL(1-15)] en el Sistema Nervioso Central (SNC) que tiene una acción funcional diferente con la GAL en la regulación central cardiovascular. Además nuestro grupo de investigación ha descrito interacciones opuestas entre GAL y GAL(1-15) con otros receptores y neuropéptidos (Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2010). En relación a los receptores implicados en el efecto de la GAL(1-15), se ha comprobado que los tres subtipos de receptores de GAL clonados muestran una mayor afinidad por la GAL que por los fragmentos N-terminales (Branchek et al., 1998). Sin embargo, existen lugares de unión específicos para la GAL(1-15) como son el hipocampo dorsal, el neocortex, el neocortecillo y el Rafe dorsal (Hedlund et al., 1992), núcleos relacionados con la depresión y la ansiedad.

Basándonos en lo anterior el ***objetivo general*** de esta tesis es *analizar la función de la GAL(1-15) en pruebas de comportamiento animal relacionadas con la depresión y ansiedad, así como describir el posible mecanismo de actuación de este fragmento de Galanina en el SNC.*

Además se estudiará la modulación de la GAL(1-15) sobre los receptores 5HT_{1A} en pruebas de conducta animal de depresión analizando los mecanismos implicados en dicha interacción.

1.1 Objetivos específicos.

1.1.1 Función de GAL(1-15) en depresión y ansiedad.

a) Estudiar el papel funcional de la GAL(1-15) en la depresión y ansiedad, evaluando la respuesta de la GAL(1-15) en las pruebas de la natación forzada, campo abierto, laberinto elevado en cruz y tarea de evitación pasiva.

Además, se comprobará si el receptor GALR2 está implicado en el efecto del fragmento GAL(1-15) utilizando el antagonista específico de estos receptores M871.

b) Estudiar si existe un papel deferencial entre el fragmento GAL(1-15) y la molécula completa de GAL en los modelos de ansiedad y depresión, comparando el efecto de ambos en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto.

c) Analizar tanto si existe colocalización de los receptores GALR1 y GALR2 en las células del hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe, mediante técnicas inmunohistoquímicas, como si estos receptores se encuentran en estrecha proximidad en la célula mediante la técnica de ligazón por proximidad.

d) Generar un modelo animal Knockdown del receptor GALR2 para estudiar la implicación de este receptor en el efecto producido por la GAL(1-15) en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto así como para estudiar la colocalización y la proximidad entre los receptores GALR1 y GALR2 en el Hipocampo dorsal y Rafe dorsal en tejido de este modelo animal.

e) Estudiar el patrón de internalización y el tráfico vesicular tras la estimulación con GAL o GAL(1-15) en células HEK-293 que expresen GALR1 y/o GALR2.

f) Analizar en la línea celular derivada del núcleo del Rafe, RN33B, la activación celular así como la síntesis y almacenamiento de 5HT tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Además se estudiará en esta línea celular si existe proximidad entre los receptores GALR1 y GALR2 mediante la técnica de ligazón por proximidad.

1.1.2 Interacción GAL(1-15)/5HT1A.

a) Estudiar la posible interacción funcional de GAL(1-15) y el agonista de los receptores 5HT1A en la depresión, evaluando si GAL(1-15) modifica la respuesta inducida por el agonista 5HT1A en la prueba de la natación forzada.

Además se estudiara la implicación del receptor GALR2 en esta interacción mediante el uso del antagonista M871.

- b) Estudiar la interacción funcional de la GAL y el agonista de los receptores 5HT1A en la prueba de la natación forzada, comparando el efecto de esta interacción con la producida entre la GAL(1-15) y el agonista de los receptores 5HT1A.
- c) Comprobar si la GAL(1-15) modifica la afinidad y la síntesis de los receptores 5HT1A en zonas relacionadas con la depresión: Hipocampo dorsal y núcleo del Rafe dorsal. Se estudiarán las características del ligado del agonista 5HT1A [3H]8-OH-DPAT, así como la expresión de los receptores 5HT1A.
- d) Analizar tanto si existe colocalización de los receptores GALR2 y 5HT1A en las células del hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe, mediante técnicas inmunohistoquímicas, como si los receptores GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A se encuentran en estrecha proximidad en la célula mediante la técnica de ligazón por proximidad.
- e) Estudiar en células derivadas del Rafe RN33B la expresión del receptor 5HT1A tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Además se estudiará en esta línea celular si existe proximidad entre los receptores GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A mediante la técnica de ligazón por proximidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología Animal.

1.1 Animales de Experimentación.

En el presente trabajo se han utilizado ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley suministradas por la casa comercial Charles River Labs. (CRIFFA, Barcelona), cuyo peso corporal ha oscilado entre 200 y 250 gr. Para evitar que las variaciones hormonales interfieran en los resultados se han utilizado exclusivamente ratas macho.

Los animales se han mantenido en el estabulario de los servicios centrales de la Universidad de Málaga bajo condiciones controladas. La temperatura media fue de 23 ± 1 °C y el fotoperiodo de 14/10 horas de Luz/oscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de mantenimiento ratón/rata (CRIFFA, Barcelona) y agua de la red general de abastecimiento, y tuvieron libre acceso (*ad libitum*) a la comida y la bebida en todo momento. A la llegada de los animales se les mantiene en cuarentena durante una semana para controlar el estado sanitario de los mismo y controlar y minimizar los efectos del estrés producido durante el transporte y la habituación a las nuevas condiciones de estabulación.

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

1.2 Anestesia de los Animales.

Se han utilizado dos tipos de anestésicos dependiendo si se requería un efecto anestésico reversible o irreversible.

Para la Perfusión Transcardiaca, procedimiento donde se requiere una anestesia irreversible, se empleó:

- Pentobarbital Sódico a una dosis de 50 mg/Kg administrado vía intraperitoneal.

Para la anestesia de los animales durante la cirugía de implantación de cánula crónica se utiliza el coctel anestésico Equitesina compuesta por:

- Pentobarbital Sódico 0.97% (Sigma-Aldrich)
- Etanol Absoluto 11.5% (Sigma-Aldrich)
- Hidrato de Cloral 4.25% (Sigma-Aldrich)
- Propietilenglicol 42.8% (Sigma-Aldrich)
- Sulfato de Magnesio 2.1% (Panreac Química S.A.)
- Agua Destilada 47.7%

El coctel anestésico se inyecta al animal de forma intraperitoneal a una dosis de 3.3mL/Kg como dosis inicial de ataque. Este anestésico es válido para este tipo de cirugía ya que el animal recupera la normalidad en su estado fisiológico rápidamente además de no tener efectos que puedan interferir en los experimentos que se le realizaran posteriormente. Además, la Equitesina es un anestésico empleado por un amplio número de autores en procedimientos experimentales y protocolos de experimentación conductual dado su amplio margen de seguridad (Grancha, 2006; Sharma, 2007).

Antes de iniciar la cirugía se comprueba la ausencia total de reflejos del animal, comprobando el reflejo podal mediante el pinzamiento de la palma de las patas traseras y el reflejo caudal mediante el pinzamiento de la cola. Si el animal responde a algún estímulo o se ve algún tipo de respuesta se puede hacer una reinyección del anestésico con una dosis de 0.6mL/Kg. Esta misma dosis se puede usar durante la intervención quirúrgica para la prolongación del estado de anestesia del animal. Durante todo el procedimiento se evalúa el estado de anestesia del animal y el bienestar del mismo.

1.3 Cirugía Estereotáxica con implantación de cánula crónica Intracerebroventricular lateral.

Una vez tengamos el animal anestesiado de la manera expuesta anteriormente realizamos el procedimiento quirúrgico de implantación de cánula en ventrículo lateral. Para ello tendremos preparado el material quirúrgico debidamente esterilizado. Preparamos al animal rasurando el pelo de la parte superior de la cabeza previa limpieza con una gasa empapada en alcohol para un mejor rasurado y desinfección de la zona.

Una vez esté el animal preparado lo fijamos en el aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) primero colocando las barras laterales en los conductos auditivos, de manera que quede el cráneo fijado y sin movimiento lateral y después colocando los incisivos en la barra anterior destinada para ello, previamente habremos sacado la lengua por un lateral de la boca para poder hacer esto y evitar la asfixia del animal. De esta forma el animal debe quedar totalmente fijado. Posteriormente realizamos con ayuda de un bisturí una incisión en la piel que irá desde la comisura anterior de los ojos hasta el inicio de la musculatura del cuello. Separamos esta piel quedando al descubierto el periostio que cubre el cráneo, de la misma manera separamos el periostio dejando a la vista la calota, una vez tengamos la calota limpia y seca buscamos el punto Bregma (punto de confluencia entre el hueso frontal y los huesos parietales), como punto de referencia para la obtención de las coordenadas

extereotáxicas tomadas del atlas de Paxinos y Watson (1997), y que para el ventrículo lateral son:

- Coordenada Antero-Posterior: 1mm Posterior
- Coordenada Lateral: 1.4mm Derecha
- Coordenada Vertical: 3.6mm desde la calota

Una vez fijadas las coordenadas con el aparato de extereotaxia, las marcamos en la calota, siendo este el punto donde irá implantada la cánula. Posteriormente con ayuda de una broca de diámetro apropiado y un pequeño taladro hacemos dos agujeros en la calota sin llegar a tocar la duramadre para la colocación de tornillos de 2mm que ayudarán a fijar la cánula. La localización de estos tornillos debe estar situada a una distancia suficiente para que no perjudique a la colocación de la cánula.

Una vez los tornillos estén puestos rayamos la calota con el bisturí para hacer su superficie más rugosa y mejorar la adherencia del cemento dental que usaremos para la fijación de la cánula posteriormente. Después realizamos un agujero con ayuda de una broca de diámetro similar al diámetro de la cánula, en la marca de colocación de la cánula, una vez esté el agujero limpio colocamos la cánula guía (22G)(C313G, Plastic One) seguidamente colocamos una pequeña corona plástica que rodee tanto los dos tornillos como la cánula guía, para posteriormente llenarla de cemento dental (Dentalon, Alemania) sin que llegue a cubrir la cánula guía como se ve en la Figura 1.

Una vez se haya secado el cemento comprobamos que se ha formado un bloque fijo, colocamos en la cánula guía un obturador atornillado de acero inoxidable estéril (26G)(C313IDC, Plastic One) de 0.3mm de proyección con el objetivo de mantenerla permeable y libre de contaminación. Finalmente se sutura con hilo de seda para piel la incisión quedando solamente libre la corona que contiene la cánula guía.

Tras la intervención se coloca al animal en una manta termostática para contrarrestar la bajada de temperatura producida por la anestesia, comprobando la temperatura rectal periódicamente hasta que esta se normalice. Después se pondrán los animales en jaulas individuales con acceso a comida y bebida libre. El postoperatorio será de al menos siete días, en los cuales se valorará el estado y evolución de cada animal a diario.



Figura 1. Fotografías que muestran desde arriba y desde el perfil como queda colocada la cánula crónica en el animal al final de la operación.

1.4 Inyecciones Intracerebroventricular.

Las inyecciones intracerebroventriculares (ICV) se realizan en animales que previamente han sido manipulados, como se detallará más adelante. Para realizar las microinyecciones se usa una cánula de inyección de acero inoxidable (26G)(C313I, Plastic One) con 0.3mm de longitud superior a la cánula guía, para evitar la retrodifusión de la sustancia inyectada. Esta cánula está unida a un tubo de polipropileno (P10) de unos 10cm en cuyo otro extremo está unido a una jeringuilla Hamilton de 10 μ L de volumen.

Para la realización de la microinyección se inmoviliza el animal suavemente, y en primer lugar se quita el obturador atornillado. Después se introduce la cánula de inyección por la cánula guía, asegurándonos que esta llegue hasta el final. Una vez colocada la cánula de inyección, manualmente hacemos la microinyección de forma que inyectemos 5 μ L, el cual será el volumen de sustancia inyectado en todos los experimentos, durante 2 minutos, de forma constante y suave, para evitar el reflujo de la sustancia por el aumento de presión. Una vez finalizada la microinyección se mantiene la cánula de inyección durante un minuto más para favorecer la difusión de la sustancia inyectada. Después se retira la cánula guía y se vuelve a colocar el obturador atornillado limpio. Luego se deja el animal en una jaula individual y se sigue según el procedimiento experimental.

Para la verificación de la correcta colocación de la cánula guía y la correcta difusión de la sustancia inyectada, se realiza la observación morfológica de secciones, identificando la señal de la cánula guía hacia el ventrículo lateral y se observa si hay signos de extravasación de la sustancia inyectada o señales de hidrocefalia en el animal durante la microinyección.

1.5 Inyecciones Subcutáneas.

Otro tipo de administración de las sustancias ha sido la vía subcutánea (SC). Previamente a la realización de la inyección por vía subcutánea se realiza una pesada del animal con el fin de poder ajustar tanto la dosis del fármaco administrado como para ajustar el volumen de administración con respecto al peso del animal. El volumen de administración que realizaremos será de 2mL/Kg de animal. Una vez ajustado el volumen inmovilizaremos al animal momentáneamente cogiendo un pliegue de piel detrás del cuello, lugar donde inyectaremos, comprobando posteriormente manualmente que el volumen se encuentra subcutáneamente. Todo el proceso se realizará de forma rápida para evitar causar estrés al animal.

1.6 Técnicas Experimentales

1.6.1 Estudios de Comportamiento Animal

1.6.1.1 Condiciones de la sala de experimentación.

En la sala de evaluación conductual se mantienen las condiciones siguientes, con objeto de no interferir en el patrón conductual de los animales (Griebel et al., 1993; Kokare et al., 2005):

- La habituación y pruebas conductuales se realizan preferentemente entre las 8:00 h y las 14:00 para evitar interferencias con el ritmo circadiano, siendo el momento ideal para valorar las conductas en los modelos animales empleados, ya que los niveles séricos de corticosterona son mínimos en esta franja horaria.
- La intensidad de la luz se mantiene entre 80-90 lux con una luz oscurecida, tenue y homogénea en la sala.
- Una temperatura ambiente constante de 23+/- 1°C
- La habitación cuenta con un sistema de ventilación de presión positiva, que evita la entrada de olores y ruidos externos, que pudieran producir estrés de los animales, y su posible afectación conductual.
- Entre cada sujeto evaluado se procede a limpiar cuidadosamente con alcohol las señales olfatorias de territorialidad (orina y defecación), con el fin de no interferir en la conducta del siguiente animal.

1.6.1.2 Manipulación y habituación de los animales de experimentación.

Dos días previos, e inclusive el día de la realización de la prueba, se habitúan las ratas durante una hora manteniendo las mismas condiciones en la habitación donde se realizan las pruebas de conducta. El fin de la habituación es evitar el estrés inespecífico debido al cambio de las condiciones habituales que tienen en la sala de estabulación. Tras la hora de habituación, se manipulan durante 2-3 minutos los animales para exponer al animal al olor y movimientos del manipulador, sin que se produzca un reconocimiento de éste como una amenaza potencial. Se inmoviliza el animal durante un corto periodo de tiempo, en el que se inserta una cánula de inyección a través de la cánula guía con el objetivo de limpiarla y para acostumbrar al animal a la inyección.

1.6.1.3 Test del Campo Abierto.

Se realiza en un aparato destinado a este fin (DZsur. S.L) consistente en una superficie cuadrada de 100 cm x 100 cm con paredes de 50 cm de altura, todo de color negro. El registro conductual consiste en analizar la actividad espontánea desarrollada por el animal en el interior del campo abierto. Se delimitan de forma virtual dos zonas de análisis (Figura 2):

-Zona 1. Correspondiente a la **Zona Exterior**.

-Zona 2. Correspondiente a la **Zona Interior**.

Así como la asociación sumatoria de las dos zonas, que se denomina **arena**, y permite obtener información sobre la conducta del animal en toda la superficie del campo abierto, lo que permitirá a su vez evaluar la actividad locomotora del animal. La zona interior corresponde aproximadamente a un 25 % de la superficie total.

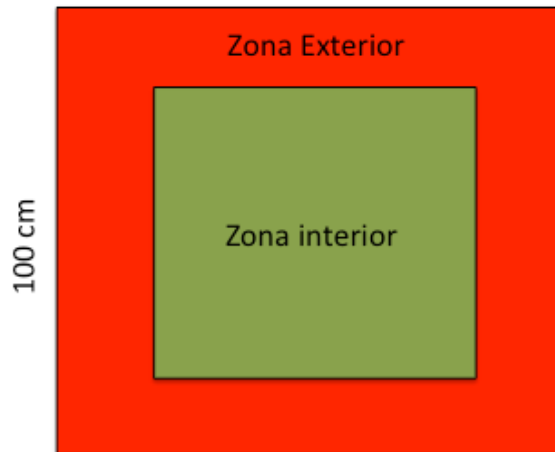


Figura 2. Ilustración que muestra la delimitación virtual del campo abierto. En color rojo la zona exterior y en color verde la zona interior. El sumatorio de ambas constituye la arena.

Los parámetros definidos para evaluar la actividad, son los siguientes:

- Número de entradas en la zona interior
- Tiempo de permanencia en la zona interior (Segundos, Seg)
- La distancia recorrida en la arena (Centímetros, Cm)
- Velocidad media en la arena (Cm/seg)

Tanto un aumento del número de entradas como del tiempo de permanencia del animal en la zona interior se correlacionan con un mayor efecto ansiolítico. La distancia recorrida y la velocidad media son parámetros de actividad locomotora (Rotzinger et al., 2010).

Las ratas se colocan individualmente y se colocan en el centro del campo abierto donde se dejan que exploren libremente durante 5 minutos. La prueba se graba en vídeo mediante una videocámara colocada sobre el campo abierto. La delimitación de las zonas y arena se realiza a través del programa informático Ethovision XT (Noldus, S.L.) (Figura 3), así como la definición de los parámetros a evaluar. El registro informatizado aporta una mayor fiabilidad de los datos y permite, a su vez, el análisis simultáneo de un gran número de variables.

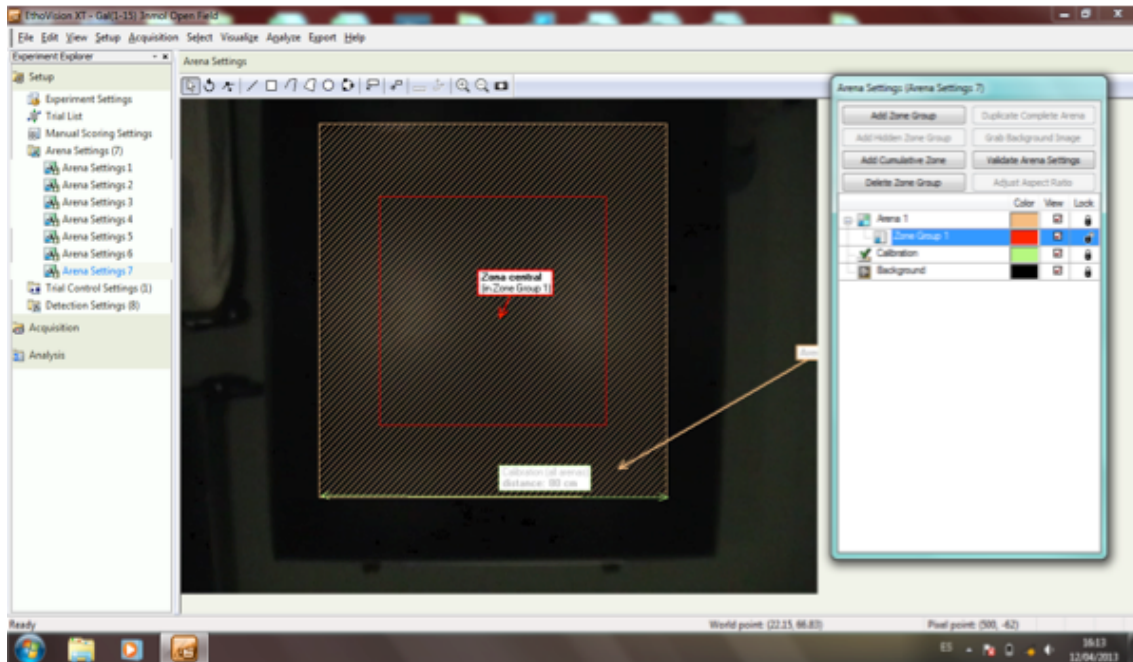


Figura 3. Captura de pantalla donde se muestra la definición de las zonas de análisis en el test del campo abierto en el software de Video Tracking Ethovision XT (Noldus, S.L.).

1.6.1.4. Test del Laberinto Elevado en Cruz.

Se realiza en una estructura de plástico formada por cuatro brazos perpendiculares de iguales dimensiones, dos de ellos denominados brazos abiertos (42.5 cm x 15 cm) y dos denominados brazos cerrados (42.5 cm x 15 cm x 40 cm), de forma que los brazos de cada tipo son opuestos el uno al otro y conectados por una plataforma central (15 x 15 cm). Todo el laberinto esta 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. Se delimitaron de forma virtual tres zonas de análisis (Figura 4):

- Zona 1. Correspondiente a los **brazos cerrados**.
- Zona 2. Correspondiente a los **brazos abiertos**.
- Zona 3. Correspondiente a la **parte central**.

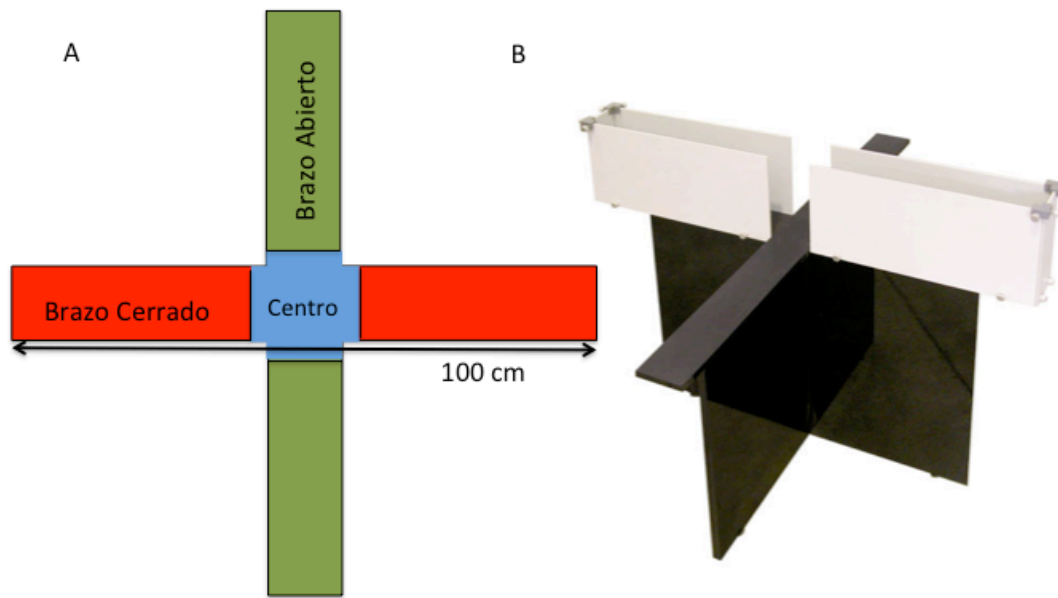


Figura 4. Ilustración que muestra la delimitación virtual de las zonas del laberinto elevado en cruz. En color rojo los brazos cerrados y en color verde los brazos abiertos (A). Aparato de laberinto elevado en cruz (B).

Así como la asociación sumatoria de las tres zonas, que se denomina **arena**, y permite obtener información sobre la actividad locomotora del animal en toda la superficie del laberinto elevado en cruz. Los parámetros a evaluar son los siguientes:

- El porcentaje de entradas en los brazos abiertos = $\left[\frac{\text{Entradas brazos abiertos}}{\text{Entradas (brazos abiertos + cerrados)}} \right] \times 100$.
- El porcentaje de tiempo en los brazos abiertos = $\left[\frac{\text{Tiempo brazos abiertos}}{\text{Tiempo (brazos abiertos + cerrados)}} \right] \times 100$.
- Velocidad media total (cm/seg.)
- Distancia recorrida total (cm)

Tanto un aumento del porcentaje de entradas como del porcentaje de tiempo de permanencia del animal en los brazos abiertos se correlacionan con un mayor efecto ansiolítico. La distancia recorrida y la velocidad media son parámetros de actividad locomotora (Rotzinger et al., 2010).

Cada rata se evalúa individualmente y se sitúa en el centro del laberinto con la cabeza hacia un brazo abierto, permitiendo que explore libremente durante cinco minutos. Las pruebas son grabada en vídeo con una videocámara dispuesta encima del laberinto, la disposición de las zonas y el análisis de los diferentes parámetros son realizados mediante el programa informático EthovisionXT (Noldus, S.L.) (Figura 5)

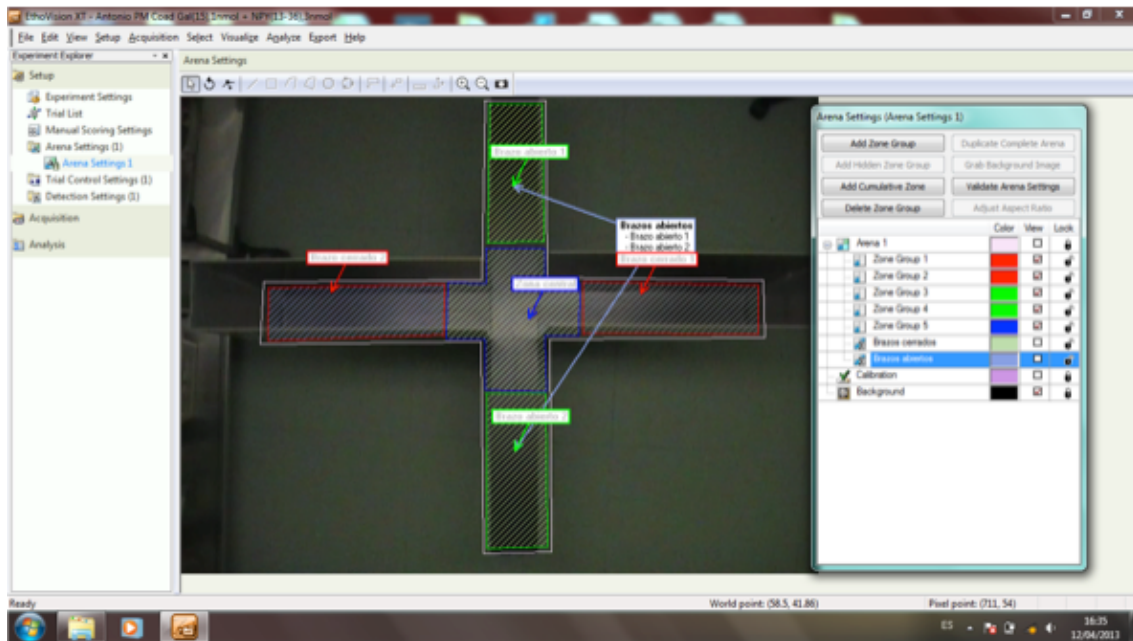


Figura 5. Captura de pantalla donde se muestra la definición de las zonas de análisis en el test del laberinto elevado en cruz, en el software de Video Tracking Ethovision XT (Noldus, S.L.).

1.6.1.5. Test de la Natación Forzada.

La prueba de la natación forzada se realiza según el procedimiento descrito por Porlsot y colaboradores en 1977 (Porlsot et al., 1977). Un tubo de metracrilato de 20 cm de diámetro y 50 cm de longitud se llena de agua a 25 ± 1 °C de temperatura hasta una profundidad de 30 cm (Figura 6). La prueba se lleva a cabo en dos sesiones, la primera sesión o sesión de entrenamiento consiste en poner al animal en el aparato dejándolo que nade libremente durante 15 minutos. 24 horas tras el entrenamiento, se realiza el test, donde se pondrá al animal en el tubo durante 5 minutos, grabando en vídeo la prueba, mediante una videocámara situada en frente del tubo, para su posterior análisis.

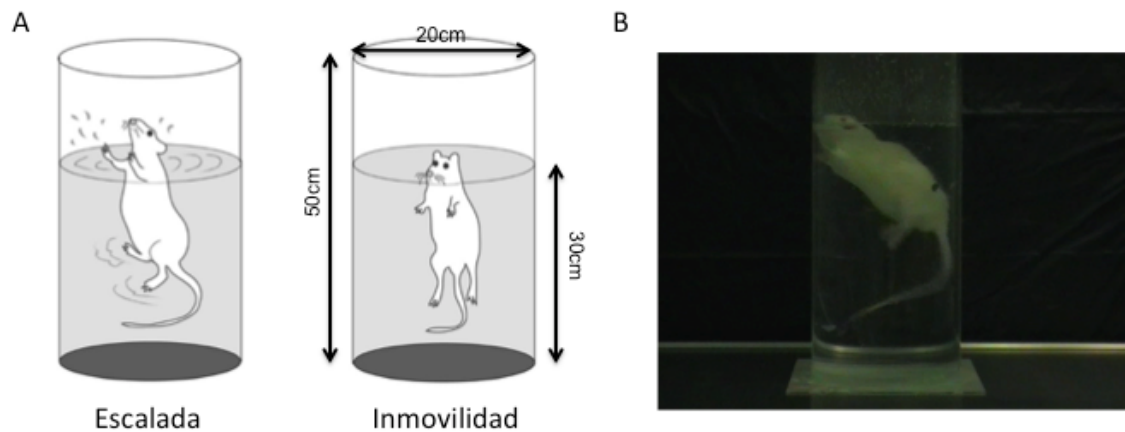


Figura 6. (A) Ilustración de la prueba de la natación forzada donde se muestra al animal realizando conducta de escalada y de inmovilidad así como las medidas del aparato (modificado de Kuteeva et al., 2007). (B) Captura de pantalla de la grabación de un animal durante la realización de la prueba.

Las conductas a valorar son las siguientes (Kuteeva et al., 2007):

- Inmovilidad: El animal permanece inmóvil, flotando en posición vertical realizando sólo los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua.
- Escalada: El animal realiza movimientos vigorosos de forma horizontal habitualmente contra las paredes del tubo.
- Natación: El animal nada de forma moderada, pudiendo realizar círculos alrededor del tubo.

Tanto un aumento en el tiempo de inmovilidad como una disminución en el tiempo de escalada se correlaciona con un efecto pro-depresivo (Porlsot et al., 1977; Kuteeva et al., 2007)

Cada rata es evaluada individualmente, poniéndola en el tubo durante 5 minutos para la realización de la prueba. Las pruebas son grabadas y posteriormente analizadas de forma manual por el investigador ayudándose del programa Raton Time 1.0 (Luis N. Coll, Fixma SL) para la cuantificación del tiempo de cada conducta.

1.6.1.6 Test de Evitación Pasiva.

El test de evitación pasiva se realiza según el protocolo descrito por Misane et al., 1998. Para ello se utiliza una caja (Shuttle box) con dos cámaras separadas mediante una puerta de guillotina. Las rejillas metálicas utilizadas como suelo en cada cámara estarán conectadas a un generador de descargas eléctricas, todo se controlará mediante un ordenador y el programa informático ShutAvoid (Panlab S.L.) (Fig. X).

La caja dispone de dos cámaras separadas por una puerta de guillotina, una de las cámaras tendrá las paredes forradas de blanco y en el techo se le acoplará una bombilla de 40 W de manera que quedará toda la cámara iluminada, denominándose esta **cámara clara**. Por el contrario la otra cámara tendrá las paredes de color negro y no dispondrá de iluminación, denominándose **cámara oscura**.

La prueba se realiza en dos sesiones separadas 24 horas entre sí. En la primera sesión o sesión de entrenamiento se pone al animal en la cámara clara dejando que explore libremente durante 2 minutos, transcurrido este tiempo se abrirá la puerta que separa ambas cámaras permitiendo al animal entrar en la cámara oscura. El tiempo que tarda el animal en entrar a la cámara oscura será registrado y se denominará **Latencia de Entrenamiento**. Si el animal no entra voluntariamente transcurridos 300 segundos se pasarán de forma manual. Una vez el animal haya pasado a la cámara oscura la puerta de separación se cerrará y al animal se le aplicará una descarga eléctrica de 0.6 mA durante 5 segundos, posteriormente el animal será devuelto a su jaula. Transcurridas 24 horas de la sesión de entrenamiento se procederá a la realización de la segunda sesión que consistirá en el test de retención. El animal será puesto en la cámara clara dejándolo libremente durante 10 segundos, tras este tiempo se abrirá la puerta de separación entre cámaras y el animal tendrá acceso a la cámara oscura. Se registrará el tiempo que el animal tarda en entrar a la cámara oscura como **Latencia de Retención** con un periodo máximo de 600 segundos.

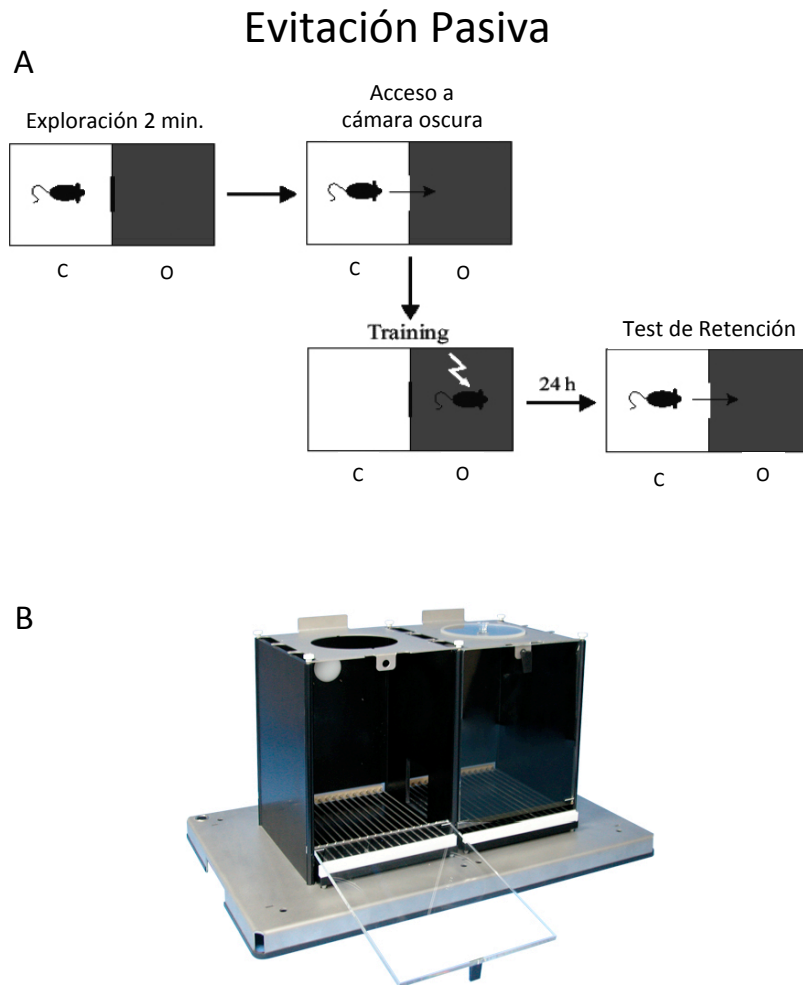


Figura 7. (A) Esquema del protocolo seguido para la realización del test de evitación pasiva. (B) Fotografía de la Shuttle Box utilizada para la prueba (Panlab S.L.).

Cada rata se evalúa individualmente, los parámetros registrados mediante el programa informático ShutAvoid (Panlab S.L.) son los siguientes:

- Latencia de Entrenamiento: Tiempo que tarda la rata en cruzar a la cámara oscura, con las cuatro patas, en la sesión de entrenamiento.
- Latencia de Retención: Tiempo que tarda la rata en cruzar a la cámara oscura, introduciendo las cuatro patas, en el test de retención con un tiempo máximo de 600 segundos.

1.6.2 Procesamiento del Tejido Cerebral.

El tejido cerebral se va procesar de dos formas diferentes según las necesidades de las técnicas en las que lo vayamos a emplear:

- A.** Tejido cerebral sin fijar: En este caso, se sacrifica al animal mediante decapitación. Inmediatamente después se extrae el cerebro y se congela sumergiéndolo en Isopentano que debe estar a -40°C enfriándolo con nieve carbónica. De esta manera se produce una congelación rápida del tejido evitando la formación de cristales de hielo que pudieran deteriorar el tejido. Tras el proceso de congelación los cerebros se almacenarán a -80°C hasta su posterior procesamiento. El tejido cerebral fresco será necesario para estudios de Autorradiografía e Hibridación in situ.

- B.** Tejido cerebral fijado: El animal se sacrifica mediante Perfusión Intracardiaca como se detallara a continuación, quedando de esta forma el tejido cerebral fijado. El tejido fijado será necesario para los estudios de experimentos de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y Ligazón por Proximidad (Duolink).

1.6.2.1 Perfusión Intracardiaca.

Para la perfusión intracardiaca, el animal anestesiado previamente con Pentobarbital Sódico, como hemos visto anteriormente, se coloca e posición decúbito supino sobre una placa/rejilla adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación. Se realiza un corte en la piel a la altura del final del esternón y se procede a la separación de la piel hasta el final de la caja torácica, luego mediante toracotomía se deja expuesto el corazón. Se inyecta en el ventrículo izquierdo 0.1 mL de Heparina al 5% (Sigma-Aldrich) para evitar que se formen coágulos de sangre que puedan impedir la perfusión de los líquidos de lavado y fijación en los tejidos. Una vez hecho esto se hace un corte en el ventrículo izquierdo donde insertaremos la cánula que irá conectada a la bomba de perfusión de presión regulable (Masterflex, modelo 7518. Cole Palmer Instrument, EEUU). La cánula se debe insertar en el inicio de la arteria Aorta, donde se procederá a su fijación mediante clampado. Tras el accionamiento de la bomba de perfusión se abrirá el circuito de la perfusión dando un corte en la aurícula derecha, permitiendo la salida de la sangre y de los líquidos usados e el proceso.

En primer lugar se hará pasar una solución de lavado formada por entre 250-300mL de Tampón Fosfato Salino (PBS) 0.1M Ph 7.4 :

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac Química SA) 17,8 gr/L
- NaH_2PO_4 (Panreac Química SA) 2 gr/L
- NaCl (Panreac Química SA) 0.9%

Posteriormente, se perfunde la solución de fijado, 300-400 mL de Paraformaldehído 4% (Sigma-Aldrich) en PBS 0.1M.

Los cerebros se extraen y se les realiza una post-fijación por inmersión en la solución fijadora durante 12-16 horas a 4°C.

Una vez terminado este proceso al tejido se le somete a un tratamiento de crioprotección sumergiéndolo en una solución de Sacarosa al 30% en PBS 0.1M manteniéndolo en nevera a 4°C durante 24-48 horas, hasta que el cerebro se hunda en la solución crioprotectora. Tras este paso el tejido se puede congelar usando isopentano a -40°C como hemos explicado anteriormente y se almacena a -80°C hasta su procesamiento.

1.6.2.2 Obtención de secciones tisulares

Las secciones tisulares se obtienen mediante el corte del tejido en un criostato (HM 550, Microm International), con una temperatura constante de -20°C. Los cerebros se fijan al soporte mediante Tissue-Tek (Sacura). El grosor de las distintas secciones y su montaje y almacenamiento varía según el procedimiento como se describe a continuación:

A. Tejido cerebral sin fijar: Para los experimentos de autorradiografía se realizan secciones coronales seriadas de 12 μm a nivel de hipocampo-amígdala (Bregma -3.6 mm) y secciones de 10 μm a nivel de rafe dorsal (Bregma -8.0 mm), tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1997).

Para los experimentos de hibridación in situ se obtienen secciones coronales de 12 μm a los mismos niveles. En ambos procedimientos estos cortes se colocan sobre portaobjetos previamente tratados (SuperFrost®Plus 25x75x1 mm, Menzel-Glaser), con el fin de evitar que los cortes de tejido se desprendan durante su incubación. Los portaobjetos con las secciones se almacenan a -20°C hasta su procesamiento.

B. Tejido cerebral fijado: Para los experimentos de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y ligazón por proximidad (Duolink) se obtienen secciones coronales seriadas de 30 μm de grosor a nivel de hipocampo – amígdala (desde

Bregma -4.16 hasta -1.80 mm) y nivel de rafe dorsal (desde Bregma -7.30 hasta -8.30 mm) tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1997). Las secciones seriadas se recogen en placas de 24 pocillos, que contienen solución de Hoffman para la crioprotección de las secciones. Pudiéndose guardar estas a -20°C sin que el tejido se congele y evitando así su deterioro. La solución de **Hoffman** contiene para un litro:

- 250 mL PB 0.4M
- 300 mL Etilenglicol (Sigma-Aldrich)
- 300 gr Sacarosa
- 10gr Polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich)
- 9 gr NaCl (Sigma-Aldrich)

Quedando la solución tamponada en PBS 0.1M.

1.6.3 Autorradiografía.

Para estudiar los efectos de la GAL(1-15) sobre la unión del ligado de los receptores 5HT1A, se realizan experimentos de Saturación con agonistas de 5HT1A marcados, siguiendo protocolos previamente descritos (Díaz-Cabiale et al., 2000).

Para los experimentos de saturación se utilizó como ligando el agonista de 5HT1A marcado [3H]-OH-DPAT (Perkin Elmer, EEUU), en 10 concentraciones crecientes de 0,26 a 10 nM, siguiendo protocolos previamente descritos (Díaz-Cabiale et al., 2000).

Para cada grupo experimental se dispusieron 2 grupos de 10 secciones adyacentes para estudiar las uniones totales y las no específicas, con lo que cada concentración evaluada tiene su propio control. Para evaluar el efecto producido por la unión no específica, se utilizó Serotonina (5HT) a una concentración de 10 µM.

Las secciones se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de incubación:

- Tris-Clorhídrico 50mM (pH 7,7).
- CaCl₂ 4mM
- Pargilina 10 µM
- Ácido Ascórbico 0.01%

Posteriormente se incubaron en la solución anterior, añadiendo [3H]-OH-DPAT en 10 concentraciones crecientes partiendo de 0,26 nM a 10 nM.

La incubación se realiza en condiciones de equilibrio y a temperatura ambiente durante 60 minutos, tras lo cual las secciones se lavan durante 5 minutos en tampón Tris-Clorhídrico 50 mM (pH 7,7), se aclaran con agua destilada (0-4°C) y se secan bajo una corriente de aire frío. Una vez completamente secas, estas secciones se exponen a una película sensible de tritio (Kodak Biomax MR1, EEUU) durante 6 semanas.

1.6.3.1 Análisis de los Autorradiogramas.

Los autorradiogramas se analizan mediante un sistema de análisis asistido por ordenador, desarrollado por NIH Imaging (EEUU). Las densidades ópticas se miden bilateralmente en las áreas analizadas, correspondientes a CA1 y Giro dentado en el hipocampo y el núcleo del Rafe dorsal (Figura 8).

Los valores de densidad óptica obtenidos en los autorradiogramas se expresan en fmol/mg de proteínas transformándose mediante estándares prefabricados con polímeros marcados con ³H (Amersham Microscale, Bucks, Reino Unido).

Para cada una de las zonas estudiadas, se obtendrá una curva de saturación que permitirá calcular los parámetros Kd (constante de disociación) y Bmax (número de sitios de unión) mediante el software estadístico GraphPad Prism v 4.0 (GraphPad Software, Inc.).

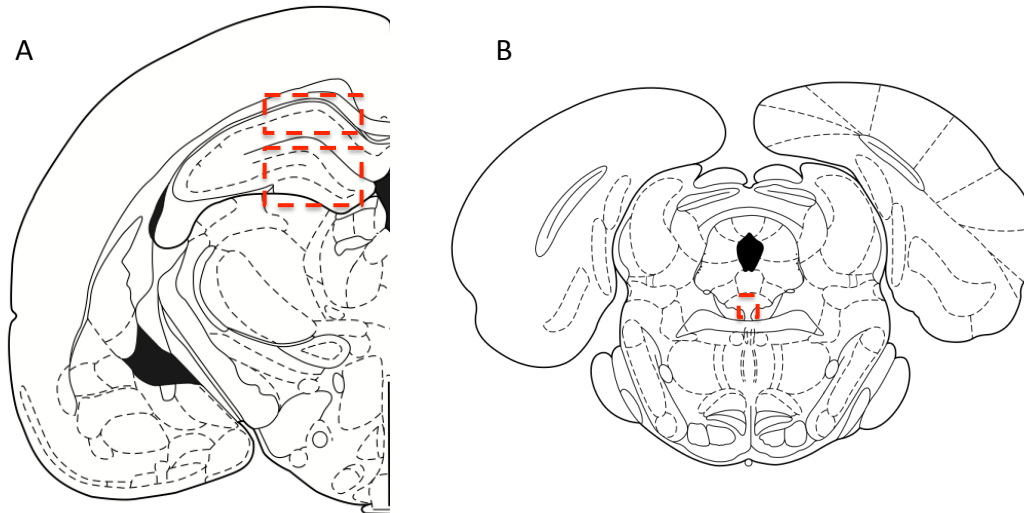


Figura 8. Esquema representativo de una sección a nivel de Bregma $-3,6$ (A) y $-8,0$ (B) según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson, mostrando el área analizada en la autorradiografía e Hibridación *in situ*. (A) CA1 y Giro Dentado en el hipocampo y (B) Núcleo del Rafe Dorsal.

1.6.4 Hibridación *in situ*.

Para estudiar los efectos de la GAL(1-15) sobre la síntesis de ARNm de los receptores 5HT1A, se realizan experimentos de Hibridación *in vitro* utilizando ribosondas contra 5HT1A marcadas, siguiendo protocolos previamente descritos (Bunneman et al., 1992; Razani et al., 2001).

1.6.4.1 Preparación y marcaje de la sonda.

La ribosonda de 5HT1A se sintetiza a partir de diferentes fragmentos de ADNc de rata mediante transcripción *in vitro*. La sonda de 5HT1A se prepara con un fragmento de ADNc de 910 pb de longitud clonado en el plásmido pGEM blue. El plásmido se linealiza mediante HindIII y se transcribe con la ARN polimerasa T7 para generar la sonda antisentido. Para generar la sonda sentido (para los controles) el plásmido se linealiza con XbaI y se transcribe con la ARN polimerasa SP6.

Tras el marcaje de las sondas con ^{35}S - α -UTP (1000 Ci/mmol, Amersham Buckinghamshire, UK), las sondas se purifican mediante columnas Nensorb (Dupont) y se comprueban en un gel (5% poliacrilamida/8M Urea).

1.6.4.2 Preparación de las secciones e Hibridación.

Las secciones se fijan durante 15 minutos con Paraformaldéhidio 4% en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.0 a temperatura ambiente. Tras la fijación las secciones se lavan en PBS durante 10 minutos y se enjuagan dos veces durante 5 minutos en agua destilada estéril. Posteriormente, se realiza una desproteización usando HCl 0.1 M durante 10 minutos tras la cual las secciones se lavan dos veces durante 5 minutos en PBS para posteriormente realizar una acetilación mediante una mezcla de Trietanolamina 0.1 M, pH 8 y Anhídrido acético 0.25 % durante 20 minutos. Esta acetilación permite reducir el fondo de la película. Posteriormente las secciones se lavan dos veces en PBS durante 5 minutos, se deshidratan con concentraciones crecientes de etanol y se secan bajo una corriente de aire.

Tras la preparación de las secciones se procede a la pre-hibridación durante 2 horas en cámara húmeda a 37°C con tampón de pre-hibridación:

- 50% Formamida desionizada
- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 25 mM EDTA pH 8.0
- 20 mM NaCl
- 0.25 mg/mL ARNt de levadura
- 2.5x Solución de Denhard (0.05 % Ficoll, 0.05 % Polivinilpirrolidona, 0.05 % Albumina Bovina).

Tras la retirada del tampón de pre-hibridación de los portaobjetos, las secciones se sometieron al proceso de hibridación bajo cubreobjetos durante 16 horas a 55°C con la solución de hibridación:

- 50 % Formamida desionizada
- 20 mM Tris-HCl pH 7.6
- 1 mM EDTA pH 8
- 0.3 M NaCl
- 0.2 M Ditiotritol
- 0.5 mg/mL ARNt de levadura
- 0.1 mg/mL Acido poliadenilico
- 1x Solución de Denhardt
- 10 % Dextran sulfato

Conteniendo además la **sonda antisentido marcada** ($[^{35}\text{S}]$ - Sonda) (1×10^6 cpm sonda ARN/100 μL) o la sonda sentido marcada para las secciones control.

Tras la hibridación, los cubreobjetos se quitan sumergiendo los portaobjetos en tampón citrato salino (SCC) 1x durante 15 minutos a 48°C. Posteriormente los portaobjetos se sumergen en tampón SCC 2x hasta que los cubreobjetos se despegan,

tras lo cual se realizan dos lavados de 15 minutos con el mismo tampón. Posteriormente, las secciones se tratan con RNAsa A (10 µg/mL) durante 60 minutos y se lavan dos veces en tampón SSC 2x, SSC 1x durante 5 minutos, tampón SSC 0.5x durante 60 minutos a temperatura de hibridación (55°C) y finalmente en tampón SSC 0.5x durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de los lavados, las secciones se deshidratan en un gradiente de alcohol y secadas al aire.

Para la detección de la señal, las secciones fueron expuestas a una película B-max- Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, UK) durante dos semanas.

1.6.4.3 Análisis de los Films.

Los films se analizan mediante un sistema de análisis asistido por ordenador, desarrollado por NIH Imaging (EEUU). Las densidades ópticas se miden bilateralmente en las áreas analizadas, correspondientes a CA1 y Giro dentado en el hipocampo y el núcleo del Rafe dorsal (Figura 8).

1.6.5 Técnicas Inmunohistoquímicas.

Se emplean animales sin tratar, se perfunden y el tejido será procesado como se describió en apartados anteriores. Se emplean varias técnicas, técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica simples para la puesta a punto de los distintos anticuerpos empleados y el estudio de su distribución en el tejido y técnicas de inmunofluorescencia doble para el estudio de la colocalización de los receptores estudiados. Todas estas técnicas se realizan con secciones en suspensión (free-floating) para facilitar la penetración de los anticuerpos en el tejido.

1.6.5.1 Inmunofluorescencia simple.

Mediante esta técnica se valoraran los anticuerpos anti-GALR1 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-GALR2 (Alomone Labs Ltd, Israel) y anti-5HT1A (Chemicon Intl. USA) contra los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A respectivamente, para optimizar sus condiciones de uso así como estudiar la distribución de estos receptores en los núcleos objeto de estudio como son el Hipocampo Dorsal y el núcleo Dorsal del Rafe. La información de cada anticuerpo primario se detalla en la Tabla 1. El procedimiento general se describe a continuación.

Se atemperan durante 30 minutos a temperatura ambiente las secciones y tampones. Una vez las secciones estén a temperatura ambiente, se pasan de la placa de 24 pocillos a tubos de plástico con PBS 0,01M pH7,4 y se lavan 3 veces durante 10 minutos. Todos los lavados se realizan bajo agitación continua. Posteriormente y con el

fin de desenmascarar epítomos no reactivos, por la fijación con PFA, se realiza una recuperación antigénica mediante calor, para ello las secciones se incuban durante 30 minutos a 80°C en Buffer Citrato (10mM ácido cítrico en H₂O destilada, pH 6). Tras esto, se dejan enfriar a temperatura ambiente en el buffer durante 30 minutos. Tras dos lavados con PBS, se incuban las secciones durante 20 minutos a temperatura ambiente en 10mM de Glicina en PBS 0,01M pH7,4. Este paso es fundamental para reducir la autofluorescencia de radicales aldehído. Se produce una desexcitación no radiactiva de dichos radicales o “*quenching*”. Tras dos lavados con PBS, durante 5 minutos, se realiza la permeabilización y el bloqueo de las uniones inespecíficas del tejido, incubando durante 60 minutos a temperatura ambiente, en Triton X-100 0,3% y BSA 2% en los casos de anticuerpos primarios hechos en especies distinta a la cabra o en Suero Normal de Conejo al 5% en el caso de anticuerpos primarios realizados en cabra. Posteriormente se lavan dos veces con PBS y se incuban con los anticuerpos primarios anti-GALR2 (Alomone Labs Ltd, Israel) 1/250, producido en conejo, anti-GALR1 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1/250, producido en cabra y anti-5HT1A (Chemicon Intl. USA) 1/1000, hecho en cobaya, disueltos en PBS con la sustancia de bloqueo utilizada para cada anticuerpo. La incubación se mantiene una hora a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C en nevera.

Al día siguiente, tras 3 lavados en PBS de 5 minutos, se procede al revelado de los anticuerpos primarios, para esto en el caso del anti-GALR2 se incuba con un anticuerpo anti-conejo producido en cabra, conjugado con el fluorocromo Dylight 488 (Jackson ImmunoResearch, USA), diluido a 1/100, durante 40 minutos a 37°C en oscuridad, en PBS conteniendo 2 % BSA. En el caso de los anticuerpos anti-GALR1 y anti-5HT1A se incuban con un anticuerpo biotinilado anti-cabra y anti-cobaya respectivamente diluido 1/200, para tras una hora de incubación y dos lavados con PBS ser incubados durante una 1,5 horas con Estreptavidina ligada con el fluorocromo Alexa488 (Jackson ImmunoResearch, USA) diluido 1/1000 (Para más detalle de los anticuerpos secundarios ver Tabla 2).

Tras tres lavados con PBS se añade Sudan negro (Black B), al 0,03% en etanol al 70%, durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, ya que al ser un colorante liposoluble elimina fluorescencia de fondo. Después de tres nuevos lavados con PBS se incuban las secciones con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) diluido a 1/200 en PBS 0,01M durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El DAPI se une a las regiones ricas en Adenina y Timina del ADN, con lo que teñimos los núcleos neuronales de color azul. Finalmente, y tras lavar 3 veces con PBS se montan las secciones en portaobjetos usando medio de montaje para fluorescencia (Dako), y se guardan en oscuridad a 4°C en nevera hasta su análisis.

Para verificar que el secundario no reconoce otros epítomos inespecíficos presentes en el tejido se realizan controles, en estos, el tejido no se incuba con el anticuerpo primario lo que debe resultar en una ausencia de marca específica.

1.6.5.2 Inmunohistoquímica simple.

Mediante esta técnica se valoraran los anticuerpos contra los receptores GALR1 y GALR2 para optimizar las condiciones de uso así como su distribución en los núcleos objeto de estudios tras el revelado químico de los anticuerpos. El procedimiento general se describe a continuación.

Las secciones y tampones se atemperan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez atemperadas las secciones se pasan de la placa de 24 pocillos a tubos de plástico con PBS 0,01M pH7,4 y se lavan 3 veces durante 10 minutos. Todos los lavados y la preincubación se realizan bajo agitación continua. Tras esto y con el fin de eliminar las peroxidasas endógenas existentes en el tejido se tratan con H₂O₂ al 0,6% durante 20 minutos en oscuridad y agitación. Posteriormente, tras dos lavados, se preincuban las secciones en PBS conteniendo Triton X-100 al 0,3% y 2% BSA en el caso del tejido destinado a GALR2, o Suero Normal de Conejo al 5% para las secciones destinadas a GALR1, durante 10 minutos. Las secciones se incuban con los anticuerpo anti-GALR2 (Alomone Labs Ltd, Israel) 1/250, producido en conejo y anti-GALR1 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1/250, producido en cabra (Para más información de los anticuerpos primarios ver Tabla 1). La incubación se realiza en la misma solución anterior, durante una hora a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C en nevera.

Tras 3 lavados en PBS de 10 minutos, se realiza otra preincubación con las mismas condiciones anteriores. Posteriormente se incuban de nuevo con un anticuerpo biotinilado anti-conejo (Amersham, Inglaterra), diluido 1/200, en el caso de GALR2 y un anticuerpo biotinilado anti-cabra (Vector laboratorios inc.), diluido 1/200, durante una hora a temperatura ambiente, en PBS conteniendo Triton X-100 al 0,3% y 2% BSA (GALR2) o Suero Normal de Conejo 5% (GALR1) (Para más información de los anticuerpos secundarios ver Tabla 2). Después de lavar de nuevo dos veces en PBS, se vuelven a preincubar durante 10 minutos las secciones. Posteriormente se tratan con el complejo Avidina-Biotina unido a peroxidasa (ABC Thermo Cientific) diluido 1/200 durante una hora y a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la incubación los cortes se lavan de nuevo tres veces en tampón PBS y se procede al revelado de la reacción utilizando 3- 3' Diaminobenzidina (DAB) 0,03% (DAB D-8001 Sigma Aldrich). La solución de revelado consta de 100 ml de PBS, 30 mg de DAB y 100 µl de H₂O₂ al 30 %, que al reaccionar con la peroxidasa del complejo ABC produce una coloración marrón en los somas celulares. Tras 5 minutos

de incubación la reacción se detiene lavando las secciones con PBS tres veces durante 10 minutos.

Posteriormente se deshidratan los cortes mediante lavados durante 3 minutos en el siguiente orden: uno en Agua destilada; posteriormente uno en Alcohol 60%; seguidamente uno en Alcohol 90%; dos lavados en Alcohol absoluto y finalmente uno en Xilol. A continuación, se añade medio de montaje DPX (Panreac, Barcelona, España) y se coloca un cubreobjetos. Como controles se utiliza la omisión del anticuerpo primario, lo que resulta en una señal no detectable.

1.6.5.3 Inmunofluorescencias Dobles.

Mediante esta técnica se estudiará la colocación de receptores en células de lo núcleos objeto de estudios, como son el Hipocampo dorsal y el núcleo Dorsal del Rafe. Las inmunofluorescencias dobles se realizarán para detectar los receptores GALR1-GALR2 y los receptores GALR2-5HT1A. El procedimiento general se describe a continuación.

Se atemperan durante 30 minutos a temperatura ambiente las secciones y tampones. Una vez las secciones estén a temperatura ambiente, se pasan de la placa de 24 pocillos a tubos de plástico con PBS 0,01M pH7,4 y se lavan 3 veces durante 10 minutos. Todos los lavados se realizan bajo agitación continua. Posteriormente y con el fin de desenmascarar epítomos no reactivos, por la fijación con PFA, se realiza una recuperación antigénica mediante calor, para ello las secciones se incuban durante 30 minutos a 80°C en Buffer Citrato (10mM ácido cítrico en H₂O destilada, pH 6). Tras esto, se dejan enfriar a temperatura ambiente en el buffer durante 30 minutos. Tras dos lavados con PBS, se incuban las secciones durante 20 minutos a temperatura ambiente en 10mM de Glicina en PBS 0,01M pH7,4. Este paso es fundamental para reducir la autofluorescencia de radicales aldehído. Tras dos lavados con PBS, durante 5 minutos, se realiza la permeabilización y el bloqueo de las uniones inespecíficas del tejido, incubando durante 60 minutos a temperatura ambiente, en el caso de la inmunofluorescencia doble GALR1-GALR2 en Tritón X-100 0,3% y Albumina Humana 2% y en el caso de GALR2-5HT1A en Tritón X-100 0,3% y BSA 2%. Posteriormente se lavan dos veces con PBS y se incuban, ambas inmunofluorescencias doble, con el anticuerpo primario anti-GALR2 (AGR-012, Alomone Labs Ltd, Israel) 1/250, producido en conejo, disueltos en PBS con la sustancia de bloqueo utilizada para cada inmunofluorescencia. La incubación se mantiene una hora a temperatura ambiente y durante la noche a 4°C en nevera.

Al día siguiente, tras 3 lavados en PBS de 5 minutos, ambas inmunofluorescencias, se incuban con un anticuerpo anti-conejo producido en ratón, conjugado con el fluorocromo rojo Dylight 549 (Jackson ImmunoResearch, USA) (Para más información de los anticuerpos secundarios ver Tabla 2), diluido a 1/100, durante 40 minutos a 37°C en oscuridad, en PBS conteniendo la sustancia de bloqueo específica para cada inmunofluorescencia doble. Tras tres lavados de 10 minutos en PBS se incubaba el segundo anticuerpo primario, en el caso de la inmunofluorescencia GALR1-GALR2, anti-GALR1 (Santa Cruz Biotechnology INC, EEUU) producido en cabra, en una dilución 1/250 y en el caso de GALR2-5HT1A, anti-5HT1A (Chemicon, USA) producido en cobaya, en una dilución 1/1000. Se incubaba en PBS con su correspondiente sustancia de bloqueo, durante una hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C en nevera.

Al día siguiente, tras tres lavados con PBS, se incubaba con el segundo secundario, que serán en el caso de la inmunofluorescencia GALR1-GALR2 y GALR2-5HT1A un anticuerpo biotinilado anti-cabra y anti-cobaya respectivamente diluido 1/200, para tras una hora de incubación y dos lavados con PBS ser incubados durante una 1,5 horas con Estreptavidina ligada con el fluorocromo Alexa488 diluido 1/1000 (Jackson ImmunoResearch, USA) (Para más información de los anticuerpos secundarios ver Tabla 2). Tras tres lavados con PBS se añade Sudan negro (Black B), al 0,03% en etanol al 70%, durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, ya que al ser un colorante liposoluble elimina fluorescencia de fondo. Después de tres nuevos lavados con PBS las secciones de la inmunofluorescencia GALR2-5HT1A se incuban con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) diluido a 1/200 en PBS 0,01M durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El DAPI se une a las regiones ricas en Adenina y Timina del ADN, con lo que teñimos los núcleos neuronales de color azul. Finalmente, y tras lavar 3 veces con PBS se montan las secciones en portaobjetos usando medio de montaje para fluorescencia (Dako), y se guardan en oscuridad a 4°C hasta su análisis.

Para verificar que no existen reacciones cruzadas entre el secundario de un receptor y el primario del otro receptor se realizan controles, con omisión del anticuerpo primario correspondiente.

Antígeno	Generado en	Origen	Tipo
Receptor GALR1	Cabra	Santa Cruz Biotechnology (USA) C-20	Policlonal
Receptor GALR2	Conejo	Alomone Lab. (Israel) AGR-012	Policlonal
Receptor 5HT1A	Cobaya	Chemicon Intl. (USA) AB5406	Policlonal

Tabla 1. Información de Anticuerpos primarios utilizados.

Detecta	Generado en	Origen	Característica
IgG Conejo	Cabra	Jackson Immunoresearch (USA)	Dylight 488 (Verde)
IgG Cabra	Conejo	Vector Laboratories inc.	Biotinilado
IgG Cobaya	Burro	Jackson Immunoresearch (USA)	Biotinilado
IgG Conejo	Burro	Amersham, Inglaterra	Biotinilado
IgG Conejo	Ratón	Jackson Immunoresearch (USA)	Dylight 549 (Rojo)

Tabla 2. Información de Anticuerpos secundarios utilizados.

1.6.5.4 Análisis de las técnicas inmunohistoquímicas.

Las imágenes de los experimentos de inmunofluorescencia se realizan mediante **microscopía confocal**, utilizando el microscopio Leica Sp5. Este equipo dispone de láseres para la excitación a 405 nm de longitud de onda para DAPI y a 488 nm y 549 nm para la excitación de los fluorocromos ligados a los anticuerpos secundarios utilizados. Las imágenes se realizaron de forma secuencial, para evitar posibles solapamientos de los espectros de emisión de los diferentes fluorocromos. En el caso de las inmunofluorescencias dobles se utilizaron cuatro canales, uno para el DAPI, otro para la emisión en verde y otro para la emisión roja, el último canal es para la fusión de la emisión verde y la roja (“merge”) dando un color amarillo-anaranjado en las zonas donde se fusionan ambos espectros. La fusión de ambas señales permite estudiar la colocalización de los receptores ensayados.

Las imágenes de los experimentos de inmunohistoquímica fueron tomadas mediante **microscopía óptica**, utilizando el microscopio óptico Nikon Optiphot-2 acoplado a una video cámara Olympus UC30 unida a un ordenador y controlado por un programa informático.

1.6.6 Ligazón por proximidad (PLA) en tejido.

Mediante esta técnica estudiaremos si los receptores estudiados se encuentran en estrecha proximidad así como su localización en los núcleos objeto de estudio como el Hipocampo Dorsal y el núcleo Dorsal del Rafe. Esta estrecha proximidad posibilitaría la formación de complejos heterodímeros. Las pruebas de PLA realizadas se utilizan para los receptores GALR1-GALR2, GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A siguiendo protocolos previamente descritos (Borroto-Escuela et al., 2012) así como las instrucciones del fabricante (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia).

El PLA está basado en una técnica inmunohistoquímica, en la que la hibridación de los oligonucleótidos acoplados a los anticuerpos secundarios posibilita su ligazón y amplificación al estar situados en proximidad, detectándolo mediante un fluorocromo específico (Gullberg et al., 2010; Borroto-Escuela et al., 2013) (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia). La reacción sólo se produce si ambos receptores están a una distancia de entre 10 y 20 nm (Borroto-Escuela et al., 2013).

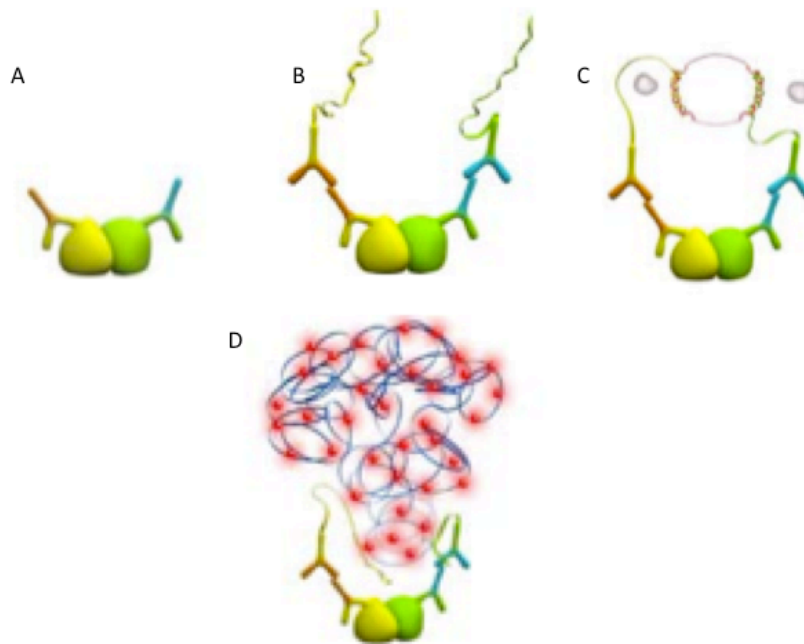


Figura 9. Ilustración que muestra la secuencia de las reacciones producidas en la técnica de ligazón por proximidad o PLA. (A) Anticuerpos primarios unidos a su epítipo. (B) Detección de los anticuerpos primarios mediante los anticuerpos secundarios ligados a la secuencia de oligonucleótidos. (C) Hibridación de los oligonucleótidos. (D) Amplificación de la secuencia y marcaje de esta mediante fluorocromo.

El procedimiento experimental se realiza utilizando animales sin tratar, perfundidos y el tejido será procesado como se describió en apartados anteriores. Se utilizarán secciones en suspensión (free-floating) para favorecer la penetración de los anticuerpos y demás reactivos. El procedimiento general se describe a continuación.

Se atemperan durante 30 minutos a temperatura ambiente las secciones y tampones. Una vez atemperadas, se pasan las secciones de la placa de 24 pocillos a tubos de plástico con PBS 0,01M pH7,4 y se lavan 3 veces durante 10 minutos. Todos los lavados se realizan bajo agitación continua. Tras esto y con el fin de desenmascarar epítomos no reactivos, por la fijación con PFA, se realiza una recuperación antigénica mediante calor donde se incuban las secciones durante 30 minutos a 80°C en Buffer Citrato (10mM ácido cítrico en H₂O destilada, pH 6) y se dejan enfriar a temperatura ambiente en el buffer durante 30 minutos más. Tras esto, se realizan dos lavados con PBS y se incuban las secciones durante 20 minutos a temperatura ambiente en 10mM de Glicina en PBS 0,01M pH7,4 paso fundamental para reducir la autofluorescencia de radicales aldehído. Posteriormente y tras dos lavados con PBS durante 5 minutos, se realiza la permeabilización y el bloqueo de las uniones inespecíficas del tejido, incubando durante 60 minutos a temperatura ambiente en PBS conteniendo Tritón X-100 0,3% y Albumina Humana 2%. Posteriormente se incuban las secciones con los dos anticuerpos primarios correspondientes en PBS con Albumina humana al 2%, durante toda la noche a 4°C. La información de los anticuerpos primarios se detalla en la Tabla 3.

Una vez transcurrida la incubación con los anticuerpos primarios se realizan dos lavados de 5 minutos en Buffer A (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia) y se incuban las secciones con los dos anticuerpos secundarios unidos a los oligonucleótidos correspondientes, a una dilución 1/5, durante 60 minutos a 37°C. La información de los anticuerpos secundarios se detallan en la Tabla 4. A continuación se realizan dos nuevos lavados y se incuban las secciones durante 30 minutos a 37°C en presencia de la ligasa a una dilución 1/40, para producir la reacción de ligazón. Seguidamente tras dos lavados con PBS se añade la polimerasa a una dilución 1/80 y se incuban las secciones durante 100 minutos a 37°C, para proceder a la amplificación y marcaje de la secuencia de oligonucleótidos. Después de lavar dos veces con Buffer B (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia) durante 10 minutos y un lavado rápido en Buffer B a 0.1X, se montan las secciones sobre un portaobjetos y se dejan secar a temperatura ambiente en oscuridad. Se añade una gota de medio de montaje con DAPI y se cubre con un cubreobjetos, sellándolo con laca de uñas. Las muestras se mantienen a -20°C hasta su análisis con el microscopio confocal.

Ensayo	Antígeno	Generado en	Origen	Características
GALR1-GALR2	Receptor GALR1	Cabra	Santa Cruz Biotec. (USA) C-20	Policlonal Uso 1/250.
	Receptor GALR2	Conejo	Alomone Lab. (Israel) AGR-012	Policlonal Uso 1/250.
GALR1-5HT1A	Receptor GALR1	Cabra	Santa Cruz Biotec. (USA) C-20	Policlonal Uso 1/250.
	Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, Clon 19A9.2 Uso 1/400
GALR2-5HT1A	Receptor GALR2	Conejo	Alomone Lab. (Israel) AGR-012	Policlonal Uso 1/250.
	Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, Clon 19A9.2 Uso 1/400

Tabla 3. Información de anticuerpos primarios utilizados con la técnica de ligazón por proximidad.

Ensayo	Detecta	Generado en	Origen	Características
GALR1-GALR2	IgG Cabra	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda MINUS Uso 1/5
	IgG Conejo	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda PLUS Uso 1/5
GALR1-5HT1A	IgG Cabra	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda MINUS Uso 1/5
	IgG Ratón	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda PLUS Uso 1/5
GALR2-5HT1A	IgG Conejo	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda PLUS Uso 1/5
	IgG Ratón	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda MINUS Uso 1/5

Tabla 4. Información de anticuerpos secundarios ligados a sonda de oligonucleótido utilizados con la técnica de ligazón por proximidad.

1.6.6.1 Análisis mediante microscopía confocal.

Si ambos receptores estudiados están a una distancia de entre 10 a 20 nm forman unos puntos fluorescentes de color rojo que se observan en el microscopio (excitados con una longitud de onda de 561 nm). La fluorescencia de DAPI, que marca núcleos, se observa de color azul (excitados con una longitud de onda de 405 nm). Ambos se visualizan con un objetivo de 63X en aceite de inmersión. Para el análisis se emplea un microscopio confocal (Leica, sp5) con dos láseres activos de excitación y dos canales separados de recepción de la emisión. Para la cuantificación se realizan un mínimo de 8 imágenes por núcleo a estudiar conteniendo de 10 a 20 células cada una, por tanto cada zona estudiada estará representada por entre 80 y 160 células cuantificadas. La cuantificación se realiza mediante el software específico Blobfinder (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia).

1.6.7 Generación de animales Knockdown para el receptor GALR2.

Para la generación de animales knockdown del receptor GALR2 se siguen procedimientos previamente descritos (Nakajima *et al*, 2012).

Los animales con reducción de la expresión (knockdown) del receptor GALR2 se generan mediante una inyección simple de siRNA dirigido contra el mRNA del receptor GALR2 vía intracerebroventricular. Para ello, en primer lugar se implanta una cánula crónica intracerebroventricular lateral, mediante cirugía estereotáxica, como se describe en detalle en apartados anteriores de esta tesis.

Una vez implantada la cánula intracerebroventricular y con el animal anestesiado y colocado en el aparato de estereotáxia se realiza una única inyección icv, de 5µg (0.35 nmol) de Accell Smart pool siRNA GalR2 (Dharmacon), utilizando como vehículo el medio de cultivo Acell siRNA Delivery Media (Dharmacon) en un volumen final de 5µL. El compuesto Accell Smart pool siRNA GalR2 (Dharmacon) está formado por cuatro siRNA distintos dirigidos a silenciar el gen del receptor GALR2, además el sistema Accell, consiste en una modificación química que hace que estos siRNA puedan entrar en las células sin necesidad de utilizar un reactivo de transfección y les confiere una mayor resistencia a la degradación por RNAsas.

De la misma manera que se generan los animales knockdown GALR2, se generan animales control, inyectados únicamente con el vehículo (Acell siRNA Delivery Media) y animales siRNA Control, que son animales inyectados con Acell Non-targeting pool (Dharmacon), consistente en un pool de cuatro siRNAs sin diana, para verificar que el sistema Accell no tiene efecto sobre los animales.

Una vez generados los animales knockdown GALR2 realizamos una curva de tiempo midiendo los niveles de expresión del receptor GALR2 mediante la técnica de inmunohistoquímica y los niveles de expresión del mRNA de GALR2 mediante RT-qPCR, para determinar el día de mínima expresión del receptor. También se usarán los animales knockdown GALR2 en pruebas de comportamiento y el tejido de estos animales se usará en inmunofluorescencia doble y la técnica de ligazón por proximidad como se detallará a continuación.

1.6.7.1 Análisis de la expresión de GALR2 mediante inmunohistoquímica en animales Knockdown GALR2.

Los animales inyectados con siRNA GALR2 se sacrifican 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días tras la inyección mediante perfusión cardiaca. Los cerebros son procesados y cortados como se explica en apartados anteriores, y posteriormente se realiza con este tejido una inmunohistoquímica contra el receptor GALR2, como se describe en detalle en el apartado 1.6.5.2 de esta misma sección. Como controles se utilizaron animales inyectados con vehículo (Delivery Media)

Para medir el nivel de expresión de GALR2, se cuantificó la señal obtenida de la inmunohistoquímica contra GALR2 en dos zonas distintas, la zona CA1 del Hipocampo dorsal, por ser uno de los núcleos objeto de estudio y la corteza Piriforme, zona alejada del ventrículo, para comprobar la difusión efectiva del siRNA tras la administración icv. La cuantificación se realizó mediante la medición de la densidad óptica de la señal obtenida con el programa ImageJ (NIH, EEUU).

Para la realización de la cuantificación, se utilizaron dos animales por día de tratamiento, de los cuales se usaron cuatro cortes de tejido por animal, teniendo finalmente ocho cortes por núcleo y día de tratamiento.

Se tomaron imágenes de estos cortes mediante microscopía óptica y sobre estas se hicieron tres medidas de la densidad óptica, por núcleo, a las que se les restó la medida de densidad óptica del fondo de la imagen, con el fin de normalizar la medida.

1.6.7.2 Análisis de la expresión de ARNm de GALR2 mediante RT-qPCR en animales Knockdown GALR2.

La cuantificación del mRNA GALR2 se realiza en animales inyectados con siRNA GALR2 4, 6, 8 y 14 días, utilizándose cuatro animales por día. De la misma manera se inyectan cuatro animales con el vehículo (Delivery Media) que servirán como grupo control. Los animales son sacrificados mediante decapitación y los cerebros fueron extraídos rápidamente. La **disección del hipocampo** se realiza manualmente mediante unas pinzas, sobre una superficie de cristal en contacto con hielo, para mantener la superficie fría e intentando que el proceso sea lo mas rápido y limpio posible para

evitar la degradación del RNA del tejido (Figura 10). Con las pinzas se separan los dos hemisferios cerebrales y se extrae cada hipocampo (Derecho e izquierdo) con cuidado de mantener la orientación dorsal-ventral. Una vez extraído se divide por la mitad, con un bisturí, considerando que la mitad superior corresponde con el Hipocampo dorsal y la mitad inferior con el Hipocampo ventral. El tejido se guarda en un tubo eppendorf estéril en hielo seco para su rápida congelación, posteriormente se guarda a -80°C hasta su posterior procesamiento.

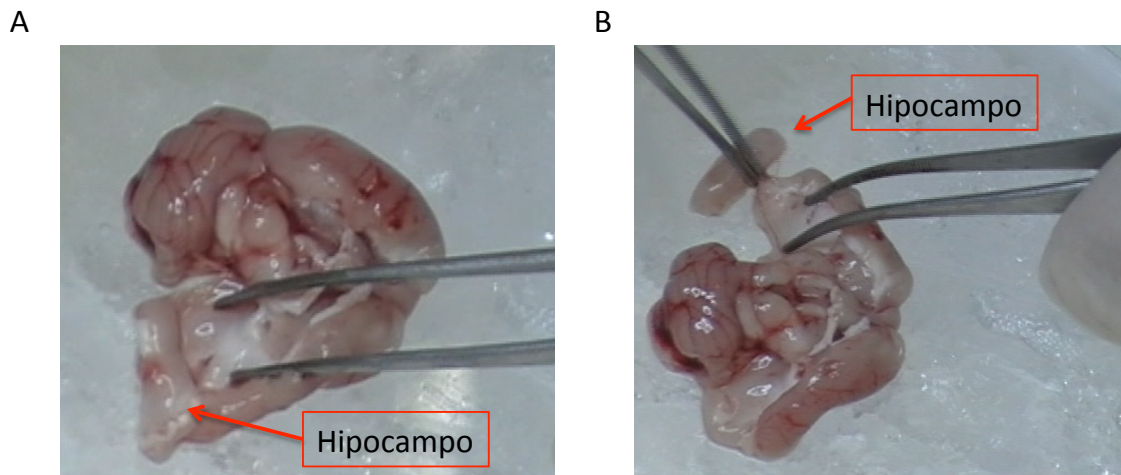


Figura 10. Fotografías representativas de la disección del hipocampo en el cerebro de rata.

Una vez disponemos del tejido, se procede a realizar la **extracción de RNA**, mediante un kit de purificación específico para tejido rico en lípidos, RNeasy Lipid Tissue Kit Mini Kit (Qiagen), siguiendo las especificaciones y el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el RNA, se mide la pureza de este en el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) mediante el ratio 260/280 nm, posteriormente se alícuota y se congela a -80°C hasta el siguiente paso.

Posteriormente, se tratan las muestras de RNA purificadas con un **enzima DNasa**, para la eliminación de DNA genómico que pueda estar presente en las muestras, con el kit Recombinant DNase I (Rnase-free) (Takara biotechnology), siguiendo el protocolo del fabricante. Se incuban las muestras con la DNasa I en un termobloque durante 30 minutos a 37°C seguido de un paso de 10 minutos a 80°C para inactivar el enzima. Una vez finalizado el tratamiento con DNasa, se procede a realizar la **retrotranscripción** de las muestras, para generar cDNA, que servirá de molde para la PCR. Para la retrotranscripción se utiliza el kit Reverse Transcriptase Core kit (Eurogentec), siguiendo las instrucciones del fabricante, donde los cebadores utilizados son oligonucleótidos noameros aleatorios y el programa consta de un primer paso de 10 minutos a 25°C , el paso de retrotranscripción durante 30 minutos a 48°C y un paso final de inactivación del enzima de 5 minutos a 95°C . Finalmente se realiza con las muestras la **qPCR**, esta se lleva a cabo en el termociclador 7500 Real Time PCR system

(Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron por triplicado usando como reactivo el Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

En la PCR se realizan controles negativos de dos tipos, controles sin muestra, para descartar contaminaciones y controles sin retrotranscribir, donde la muestra es RNA, este sirve para descartar la contaminación con DNA genómico, además se utiliza el gen de expresión constante (housekeeping) GAPDH, para normalizar las muestras y corregir diferencias en cantidad de carga y en amplificación. Para realizar la PCR se utilizaron las siguientes secuencias cebadoras:

- GALR2-Derecho : 5'-AACAGGAATCCACAGACC
- GALR2- Inverso: 5'-CCCTTTGGTCCTTTAACAAG
- GAPDH-Derecho: 5'-GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTC
- GAPDH-Inverso: 5'-GAGGCTGGCACTGCACAA

Se siguió un programa estándar para la amplificación de las muestras consistente en una fase de 2 min a 50°C seguida de 10 min a 95°C, posteriormente se realizan 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°. Finalmente se realizó a las muestras una curva de disociación (melting) donde se sube gradualmente la temperatura, induciendo la desnaturalización de los productos de DNA de doble cadena, lo que reduce la fluorescencia del colorante (SYBR Green) que se unen a la doble cadena. Permitiendo diferenciar productos específicos de no específicos.

Se realizó una cuantificación relativa del mRNA respecto del grupo control (animales inyectados con Delivery Media) y los datos se analizaron mediante el sistema informático de Applied por el método comparativo de Ct ($\Delta\Delta Ct$), normalizando las medidas con la expresión de GADPH.



Figura 11. Sistema de PCR a tiempo real 7500 de Applied Biosystems.

1.6.7.3 Pruebas de comportamiento animal con animales Knockdown GALR2.

Se valora el comportamiento de los animales con reducción de la expresión del receptor GALR2 en las pruebas del campo abierto y la natación forzada.

Una vez conocida, mediante las curvas de tiempo realizadas anteriormente, los días de menor expresión del receptor GALR2, los animales knockdown GALR2 realizan las pruebas de comportamiento del campo abierto (7 días después de la administración del siRNA GALR2) y de la natación forzada (9 días después de la administración del siRNA GALR2) (Figura 12), según el procedimiento descrito anteriormente. Además de valorar el comportamiento de los animales con reducción de la expresión de GALR2 en las pruebas de conducta, también se valorará la conducta, en estas pruebas, de animales inyectados con el vehículo (Delivery Media) así como los animales siRNA Control.

Además, un grupo de ratas knockdown GALR2 serán inyectadas con GAL(1-15) 3 nmol, para estudiar como la bajada del número de receptores GALR2 influye en el efecto producido por el fragmento GAL(1-15) en las pruebas del campo abierto y la natación forzada.

El tejido cerebral de los animales que realizan estas pruebas de comportamiento, será fijado mediante perfusión cardiaca y congelado a -80°C para su posterior utilización en técnicas de inmunofluorescencia doble y ligazón por proximidad.

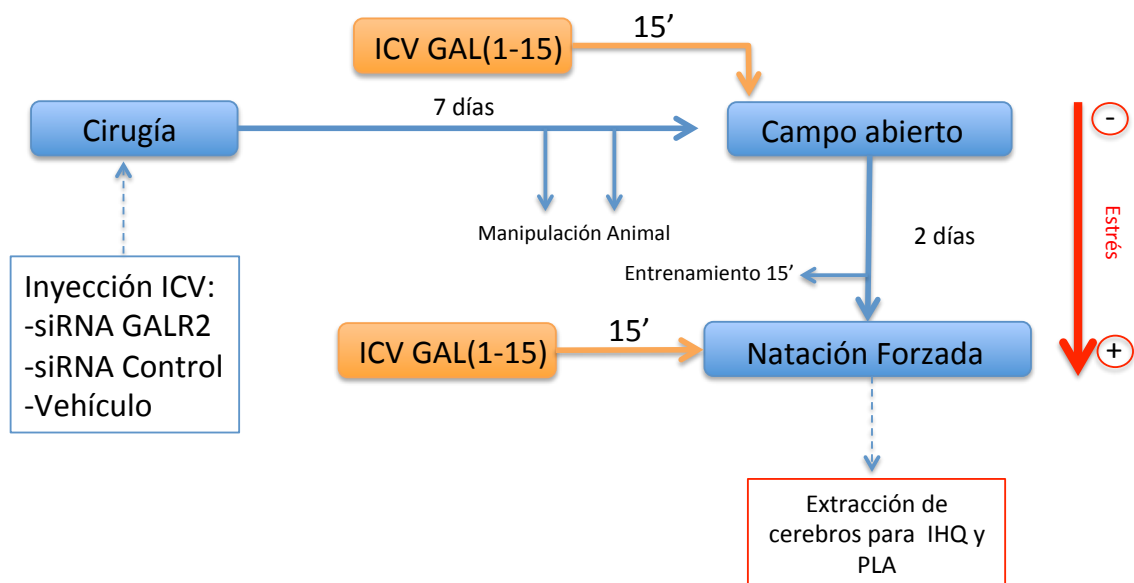


Figura 12. Esquema representativo del protocolo a seguir en la valoración de la conducta de animales knockdown GALR2 en las pruebas del campo abierto y la natación forzada.

1.6.7.4 Inmunofluorescencia doble GALR1/GALR2 en tejido de rata knockdown GALR2.

Se realiza la técnica de inmunofluorescencia doble contra los receptores GALR1 y GALR2 en tejido de animales knockdown GALR2 que han realizado anteriormente las pruebas de comportamiento, tal y como se indica en la Figura 12. El procedimiento de esta técnica se detalla en apartados anteriores de esta tesis.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia doble contra GALR1 y GALR2, se pretende comprobar como los animales knockdown, que previamente realizan las pruebas del campo abierto y de la natación forzada, presentan la expresión de GALR2 en las zonas del Hipocampo dorsal y el núcleo dorsal de Rafe, así como la colocalización celular de los receptores GALR1 y GALR2 en estos núcleos. Además, mediante esta técnica podemos comprobar la especificidad del anticuerpo anti-GALR2 utilizado, ya que una de las formas de comprobación de la especificidad de los anticuerpos es mediante la reacción de este en un tejido con una reducción de su proteína diana (knockdown) (Michel et al., 2009).

1.6.7.5 Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en tejido de rata knockdown GALR2.

Se realiza la técnica de ligazón por proximidad contra los receptores GALR1 y GALR2 en animales knockdown GALR2 que previamente realizan las pruebas de comportamiento (Figura 12). El protocolo de este experimento se detalla en apartados anteriores de esta tesis.

Mediante la técnica del PLA contra GALR1 y GALR2 en animales inyectados con siRNA GALR2 y que han realizado, previamente, las pruebas de comportamiento del campo abierto y la natación forzada, se pretende estudiar la proximidad entre ambos receptores, lo que permitiría la formación de complejos heterodímeros, en las zonas del Hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe. Así, como cuantificar el número de estos complejos heterodímeros, en estos núcleos.

1.7 Grupos experimentales.

1.7.1 Pruebas de comportamiento animal.

1.7.1.1 GAL(1-15)

Los animales se distribuyen aleatoriamente en grupos experimentales, estos se conformaron como se detalla a continuación:

- Analizar el efecto de la GAL(1-15) en pruebas de ansiedad y depresión animal.

En los experimentos realizados para estudiar el papel del fragmento GAL(1-15) en pruebas relacionadas con la ansiedad y la depresión, se sigue el procedimiento siguiente (Figura 13). Los animales tras los dos días de manipulación y habituación a la sala de conducta, realizarán en primer lugar el Test del campo abierto, posteriormente el laberinto elevado en cruz y por último el test de la natación forzada. Entre cada prueba se esperará siete días para evitar que el efecto de una prueba afecte a la siguiente, además el orden de los test es de menor a mayor generación de estrés para el animal, por el mismo motivo. A los animales se les realizará una inyección ICV, 15 minutos antes de la realización de cada test como se muestra en la Figura 13.

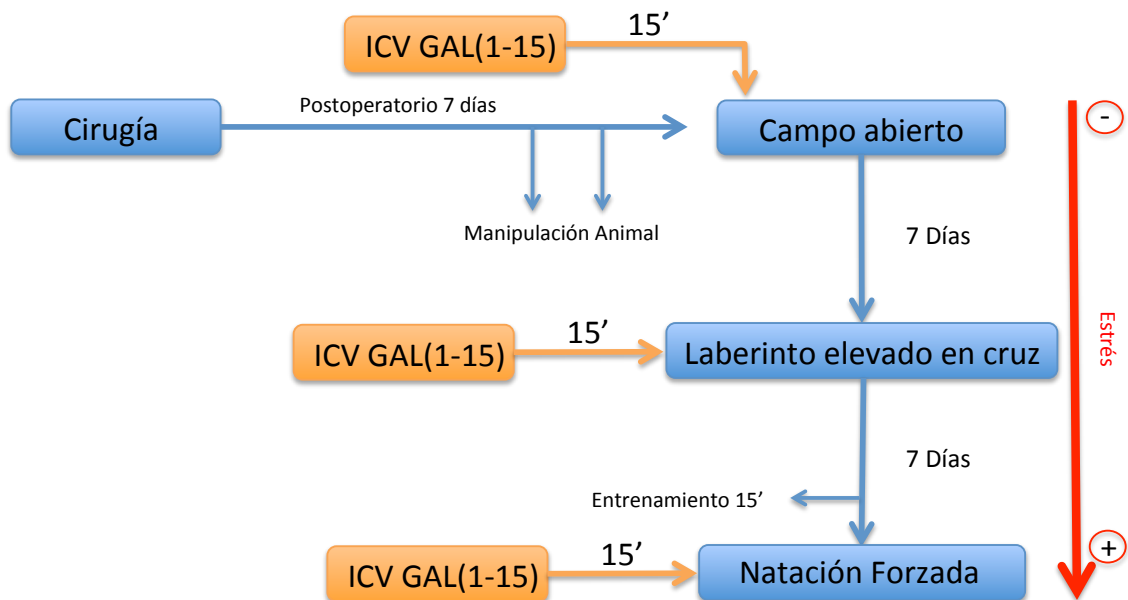


Figura 13. Procedimiento de realización de pruebas de conducta en el estudio del papel de la GAL(1-15) en las pruebas del campo abierto, laberinto elevado en cruz y natación forzada.

Grupo	Dosis
Controles 1	LCRa
GAL(1-15)	1 nmol
Controles 2	LCRa
GAL(1-15)	3 nmol
Controles 3	LCRa
GAL(1-15)	6 nmol

Tabla 5. Grupos experimentales de animales en las pruebas del campo abierto, laberinto elevado en cruz y natación forzada. N=6-12 ratas por grupo.

Un grupo diferente de animales tras los dos días de manipulación y habituación a la sala de conducta realizarán el test de evitación pasiva, que consta, de dos sesiones, una de entrenamiento del animal y otra de test, realizando en este caso la inyección ICV 15 minutos antes del entrenamiento. (Figura 14)



Figura 14. Procedimiento de realización de prueba de conducta en el estudio del papel de la GAL(1-15) en la prueba de Evitación pasiva (A). Procedimiento de inyección de la GAL(1-15) en la prueba de Evitación pasiva (B).

Grupo	Dosis	Número
Controles 1	LCRa	6
GAL(1-15)	1 nmol	10
Controles 2	LCRa	8
GAL(1-15)	3 nmol	7
Controles 3	LCRa	8
GAL(1-15)	6 nmol	9

Tabla 6. Grupos experimentales de animales en la prueba de evitación pasiva.

- Analizar la comparación entre la acción de la GAL(1-15) y de la GAL en pruebas de comportamiento animal.

En los experimentos realizados para analizar la comparación entre la acción de la GAL(1-15) y la GAL en las pruebas del campo abierto y de la natación forzada se realizan dos experimentos, en el primero, los animales realizan el test del campo abierto y en el segundo realizan el test de la natación forzada, como se indica en la Figura 15.

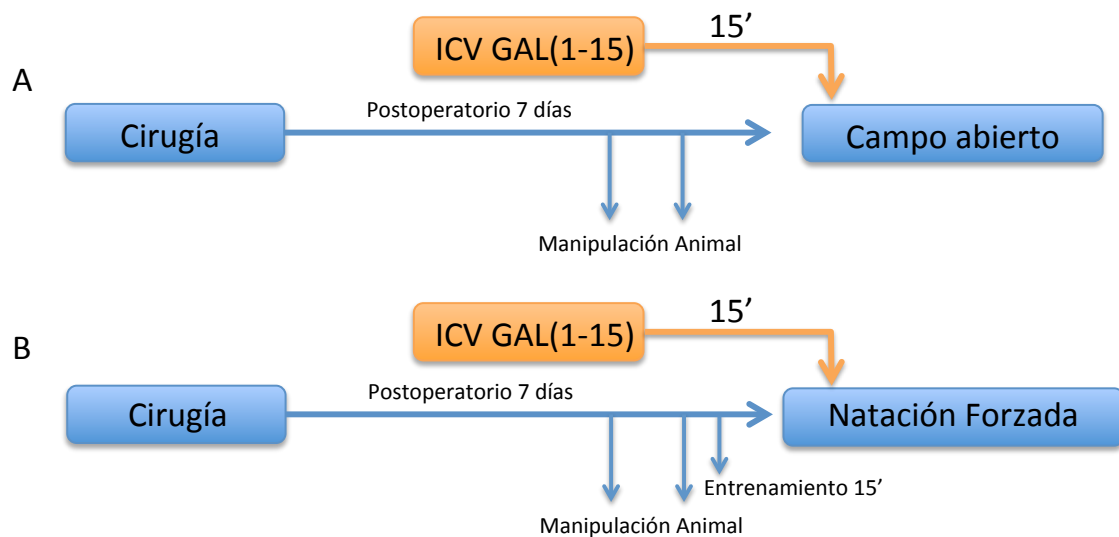


Figura 15. Procedimiento de realización de pruebas de conducta en la comparación del efecto de la GAL(1-15) y la GAL en las pruebas del campo abierto (A) y natación forzada (B).

Grupo	Dosis	Número
Controles 1	LCRa	5
GAL	3 nmol	8
Controles 2	LCRa	12
GAL(1-15)	3 nmol	6

Tabla 7. Grupos experimentales de animales en la comparación del efecto de la GAL(1-15) y la GAL en la prueba del campo abierto.

Grupo	Dosis	Número
Controles	LCRa	15
GAL	3 nmol	7
GAL(1-15)	3 nmol	7

Tabla 8. Grupos experimentales de animales en la comparación del efecto de la GAL(1-15) y la GAL en la prueba de la natación forzada.

- Analizar la acción del antagonista del GALR2 M871 en el efecto inducido por la GAL(1-15) en las pruebas del campo abierto y la natación forzada.

Los experimentos para el análisis de la acción del antagonista de GALR2 M871 en el efecto de la GAL(1-15), se llevaron a cabo como indica la Figura 16, donde los animales tras los días de manipulación, realizan en primer lugar la prueba del campo abierto y 7 días después la prueba de la natación forzada, realizando primero la prueba que menos estrés genera a los animales, de manera que la primera prueba no influya en la que se realiza posteriormente.

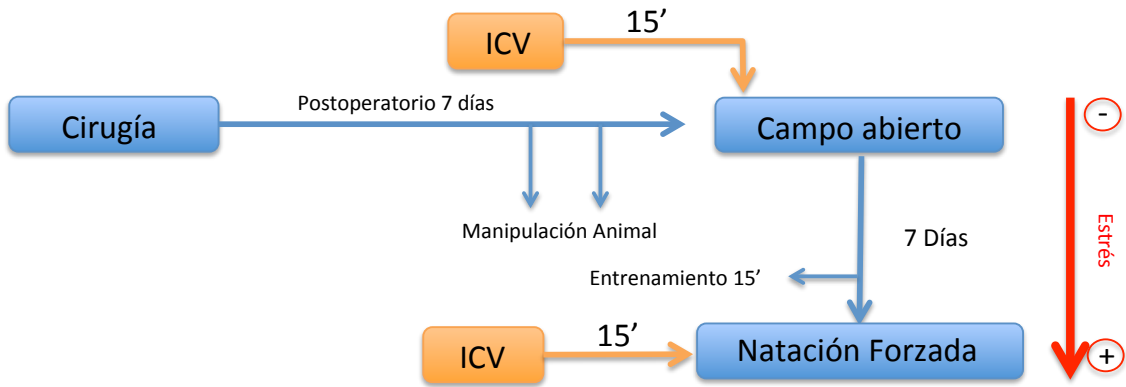


Figura 16. Procedimiento de realización de pruebas de conducta en el estudio de la acción del M871 en el efecto producido por la GAL(1-15) en las pruebas del campo abierto y la natación forzada.

Grupo	Dosis	Número
Controles	LCRa	12/13
GAL(1-15)	3 nmol	6/7
M871	3 nmol	7/8
GAL(1-15)+M871	3 nmol + 3 nmol	8/8

Tabla 9. Grupos experimentales de animales en el estudio de la acción del M871 en el efecto producido por la GAL(1-15) en las pruebas del campo abierto y la natación forzada (número de animales empleado en cada prueba respectivamente).

- Animales Knockdown GALR2.

Los animales knockdown GALR2 se emplearon en experimentos de inmunohistoquímica y RT-qPCR para determinar la curva de tiempo de expresión del receptor y en las pruebas de comportamiento del campo abierto y la natación forzada, según el protocolo que se detalla en el apartado 1.7.8 de esta sección. Además el tejido de estas ratas knockdown GALR2 se utiliza para los experimentos de inmunofluorescencia doble y ligazón por proximidad, como también se indica en el mismo apartado.

Grupo/tratamiento	Día	Número
Vehículo (DM)	4	4
siRNA GALR2	4	2
siRNA GALR2	6	2
siRNA GALR2	8	4
siRNA GALR2	10	2
siRNA GALR2	12	2
siRNA GALR2	14	2

Tabla 10. Tabla de los grupos experimentales utilizados para la realización de la curva de tiempo mediante inmunohistoquímica de los animales knockdown GALR2.

Grupo/tratamiento	Día	Número
Vehículo (DM)	4	4
siRNA GALR2	4	4
siRNA GALR2	6	4
siRNA GALR2	8	4
siRNA GALR2	14	4

Tabla 11. Tabla de los grupos experimentales utilizados para la realización de la curva de tiempo mediante RT-qPCR de los animales knockdown GALR2.

Grupo/tratamiento	Día	Número
Vehículo (DM)	4	5/5
siRNA Control	4	5/5
siRNA GALR2	7/9	7/8
siRNA GALR2 +GAL(1-15) 3nmol	7/9	8/8

Tabla 12. Tabla de los grupos experimentales utilizados para la realización de las pruebas del campo abierto y de la natación forzada (día y número respectivamente) con los animales knockdown GALR2.

1.7.1.2 Interacción GAL(1-15)/5HT1A.

1.7.1.2.1 Interacción de 8-OH-DPAT (SC. 20 min.) y GAL(1-15) (ICV 15 min.) en pruebas de comportamiento.

En los experimentos realizados para estudiar la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A se siguió el siguiente procedimiento (Figura 17). Los animales, tras los dos días de manipulación y habituación a la sala de comportamiento, realizaron la prueba de natación forzada y siete días después, el mismo grupo, realizó el test del campo abierto para evaluar parámetros de actividad locomotora. Los animales fueron administrados por vía subcutánea, con el tratamiento correspondiente de 8-OH-DPAT, 20 minutos antes de realizar el test y la inyección icv de GAL(1-15) se realizó 15 minutos antes de la prueba (Figura 17 A).

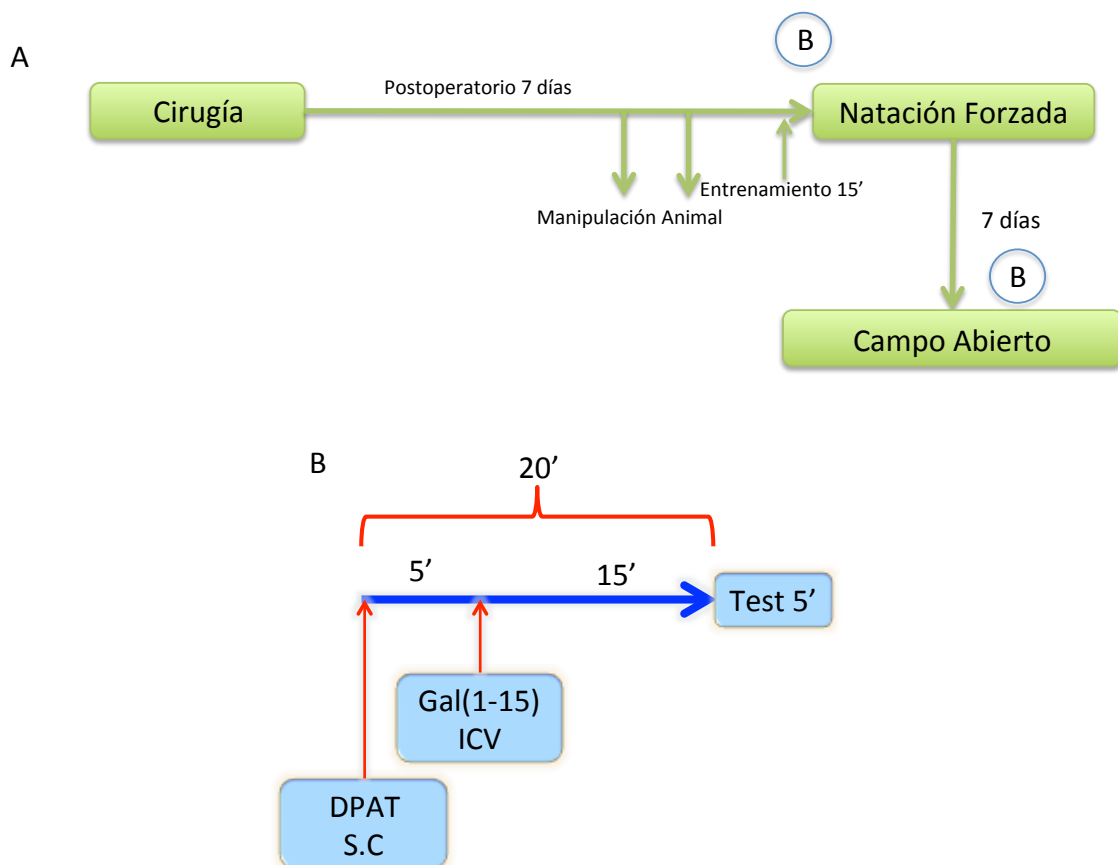


Figura 17. Procedimiento de realización de pruebas de conducta en el estudio de la interacción del fragmento GAL(1-15) con el receptor 5HT1A en las pruebas de la natación forzada y campo abierto (A). Protocolo de administración de las sustancias ensayadas (B).

- Analizar el efecto del 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto.

Se estudia el efecto de dos dosis del agonista de los receptores 5HT_{1A} 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Figura 17 A), administrando 8-OH-DPAT vía subcutánea 20 minutos antes de la prueba y LCRa 15 minutos antes de la prueba (Figura 17 B).

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	11/10
8-OH-DPAT +LCRa	0.25 mg/Kg	8/9
8-OH-DPAT +LCRa	0.125 mg/Kg	2/2
8-OH-DPAT +LCRa	0.0625 mg/Kg	5/6

Tabla 13. Grupos experimentales de animales de la curva dosis respuesta de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto (número de animales empleado en cada prueba respectivamente).

- Analizar el efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	11/9
8-OH-DPAT +LCRa	0.0625 mg/Kg	6/5
8-OH-DPAT + GAL(1-15)	0.0625 mg/Kg + 1 nmol	7/9

Tabla 14. Grupos experimentales de animales de la coadministración de dosis no efectivas de GAL(1-15) y de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto (número de animales empleado en cada prueba respectivamente).

- Analizar el efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	9/9
8-OH-DPAT +LCRa	0.25 mg/Kg	8/10
8-OH-DPAT + GAL(1-15)	0.25 mg/Kg + 1 nmol	8/7

Tabla 15. Grupos experimentales de animales de la coadministración de la dosis no efectivas de GAL(1-15) y la efectiva de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto (número de animales empleado en cada prueba respectivamente).

1.7.1.2.2 Interacción de 8-OH-DPAT (SC. 60 min.) y GAL(1-15) (ICV 15 min.) en pruebas de comportamiento.

En los experimentos realizados para estudiar la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A se siguió el siguiente procedimiento (Figura 18). Los animales, tras los dos días de manipulación y habituación a la sala de comportamiento, realizaron la prueba de natación forzada y siete días después, el mismo grupo, realizó el test del campo abierto para evaluar parámetros de actividad locomotora. Los animales fueron administrados por vía subcutánea, con el tratamiento correspondiente de 8-OH-DPAT, 60 minutos antes de realizar el test y la inyección icv de GAL(1-15) se realizó 15 minutos antes de la prueba (Figura 18B).

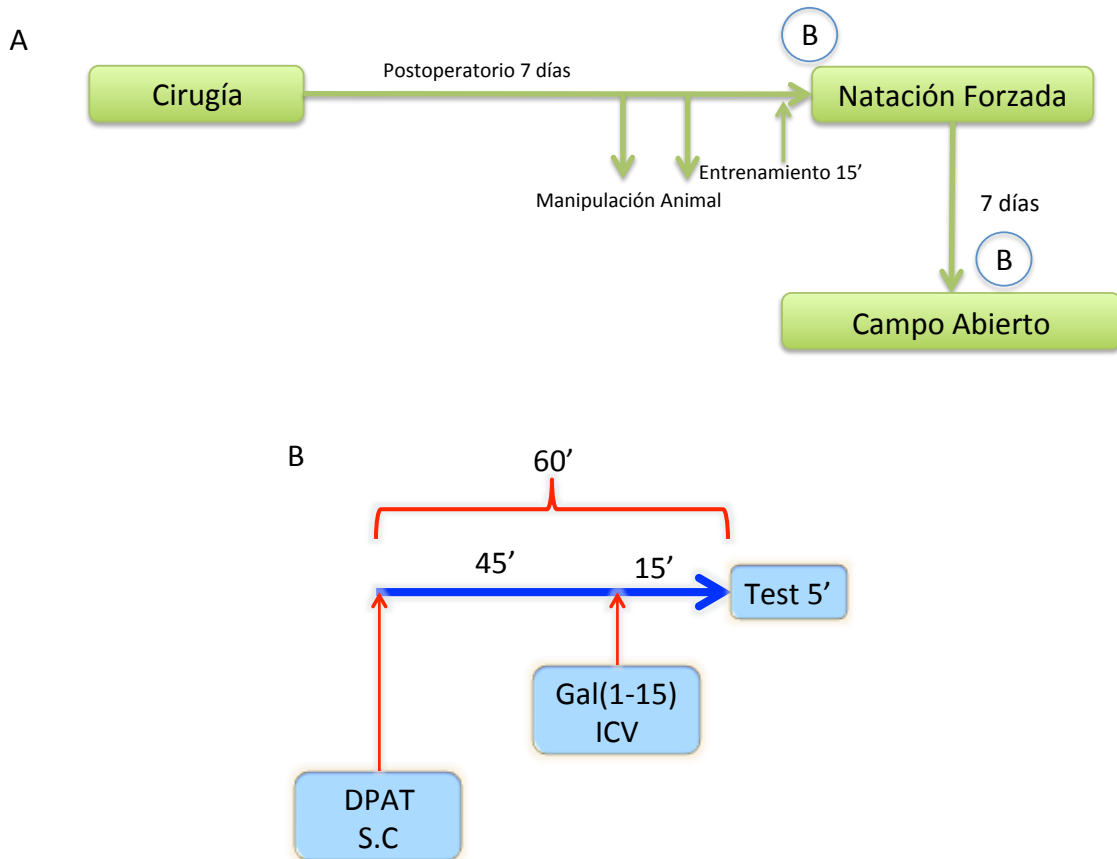


Figura 18. Procedimiento de realización de pruebas de conducta en el estudio de la interacción del fragmento GAL(1-15) con el receptor 5HT1A en las pruebas de la natación forzada y campo abierto (A). Protocolo de administración de las sustancias ensayadas (B).

- Analizar el efecto del 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto.

Se analizan dos dosis del agonista de los receptores 5HT1A 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Figura 18A), administrando 8-OH-DPAT vía subcutánea 60 minutos antes de la prueba y LCRa 15 minutos antes de la prueba (Figura 18B).

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	5/6
8-OH-DPAT +LCRa	0.125 mg/Kg	6/7
8-OH-DPAT +LCRa	0.25 mg/Kg	8/6

Tabla 16. Grupos experimentales de animales de la curva dosis respuesta de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto (número de animales empleado en cada prueba respectivamente).

- Analizar el efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	5/4
8-OH-DPAT +LCRa	0.125 mg/Kg	6/6
8-OH-DPAT + GAL(1-15)	0.125 mg/Kg + 1 nmol	7/5

Tabla 17. Grupos experimentales de animales de la coadministración de dosis no efectivas de GAL(1-15) y de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto (número de animales empleado en cada prueba respectivamente).

- Analizar el efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	8
8-OH-DPAT +LCRa	0.25 mg/Kg	8
8-OH-DPAT + GAL(1-15)	0.25 mg/Kg + 1 nmol	11

Tabla 18. Grupos experimentales de animales de la coadministración de la dosis no efectivas de GAL(1-15) y la efectiva de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada.

- Analizar el efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en presencia del antagonista de receptores GALR2, en la prueba de la natación forzada.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino + LCRa	5
8-OH-DPAT + LCRa	0.125 mg/Kg	6
8-OH-DPAT + GAL(1-15)	0.125 mg/Kg + 1 nmol	7
8-OH-DPAT + GAL(1-15) + M871	0.125 mg/Kg + 1 nmol + 3 nmol	8

Tabla 19. Grupos experimentales de animales de la coadministración de dosis no efectivas de GAL(1-15) y de 8-OH-DPAT en presencia del antagonista M871 en la prueba de la natación forzada.

1.7.1.2.3 Interacción GAL/5HT1A: Interacción de 8-OH-DPAT (SC. 60 min.) y GAL (ICV 15 min.) en la prueba de la natación forzada.

Se realizan experimentos para estudiar la interacción entre el la molécula completa de GAL y el receptor 5HT1A en la prueba de la natación forzada. Para esto los animales realizaron la prueba de natación forzada, siendo administrados por vía subcutánea, con el tratamiento correspondiente de 8-OH-DPAT, 60 minutos antes de realizar el test y la inyección icv de GAL se realizó 15 minutos antes de la prueba.

- Analizar el efecto de la molécula completa de GAL en la prueba de la natación forzada.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	LCRa	9
GAL	1 nmol	6
GAL	3 nmol	7

Tabla 20. Grupos experimentales de animales de la curva dosis respuesta de GAL en la prueba de la natación forzada.

- Analizar el efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL y 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada.

Grupo/tratamiento	Dosis	Número
Control	Salino+LCRa	5
8-OH-DPAT +LCRa	0.125 mg/Kg	5
8-OH-DPAT + GAL	0.125 mg/Kg + 1 nmol	7

Tabla 21. Grupos experimentales de animales de la coadministración de dosis no efectivas de GAL y de 8-OH-DPAT en las pruebas de la natación forzada.

1.7.2 Estudios a nivel de receptor: Autorradiografía.

1.7.2.1 Influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el Hipocampo dorsal y Rafe dorsal de rata.

Se realizan experimentos de autorradiografía para estudiar si la GAL(1-15) es capaz de modular el receptor 5HT1A en los núcleos objeto de estudio de esta tesis, así como la implicación del receptor GALR2 en esta modulación. Para esto se administra icv GAL(1-15) sacrificándose los animales a los 10 minutos, 2 horas o 5 horas tras la inyección o se coadministra GAL(1-15) junto con M871, antagonista de los receptores GALR2, sacrificando a los animales tras 10 minutos de la coadministración, que es el tiempo más efectivo, para estudiar la implicación del receptor GALR2.

-Analizar la influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el Hipocampo dorsal y Rafe dorsal.

Grupo/tratamiento	Tiempo	Dosis	Número
Control	10 min.	LCRa	6
GAL(1-15)	10 min.	3nmol	6
Control	2 h	LCRa	6
GAL(1-15)	2 h	3nmol	6
Control	5 h	LCRa	6
GAL(1-15)	5 h	3nmol	6

Tabla 22. Grupos experimentales de animales para el análisis de la modulación del receptor 5HT1A mediada por el fragmento GAL(1-15).

- Análisis de la acción del M871 en la influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata.

Grupo/tratamiento	Tiempo	Dosis	Número
Control	10 min.	LCRa	6
GAL(1-15)	10 min.	3nmol	6
M871	10 min.	3nmol	6
GAL(1-15)+M871	10 min.	3nmol + 3nmol	6

Tabla 23. Grupos experimentales de animales para estudiar la implicación del receptor GALR2 en la modulación del receptor 5HT1A mediada por el fragmento GAL(1-15).

1.7.3 Estudios de la expresión del receptor 5HT1A: Hibridación *in situ*.

Se realizan experimentos cuantificación de mRNA del receptor 5HT1A para estudiar si la GAL(1-15) es capaz de modificar la expresión del receptor en los núcleos del Hipocampo dorsal y Rafe dorsal. Para esto se administra icv GAL(1-15) sacrificándose los animales a las 2 horas y 5 horas tras la inyección.

Grupo/tratamiento	Tiempo	Dosis	Número
Control	2 h	LCRa	6
GAL(1-15)	2 h	3nmol	6
Control	5 h	LCRa	6
GAL(1-15)	5 h	3nmol	6

Tabla 24. Grupos experimentales de animales para estudiar la modificación de los niveles de mRNA del receptor 5HT1A por el fragmento GAL(1-15).

2. Metodología en Cultivos Celulares.

2.1 Líneas celulares y transfección.

2.1.1 Células HEK-293T

Se utiliza la línea de células HEK-293T para los experimentos de tráfico vesicular (American type Culture Collection, USA). Estas células se cultivan en medio Eagle modificado por Dulbecco, complementado con 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de Penicilina/Estreptomicina y un 10% de Suero Fetal Bovino. El crecimiento se mantiene en estufa a 37 °C y en una atmósfera con un 5% de CO₂ en frascos de 75 cm³.

Estas células se transfectarán en función de los diferentes experimentos con cDNA de los receptores GALR1-YFP, GALR2, Rab5-RFP o LAMP-RFP. Para la transfección, las células se pasan a placas de seis pocillos, a una concentración de un millón de células por pocillo con cubreobjetos redondos pretratados con Polilisina. Las células se transfectan con el reactivo Fugene (Promega). Se mantiene la proporción de medio de cultivo sin complementar (50 µl), añadiendo el ADNc (1 µg/µl) y el Fugene en la relación 1:3 con respecto al cDNA durante 15 minutos. Posteriormente se añade medio complementado (1ml) y se incuban con las células durante 2 horas. Tras este periodo de incubación para llevar a cabo la transfección se aspira el medio y se renueva por medio complementado, para evitar la toxicidad. Las células se dejan en reposo 24/48 horas antes de realizar los experimentos, para que las células expresen los receptores transfectados en membrana. Tras este tiempo, se estimulan las células con los tratamientos correspondientes durante el tiempo que requiera cada condición experimental y posteriormente se lavan con PBS y se fijan las células con Paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

2.1.2 Células RN33B

Se utiliza la línea celular derivadas del núcleo del Rafe RN33B (American type Culture Collection, USA) para los distintos experimentos de PLA, síntesis de 5HT y expresión de C-Fos y 5HT1A. (Whittemore et al., 1993; Lundberg et al., 2002; Wojciechowski et al., 2002) . Se cultivan en medio DMEM/F12, complementado con 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de Penicilina/Estreptomicina y un 10% de Suero Fetal Bovino. Se mantienen en crecimiento en estufa a 37 °C y en una atmósfera con un 5% de CO₂ en frascos de 75 cm³.

Los experimentos realizados con este tipo celular, se llevan a cabo sin necesidad de transfectar los receptores de GAL o 5HT1A, ya que al ser células derivadas del núcleo del Rafe expresan estos receptores endógenamente. Por lo tanto las células se mantendrán en las distintas placas, donde serán estimuladas con

diferentes tratamientos y posteriormente se lavan con PBS y se fijan con Paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.



Figura 19. Laboratorio de cultivo celular.

2.2 Trafico vesicular de GALR en células HEK-293 tras la incubación con GAL y GAL(1-15).

2.2.1 Internalización de GALR1-YFP en células HEK-293 que expresan GALR1-YFP o GALR1-YFP y GALR2 tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

Se analiza la modulación de la internalización del receptor GALR1 clonado con la proteína amarilla fluorescente (YFP), sólo o cuando se coexpresa con el receptor GALR2, tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Para estos experimentos se siguieron protocolos previamente descritos (Narváez et al., 2014).

En primer lugar se pasan las células a placas de seis pocillos, donde previamente se coloca un cubreobjeto tratado con Polisisina, de manera que las células se adhieran sobre él, dejando que alcancen una confluencia de aproximadamente el 70%. Posteriormente se realiza la transfección de los ADNc de los receptores, como se explica en apartados anteriores, dejando el cultivo en medio suplementado 24 horas para que las células puedan expresar los receptores transfectados, se cambia el medio suplementado por medio sin suplementar con suero fetal bovino, para que todas las células estén en la misma fase del ciclo celular, lo cual se consigue en unas 24 horas.

Posteriormente se procede a la estimulación de las células con los distintos tratamientos, GAL y GAL(1-15) ambos en una concentración de 500 nM durante los distintos periodos de tiempo de 10, 30, 60 y 120 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos sin estimular servirán como control (Tiempo 0 minutos) (los grupos experimentales se muestran en la Tabla 25). Tras el tiempo de incubación de cada grupo, se hace un lavado con PBS a 4°C, que detiene el proceso de internalización. Las células se fijan en PAF 4% durante 15 minutos y se montan los cubreobjetos sobre

portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vector), para teñir de azul los núcleos celulares. Cada grupo experimental se realiza por duplicado.

El análisis se realiza mediante microscopía confocal (Leica, SP5), detectando la señal producida por la proteína amarilla fluorescente (YFP) clonada en el receptor GALR1. El porcentaje de internalización del receptor GALR1 se calcula comparando la fluorescencia total citoplasmática con la fluorescencia total de la membrana plasmática, para esto se utiliza el software propio del microscopio confocal (Leica). Se analiza entre 10 y 20 células por grupo y tiempo.

Grupo/tratamiento	Tratamiento
Control (Tiempo 0)	Medio de cultivo
GALR1-YFP	GAL 500 nM
GALR1-YFP	GAL(1-15) 500 nM
GALR1-YFP + GALR2	GAL 500 nM
GALR1-YFP + GALR2	GAL(1-15) 500 nM

Tabla 25. Grupos experimentales de células con sus correspondientes tratamientos. Cada grupo experimental se analiza a diferentes tiempos: 10, 30, 60 y 120 minutos.

2.2.2 Formación de endosomas tempranos (Rab5-RFP) en células HEK-293 que expresan los receptores GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Mediante la detección de la proteína Rab5, proteína presente en endosomas tempranos (Van der Bliet., 2005), clonada con la proteína roja fluorescente (RFP), se cuantifica el número de endosomas tempranos en células HEK-293 transfectadas con el receptor GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

El procedimiento a seguir para llevar a cabo los experimentos, será muy similar al seguido en el apartado anterior. Se pasan las células a placas de seis pocillos, donde previamente se coloca un cubreobjeto tratado con Polisisina, dejando que alcancen una confluencia de aproximadamente el 70%. Posteriormente se realiza la transfección de los ADNc de los receptores y de la construcción Rab5-RFP, dejando el cultivo en medio suplementado 24 horas para que las células puedan expresar los receptores transfectados, se cambia el medio suplementado por medio sin suplementar con suero

fetal bovino, para que todas las células estén en la misma fase del ciclo celular. Posteriormente se procede a la estimulación de las células con los distintos tratamientos, GAL y GAL(1-15) ambos en una concentración de 500 nM durante los distintos periodos de tiempo de 10, 30, 60 y 120 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos sin estimular servirán como control (Tiempo 0 minutos) (los grupos experimentales se muestran en la Tabla 26). Tras el tiempo de incubación de cada grupo, se hace un lavado con PBS a 4°C. Posteriormente, se fijan las células en PAF 4% durante 15 minutos y se montan los cubreobjetos sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vector). Cada grupo experimental se realiza por duplicado.

El análisis se realiza mediante microscopía confocal (Leica, SP5), detectando la señal producida por la proteína roja fluorescente (YFP) clonada en la proteína Rab5. El número de endosomas tempranos se determina por el conteo de estos mediante el software específico Blobfinder (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia). Se analiza entre 10 y 20 células por grupo y tiempo.

Grupo/tratamiento	Tratamiento
Control (Tiempo 0)	Medio de cultivo
GALR1-YFP + Rab5-RFP	GAL 500 nM
GALR1-YFP + Rab5-RFP	GAL(1-15) 500 nM
GALR2 + Rab5-RFP	GAL 500 nM
GALR2 + Rab5-RFP	GAL(1-15) 500 nM
GALR1-YFP + GALR2 + Rab5-RFP	GAL 500 nM
GALR1-YFP + GALR2 + Rab5-RFP	GAL(1-15) 500 nM

Tabla 26. Grupos experimentales de células con sus correspondientes tratamientos. Cada grupo experimental se analiza a diferentes tiempos: 10, 30, 60 y 120 minutos.

2.2.3 Formación de lisosomas (LAMP1-RFP) en células HEK-293 que expresan los receptores GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

La formación de lisosomas, se cuantifica, mediante la señal producida por la proteína presente en lisosomas LAMP1 (Fichter et al., 2010), clonada con la proteína roja fluorescente (RFP), en células HEK-293 transfectadas con el receptor GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

El procedimiento es similar, al descrito en el apartado anterior, donde las células en placas de seis pocillos y transfectadas con las diferentes construcciones (Tabla 27), se incubaran con GAL 500 nM o GAL(1-15) 500 nM durante los tiempos 0, 10, 30, 60 y 120 minutos. Donde las células a tiempo 0, serán mantenidas en medio de cultivo y se utilizarán como controles. Tras el tiempo de incubación, las células se fijaran y montarán en portaobjetos como también se describe en apartados anteriores.

El análisis se realiza mediante microscopía confocal (Leica, SP5), detectando la señal producida por la proteína roja fluorescente (YFP) clonada en la proteína LAMP1. El número de lisosomas en cada condición experimental se determina por el contaje de estos mediante el software específico Blobfinder (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia). Se analiza entre 10 y 20 células por grupo y tiempo.

Grupo/tratamiento	Tratamiento
Control (Tiempo 0)	Medio de cultivo
GALR1-YFP + LAMP1-RFP	GAL 500 nM
GALR1-YFP + LAMP1-RFP	GAL(1-15) 500 nM
GALR2 + LAMP1-RFP	GAL 500 nM
GALR2 + LAMP1-RFP	GAL(1-15) 500 nM
GALR1-YFP + GALR2 + LAMP1-RFP	GAL 500 nM
GALR1-YFP + GALR2 + LAMP1-RFP	GAL(1-15) 500 nM

Tabla 27. Grupos experimentales de células con sus correspondientes tratamientos. Cada grupo experimental se analiza a diferentes tiempos: 10, 30, 60 y 120 minutos.

2.3 Inmunofluorescencia contra los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A en células RN33B.

Mediante esta técnica se valorará si las células, derivadas del núcleo del Rafe, RN33B expresan los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A de forma endógena en las condiciones utilizadas para el cultivo.

El procedimiento, es muy similar al de inmunofluorescencia simple en tejido, con algunas particularidades. En primer lugar las células se siembran directamente en unas cámaras adheridas sobre portaobjetos (Figura 20), donde se dejan que las células crezcan hasta alcanzar aproximadamente el 70% de confluencia. Posteriormente, las células son fijadas mediante PAF al 4% durante 15 minutos y tras esto lavadas con PBS. De esta manera las células están preparadas para la técnica inmunocitoquímica. Todos los lavados se realizarán bajo agitación suave continua. En primer lugar se incubaran las células durante 20 minutos a temperatura ambiente con Glicina 20 nM en PBS 0.01M y pH 7,4 para reducir la autofluorescencia de los radicales aldehído producidos durante la fijación. Tras un lavado con PBS durante 5 minutos, se realiza la permeabilización de las células mediante la incubación con Triton X-100 0,1% durante 10 minutos, posteriormente se hacen dos lavados de 5 minutos con PBS y se incuban con BSA 2% durante 30 minutos para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Tras esto se incuban con los anticuerpos primarios (Tabla 28) una hora a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C en cámara fría. Al día siguiente y tras atemperar las células se lavan durante 10 minutos con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario (Tabla 29) durante 1 hora en oscuridad. Posteriormente, se lava el anticuerpo secundario no unido y se deja secar para su posterior montaje con medio para fluorescencia. El análisis de las inmunofluorescencias se lleva a cabo mediante microscopía confocal (Leica, SP5).

Antígeno	Generado en	Origen	Tipo
Receptor GALR1	Cabra	Santa Cruz Biotechnology (USA) C-20	Policlonal
Receptor GALR2	Conejo	Alomone Lab. (Israel) AGR-012	Policlonal
Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, clon 19A9.2

Tabla 28. Información de Anticuerpos primarios utilizados.

Detecta	Generado en	Origen	Característica
IgG Cabra	Pollo	Invitrogen (USA)	Alexa 594 (Rojo)
IgG Conejo	Burro	Invitrogen (USA)	Alexa 488 (Verde)
IgG Ratón	Cabra	Invitrogen (USA)	Alexa 546 (Rojo)

Tabla 29. Información de Anticuerpos secundarios utilizados.

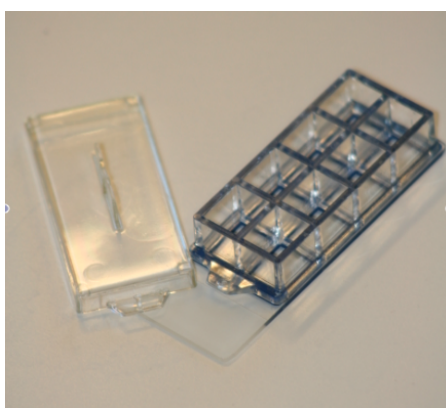


Figura 20. Cámara utilizada para los experimentos de cultivo celular

2.4 Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2, GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en células RN33B.

Mediante esta técnica estudiaremos si los receptores estudiados se encuentran en estrecha proximidad en el citoplasma de las células derivadas del núcleo del Rafe RN33B. Esta estrecha proximidad posibilitaría la formación de complejos heterodímeros. Las pruebas de PLA realizadas son contra los receptores GALR1-GALR2, GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A. Se seguirán protocolos previamente descritos (Borrotto-Escuela et al., 2012) así como las instrucciones del fabricante para cultivo celular (Olink Bioscience, Uppsala, Suecia).

El procedimiento experimental, es similar al detallado en el **apartado 1.6.6** de esta misma sección, con algunas modificaciones. En este caso, el tejido del que se parte, es un cultivo de células RN33B con una confluencia del 70% aproximadamente en una cámara adherida sobre un portaobjeto. Las células se fijan con PAF al 4% durante 15 minutos, como se detalla en el apartado anterior. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para estos experimentos se detallan en las Tablas 30 y 31.

Ensayo	Antígeno	Generado en	Origen	Características
GALR1-GALR2	Receptor GALR1	Cabra	Santa Cruz Biotec. (USA) C-20	Policlonal Uso 1/250.
	Receptor GALR2	Conejo	Alomone Lab. (Israel) AGR-012	Policlonal Uso 1/250.
GALR1-5HT1A	Receptor GALR1	Cabra	Santa Cruz Biotec. (USA) C-20	Policlonal Uso 1/250.
	Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, Clon 19A9.2 Uso 1/400
GALR2-5HT1A	Receptor GALR2	Conejo	Alomone Lab. (Israel) AGR-012	Policlonal Uso 1/250.
	Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, Clon 19A9.2 Uso 1/400

Tabla 30. Información de anticuerpos primarios utilizados con la técnica de ligazón por proximidad.

Ensayo	Detecta	Generado en	Origen	Características
GALR1-GALR2	IgG Cabra	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda MINUS Uso 1/5
	IgG Conejo	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda PLUS Uso 1/5
GALR1-5HT1A	IgG Cabra	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda MINUS Uso 1/5
	IgG Ratón	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda PLUS Uso 1/5
GALR2-5HT1A	IgG Conejo	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda PLUS Uso 1/5
	IgG Ratón	Burro	Olink Bioscience, Uppsala, Suecia.	Sonda MINUS Uso 1/5

Tabla 31. Información de anticuerpos secundarios ligados a sonda de oligonucleótido utilizados con la técnica de ligazón por proximidad.

El análisis se realiza mediante microscopía confocal (Leica, SP5), indicando la presencia de señal que los receptores estudiados están a una distancia de entre 10 a 20 nm, lo que permitiría la formación de complejos heterodímeros.

2.5 Síntesis y almacenamiento de Serotonina (5HT) en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

Se cuantifica la síntesis y almacenamiento de 5HT, mediante inmunofluorescencia, tras la incubación de las células RN33B con GAL y GAL(1-15) siguiendo protocolos previamente descritos (Borrito- Escuela et al., 2012).

Se sigue el procedimiento descrito en la Figura 21. En primer lugar las células RN33B se pasan a una cámara con varios pocillos adherida sobre un portaobjeto (Figura 20), donde se dejan crecer hasta una confluencia del 70% aproximadamente, una vez tengamos las células en con esta confluencia se incuban durante 1 hora a 37°C en una atmosfera con un 5% de CO₂ (condiciones normales de crecimiento) con los diferentes tratamientos, GAL 100 nM, GAL(1-15) 100 nM o se dejan con medio de cultivo, estas células que servirán de grupo Control. Tras la incubación, se sustituye el tratamiento por medio de cultivo complementado durante una hora más, tiempo en el cual las células se recuperan y podrán producir 5HT. Pasada esta hora de recuperación las células serán fijadas como se explica en apartados anteriores. Una vez tengamos las células fijadas, se realiza una inmunofluorescencia, siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.3 de esta sección, utilizando como anticuerpo primario anti-5HT monoclonal fabricado en conejo (1/5000; Sigma-Aldrich) y como anticuerpo secundario el anti-conejo fabricado en burro conjugado al fluorocromo Alexa-488 (1/2000; Invitrogen).

El análisis se realiza mediante microscopía confocal (Leica, SP5), cuantificando la inmunorreactividad de 5HT con el software específico del microscopio (Leica). Se cuantificaron 30 células por condición experimental y se realizaron dos experimentos independientes (60 células por condición).

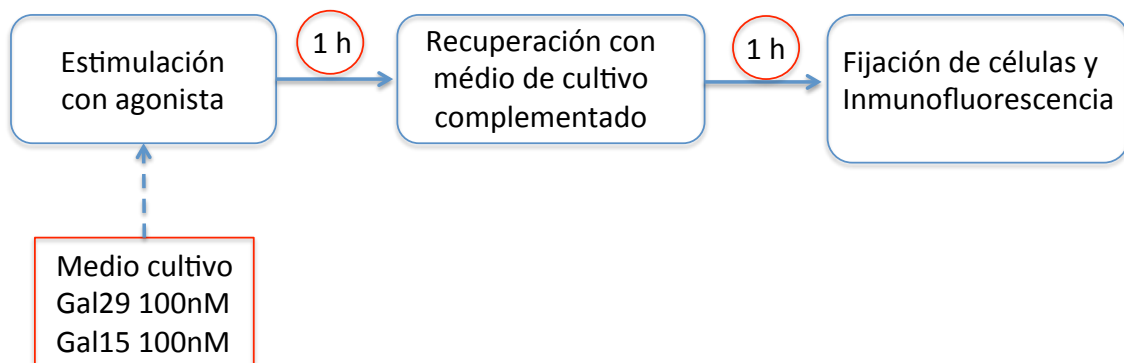


Figura 21. Procedimiento seguido en los experimentos de cuantificación de síntesis y almacenamiento de Serotonina (5HT).

2.6 Expresión de la proteína C-Fos y del receptor 5HT1A por inmunofluorescencia en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

Para medir la actividad celular en células RN33B tras la incubación de las células con GAL y GAL(1-15) se cuantifica la expresión de la proteína nuclear C-Fos mediante inmunofluorescencia. El mismo experimento servirá para cuantificar la expresión del receptor 5HT1A (de localización citoplasmática) tras la incubación de las células con GAL y GAL(1-15).

El procedimiento a seguir es similar al apartado anterior (Figura 21). Las células RN33B se incuban durante 1 hora con GAL 100 nM y GAL(1-15) 100 nM, dejando pocillos con medio de cultivo para ser usados como controles. Tras la incubación las células se dejan otra hora con medio complementado para su recuperación tras la cual se fijan, como se describe en apartados anteriores. Una vez fijadas las células, se les realiza una inmunofluorescencia doble, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3, contra la proteína nuclear C-Fos y contra el receptor 5HT1A, situado en el citoplasma celular. El detalle de los anticuerpos primarios y secundarios se detallan en las Tablas 32 y 33.

El análisis se realiza mediante microscopía confocal (Leica, SP5), cuantificando la inmunorreactividad en el núcleo de C-Fos y en el citoplasma de 5HT1A con el software específico del microscopio (Leica). Se cuantifican 30 células por condición experimental y se realizan dos experimentos independientes (60 células por condición).

Antígeno	Generado en	Origen	Tipo
Proteína C-Fos	Conejo	Santa Cruz Biotechnology (USA) C-52	Policlonal
Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, Clon 19A9.2

Tabla 32. Información de Anticuerpos primarios utilizados.

Detecta	Generado en	Origen	Característica
IgG Conejo	Burro	Invitrogen (USA)	Alexa-488 (Verde)
IgG Ratón	Cabra	Invitrogen (USA)	Alexa- 546 (Rojo)

Tabla 33. Información de Anticuerpos secundarios utilizados.

2.7 Expresión de la proteína C-Fos y del receptor 5HT1A mediante la técnica de *in cell western* en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

Se realiza, mediante la técnica de *in cell western*, la cuantificación de la expresión de la proteína nuclear C-Fos, como indicador de la actividad celular, y la cuantificación de la expresión del receptor 5HT1A. Para ello se siguen protocolos previamente descritos (Borroto-Escuela et al., 2012) y las instrucciones del fabricante (LI-COR Biosciences).

Se siembran las células derivadas del núcleo del Rafe RN33B en placas de 96 pocillos para *in cell western* (Li-COR Biosciences), consistentes en placas negras con el fondo transparentes. Una vez obtenemos la confluencia de las células en los pocillos, incubamos las células durante 2 horas con los distintos tratamientos consistentes en GAL 100 nM, GAL(1-15) 100 nM, dejando por lo menos 12 pocillos por placa de células sin tratar que servirán de grupo control. Una vez transcurrido el tratamiento, se fijan las células con PAF 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente (Figura 22). Posteriormente, y siguiendo las guía del fabricante, se realiza la permeabilización de las células mediante 5 lavados de 5 minutos con Triton X-100 0.1%. Tras este paso se hace un bloqueo con Bloking-buffer Odyssey (LI-COR Bioscience) durante 90 minutos a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente se incuban las células con los anticuerpos primarios (Tabla 34) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente y tras 5 lavados con PBS con 0.1% de Tween-20 se incuban con los anticuerpos secundarios (Tabla 35.) diluidos en Bloking buffer con 0.2% de Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavan 3 veces con PBS con 0.1% de Tween-20 y se guardan las placas a 4°C en oscuridad hasta su lectura.

Las placas son escaneadas en el escáner de infrarrojos Odyssey (LI-COR Bioscience) (Figura 23), dando los valores de fluorescencia de cada pocillo. Sólo se contabilizaran los pocillos donde las células cubran toda su superficie.

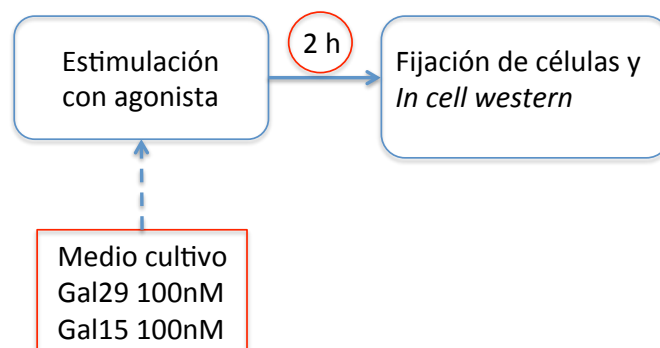


Figura 22. Procedimiento seguido en los experimentos de cuantificación C-Fos y 5HT1A mediante *in cell western*.

Antígeno	Generado en	Origen	Tipo
Proteína C-Fos	Conejo	Santa Cruz Biotechnology (USA) C-52	Policlonal
Receptor 5HT1A	Ratón	Millipore Corp. (USA) MAB11041	Monoclonal, Clon 19A9.2

Tabla 34. Información de Anticuerpos primarios utilizados.

Detecta	Generado en	Origen	Característica
IgG Conejo	Cabra	Li-COR Bioscience	IRDye 800cw (Verde)
IgG Ratón	Cabra	Li-COR Bioscience	IRDye 680 (Rojo)

Tabla 35. Información de Anticuerpos secundarios utilizados.



Figura 23. Escáner de infrarrojos Odyssey (LI-COR Bioscience) utilizado para la lectura de placas de in cell western.

3. Análisis Estadístico.

3.1 Estudios de comportamiento animal.

Los parámetros analizados en las diferentes pruebas de comportamiento animal se han analizado mediante diferentes test estadísticos según el número de grupos experimentales comparados. En el caso de comparación entre dos grupos experimentales se utiliza el test de la t de Student, considerando unos grados de significación de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$. Cuando se comparan tres o más grupos experimentales se utiliza un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguida de test pos hoc de Newman-Keuls para comparar las diferencias entre los distintos grupos experimentales o el test pos hoc de Dunnett en el caso de comparación entre los grupos experimentales con el grupo control, en ambos casos se establecieron los grados de significación en $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

3.2 Autorradiografía

En los experimentos de autorradiografía donde se estudia la modulación de los receptores 5HT1A producida por el fragmento GAL(1-15) se comparan valores de Kd o de Bmax entre dos grupos experimentales, animales control o inyectados con GAL(1-15) utilizando para el análisis estadístico el test de la t de Student, considerando unos grados de significación de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$. En el caso de los experimentos donde se estudia la implicación del receptor GALR2 en la modulación del 5HT1A mediada por GAL(1-15) se comparan más de dos grupos experimentales y se utiliza un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguida de test pos hoc de Newman-Keuls con grados de significación en $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

3.3 Hibridación *in situ*

Para el análisis estadístico de los experimentos de hibridación *in situ* donde se estudia la modificación de los niveles de mRNA del receptor 5HT1A tras la administración de GAL(1-15) se utiliza el test de la t de Student, considerando unos grados de significación de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, al comparar siempre dos grupos experimentales.

3.4 Ligazón por proximidad (PLA) en tejido.

En el estudio de proximidad entre los receptores GALR1 y GALR2 se compararon la media de complejos por célula de diferentes zonas del hipocampo dorsal y el núcleo del Rafe, para esto se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test pos hoc de Newman-Keuls, considerando un grado de significación de $p < 0.001$. En el estudio de ligazón por proximidad entre los receptores GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A, se compara la media de complejos por célula de GALR1/5HT1A con la media de complejos por célula de GALR2/5HT1A en las diferentes

zonas estudiadas, utilizando el test de t de Student, con unos grados de significación de $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

3.5 Generación de animales Knockdown para el receptor GALR2.

Para el estudio estadístico de la **curva de tiempo de expresión de GALR2 mediante inmunohistoquímica** se utilizó la prueba de ANOVA de una vía seguida del test pos hoc de Newman-Keuls, considerando una significación de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$. En la **curva de tiempo de expresión de mRNA de GALR2 realizada por RT-qPCR**, se compararon los distintos días de la curva con el grupo vehículo mediante el test de t de Student considerando un grado de significación de $p < 0.05$.

En los experimentos de **ligazón por proximidad de los receptores GALR1 y GALR2**, se compararon la media de complejos por células en tejido de animal knockdown GALR2 con la media de complejos por célula en tejido de animal inyectado con vehículo, utilizando el test de t de Student con unos grados de significación de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

3.6 Experimentos en Cultivos Celulares.

3.6.1 Síntesis y almacenamiento de Serotonina (5HT) en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

En este experimento se realizan tres grupos experimentales comparados entre sí mediante un ANOVA de una vía seguido del test pos hoc de Newman-Keuls, considerando el grado de significación de $p < 0.001$.

3.6.2 Expresión de la proteína C-Fos y del receptor 5HT1A por inmunofluorescencia en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

En este experimento se realizan tres grupos experimentales, consistentes en células tratadas con GAL, GAL(1-15) o medio de cultivo como grupo control, comparados entre sí. Para esto se utiliza un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test pos hoc de Newman-Keuls, estableciéndose los grados de significación en $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

3.6.3 Expresión de la proteína C-Fos y del receptor 5HT1A mediante la técnica de *in cell western* en células RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

La inmunorreactividad de los tres grupos experimentales medida mediante la técnica de *in cell western* se analiza estadísticamente utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido del post test de Dunn's, considerando un grado de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Resultados GAL(1-15)

1. Estudios de comportamiento animal.

1.1 Efecto de la GAL(1-15) en pruebas de ansiedad y depresión animal.

1.1.1 Test del Campo Abierto.

Para analizar el efecto del fragmento GAL(1-15) en el test del campo abierto, se administró GAL(1-15) por vía Intracerebroventricular (icv) a las dosis de 1, 3 y 6 nmol. Se observó, que tanto las dosis de 1 nmol como 6 nmol no producen diferencias ni en el número de entradas en la zona central (Figura 1A) ni en el tiempo de permanencia en la zona central del campo abierto (Figura 1B). Sin embargo, la dosis de GAL(1-15) 3 nmol induce una disminución significativa en el número de entradas en la zona central de un 42% ($p < 0.01$) (Figura 1A) y un 39% en el tiempo en la zona central ($p < 0.05$) (Figura 1B) en el campo abierto, lo que sugiere un efecto ansiogénico.

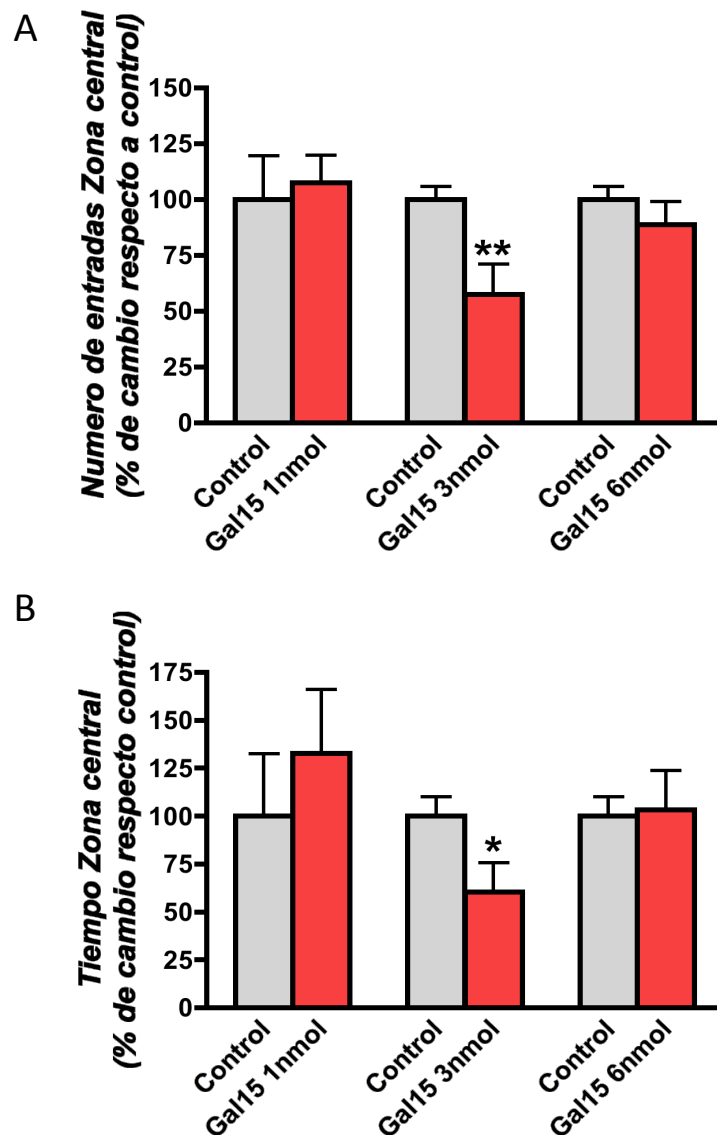


Figura 1. Representación gráfica del número de entradas a la zona central (A) y tiempo de permanencia en la zona central (B) del campo abierto tras la administración de GAL(1-15) a diferentes dosis 1, 3 y 6

nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ según test de T-Student versus respectivos controles. N= 6-12 ratas por grupo.

No se observaron modificaciones a ninguna de las dosis estudiadas de GAL(1-15) en los parámetros utilizados para medir la actividad locomotora del animal como son, Distancia Total recorrida y la Velocidad Media de los animales en el campo abierto (Tabla 1).

Grupo	Distancia Total (cm)	Velocidad Media (cm/Seg)
Control	3209 \pm 113,9	10,7 \pm 0,4
Gal15 1nmol	3458 \pm 159,1	11,5 \pm 0,5
Gal15 3nmol	3532 \pm 255,8	11,7 \pm 0,8
Gal15 6nmol	3058 \pm 232,5	10,2 \pm 0,8

Tabla 1. Parámetros de la actividad locomotora en el campo abierto de los animales inyectados con las dosis 1, 3 y 6 nmol de GAL(1-15). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media. N= 6-14 animales por grupo.

1.1.2 Test del Laberinto Elevado en Cruz.

La administración Intracerebroventricular (icv) de GAL(1-15) a dosis de 1, 3 y 6 nmol no producen modificaciones significativas en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos (Figura 2A) ni en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (Figura 2B), respectos a los animales control.

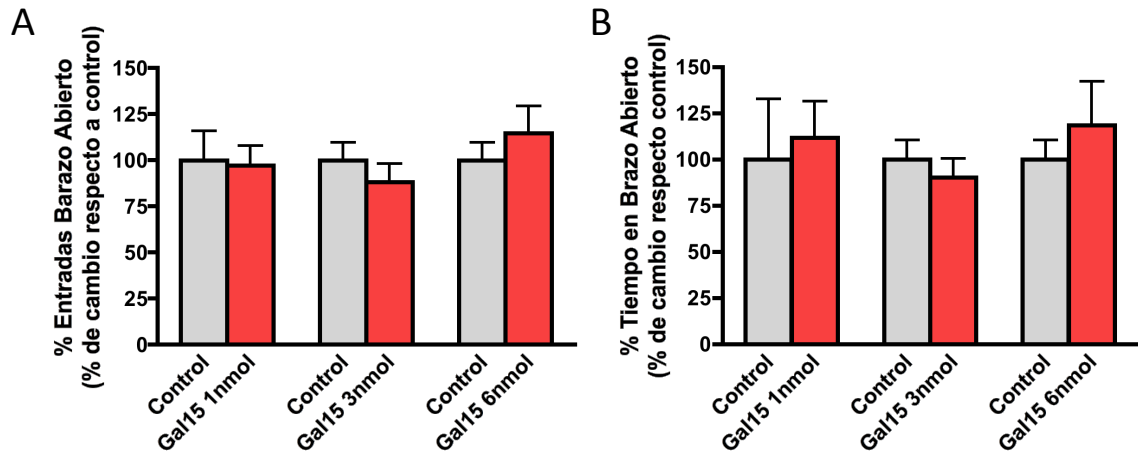


Figura 2. Representación gráfica del porcentaje de entradas en los brazos abiertos (A) y porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos (B) del laberinto elevado en cruz tras la administración de GAL(1-15) a diferentes dosis 1, 3 y 6 nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. N= 6-8 ratas por grupo.

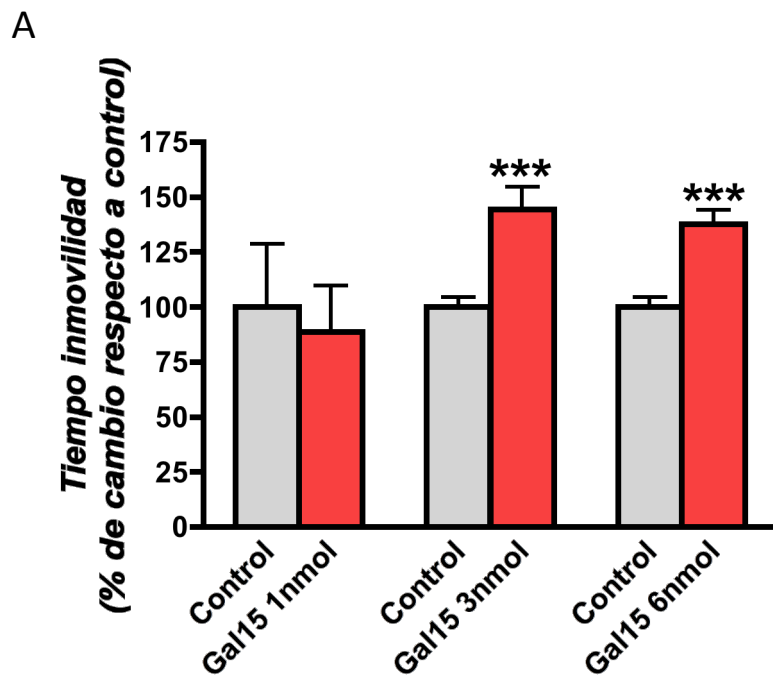
Tampoco existen diferencias entre los animales inyectados con las diferentes dosis de GAL(1-15) y los controles ni en la Distancia Total recorrida ni en la Velocidad Media en el laberinto elevado en cruz (Tabla 2).

Grupo	Distancia Total (cm)	Velocidad Media (cm/Seg)
Control	1823 \pm 78,6	6,2 \pm 0,3
Gal15 1nmol	1610 \pm 58,2	5,3 \pm 0,2
Gal15 3nmol	1745 \pm 73,3	5,8 \pm 0,2
Gal15 6nmol	2081 \pm 138	6,6 \pm 0,5

Tabla 2. Parámetros de la actividad locomotora en el laberinto elevado en cruz de los animales inyectados con las dosis 1, 3 y 6 nmol de GAL(1-15). Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media. N= 6-14 animales por grupo.

1.1.3 Test de la Natación Forzada.

La curva dosis-respuesta realizada mediante la inyección de GAL(1-15) a las dosis de 1, 3 y 6 nmol muestra que, GAL(1-15) 1 nmol no produce diferencias significativas en el Tiempo de inmovilidad (Figura 3A) ni en el Tiempo de escalada (Figura 3B) en el test de la natación forzada. Sin embargo, GAL(1-15) 3 nmol aumenta significativamente el Tiempo de inmovilidad ($p < 0.001$) en un 44% (Figura 3A) y disminuye significativamente el tiempo de escalada ($p < 0.01$) en un 46%. GAL(1-15) 6 nmol mantiene el efecto producido por la GAL(1-15) 3nmol tanto en el aumento significativo en el tiempo de inmovilidad ($p < 0.001$) (Figura 3A) como en la disminución significativa en el tiempo de escalada ($p < 0.01$) (Figura 3B). Estos resultados sugieren un efecto depresivo por la inyección de GAL(1-15).



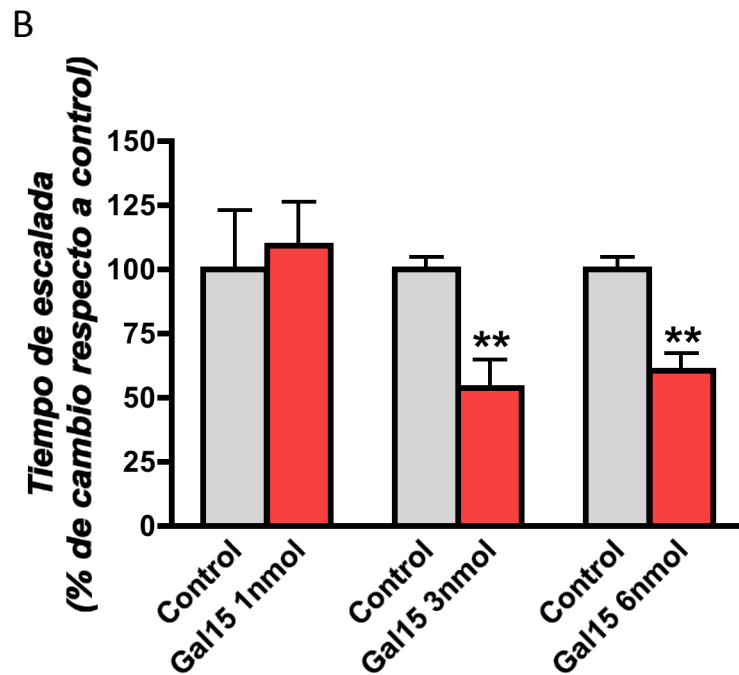


Figura 3. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A) y tiempo de escalada (B) en la prueba de la natación forzada tras la administración de GAL(1-15) a diferentes dosis 1, 3 y 6 nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ según test de T-Student versus respectivos controles. N= 6-8 ratas por grupo.

1.1.4 Test de Evitación Pasiva.

Como se muestra en la Figura 4, GAL(1-15) 1 nmol no produce diferencias significativas con respecto al grupo control en la Latencia de entrenamiento, parámetro registrado en la sesión de entrenamiento en la prueba de evitación pasiva. Sin embargo, GAL(1-15) 3 nmol produce una disminución significativa de la Latencia de entrenamiento ($p < 0.01$), efecto que se potencia al aumentar la dosis de GAL(1-15) a 6nmol ($p < 0.001$) (Figura 4).

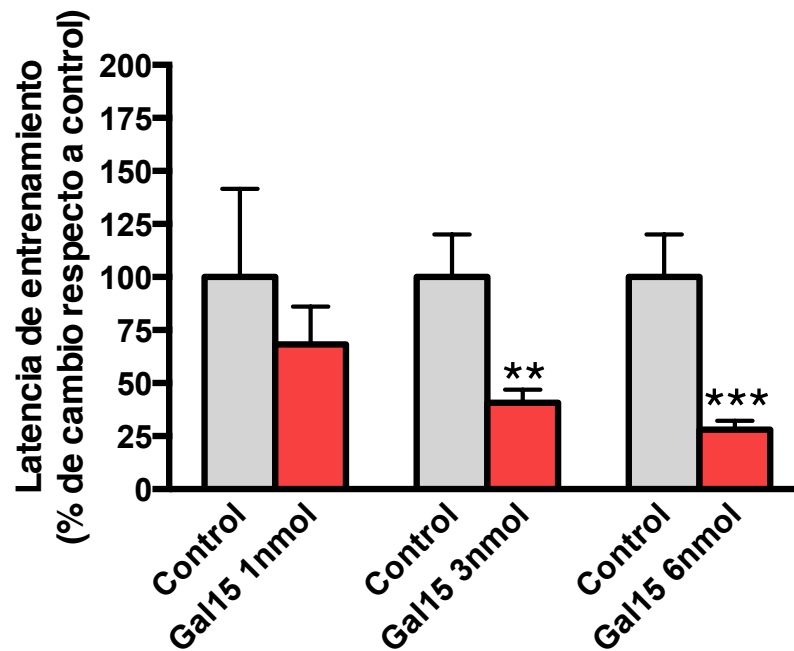


Figura 4. Representación gráfica de la latencia de entrenamiento registrada durante la sesión de entrenamiento en la prueba de la evitación pasiva tras la administración de GAL(1-15) a diferentes dosis 1, 3 y 6 nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ según test de T-Student versus respectivos controles. N= 6-10 ratas por grupo.

Con respecto a la latencia de retención, registrada durante la segunda sesión del test de evitación pasiva, se observa que tanto las dosis de GAL(1-15) 1nmol como 3 nmol no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control. Sin embargo, GAL(1-15) 6 nmol disminuyó significativamente la latencia de retención ($p < 0.05$) (Figura 5).

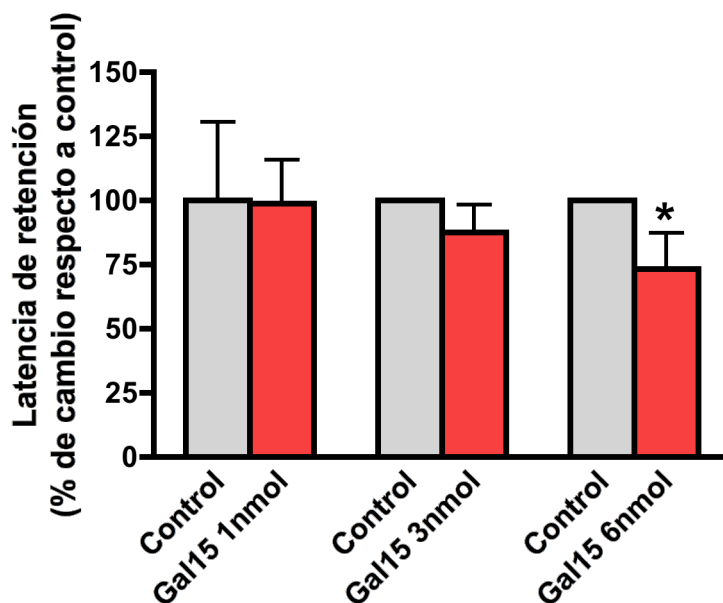


Figura 5. Representación gráfica de la latencia de retención registrada durante la segunda sesión en la prueba de la evitación pasiva tras la administración de GAL(1-15) a diferentes dosis 1, 3 y 6 nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. * $p < 0.05$ según test de T-Student versus respectivos controles. N= 6-10 ratas por grupo.

1.2 Comparación entre la acción de la GAL(1-15) y de la GAL en pruebas de comportamiento animal.

1.2.1 Test del campo abierto.

En la Figura 6 se compara la acción producida por la molécula completa de GAL a 3nmol, con la acción producida tras la administración de su fragmento GAL(1-15) a la dosis de 3nmol en el test del campo abierto. Con respecto al número de entradas en la zona central, la GAL no produce ninguna diferencia significativa respecto al grupo control, mientras que la administración de GAL(1-15) 3 nmol produce una disminución significativa ($p < 0.01$) en el número de entradas a la zona central del campo abierto (Figura 6A). En relación con el tiempo de permanencia en la zona central, la administración de GAL 3nmol tampoco produce diferencias significativas con respecto a los controles, mientras que el fragmento GAL(1-15) 3nmol produce un descenso significativo de este parámetro ($p < 0.05$) (Figura 6B). Por tanto, estos resultados muestran que es el fragmento GAL(1-15) y no la molécula completa el que tiene acción en los parámetros del test del campo abierto.

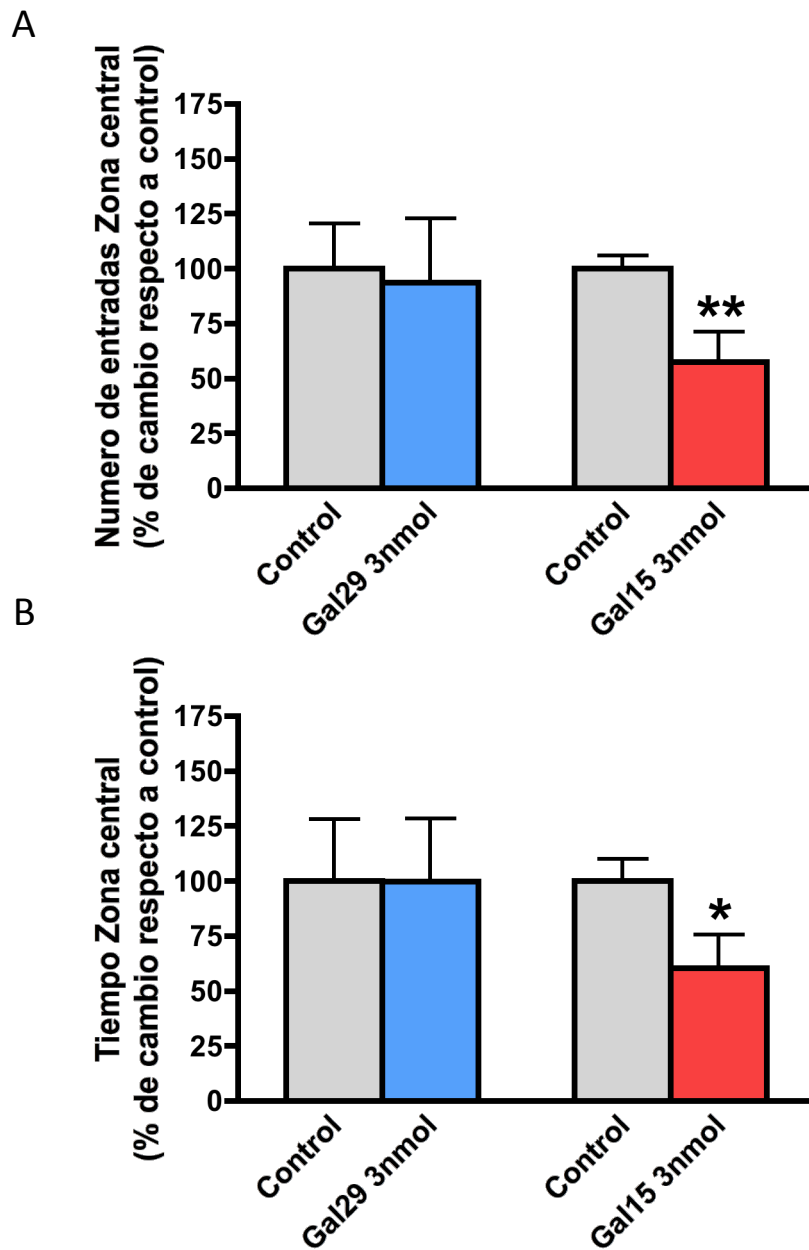


Figura 6. Representación gráfica de la comparativa del número de entradas a la zona central (A) y tiempo de permanencia en la zona central (B) del campo abierto tras la administración de GAL y GAL(1-15) a dosis de 3nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ según test de T-Student versus respectivos controles. N= 5-12 ratas por grupo.

1.2.2 Test de la Natación Forzada.

La comparativa realizada entre los efectos producidos por la inyección de la molécula completa de GAL y su fragmento GAL(1-15) a la dosis de 3nmol, muestra que a nivel de tiempo de inmovilidad, el aumento provocado por el fragmento GAL(1-15) a la dosis de 3 nmol ($p < 0.001$) fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que el inducido por la molécula completa de GAL a la misma dosis ($p < 0.05$) (Figura 7).

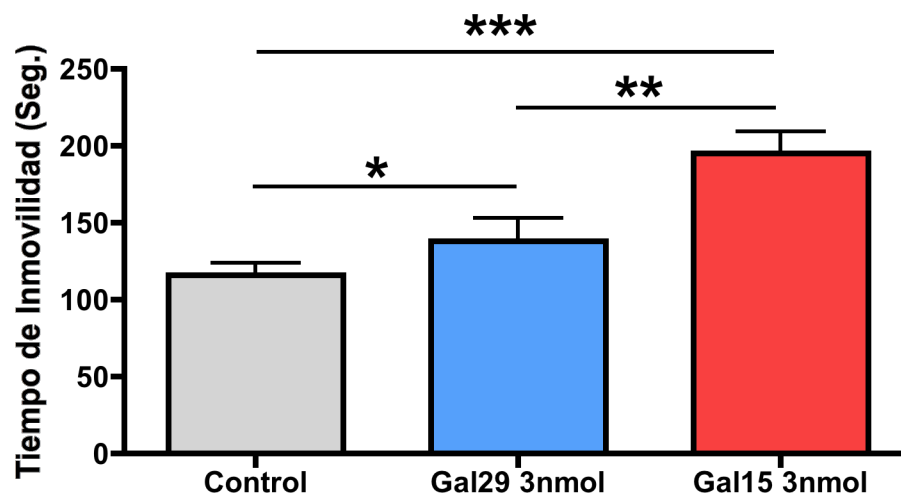


Figura 7. Representación gráfica de la comparativa del Tiempo de inmovilidad registrado durante el test de la natación forzada tras la administración de GAL y GAL(1-15) a dosis de 3nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 7-15 ratas por grupo.

Con respecto al tiempo de escalada, se observa que la reducción significativa en este parámetro producida por la administración del fragmento GAL(1-15) 3 nmol ($p < 0.01$) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la disminución inducida por la molécula completa de GAL ($p < 0.05$) (Figura 8). Por lo tanto, podemos observar un efecto más potente producido por la administración del fragmento GAL(1-15) que el producido por la molécula completa de GAL en el test de la natación forzada, lo que sugiere un efecto más prodepresivo por la GAL(1-15) que por la GAL.

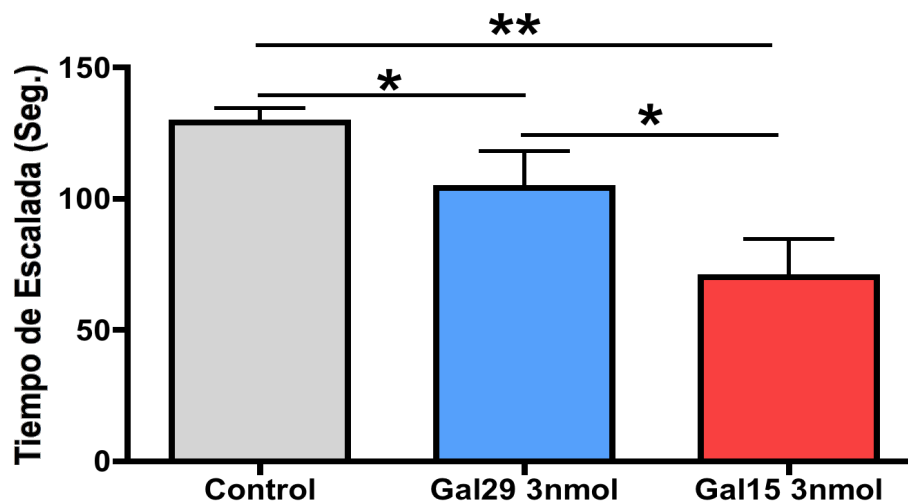


Figura 8. Representación gráfica de la comparativa del Tiempo de escalada registrado durante el test de la natación forzada tras la administración de GAL y GAL(1-15) a dosis de 3nmol. LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 7-13 ratas por grupo.

1.3 Acción del M871, antagonista de receptores tipo 2 de Galanina, en el efecto inducido por GAL(1-15) en las pruebas del Campo abierto y de la Natación Forzada.

1.3.1 Test del Campo abierto.

La administración icv del antagonista M871 a dosis de 3 nmol produce un aumento significativo ($p < 0.01$) respecto al grupo control en el número de entradas en la zona central del campo abierto (Figura 9A). Esta misma dosis del antagonista no produce diferencias significativas en el tiempo de permanencia del animal en la zona central (Figura 9B).

Sin embargo, la coadministración con el antagonista M871 y GAL(1-15), ambos a dosis de 3nmol, produce un bloqueo significativo ($p < 0.05$) en la disminución del número de entradas inducida por GAL(1-15) ($p < 0.01$) en la zona central del campo abierto (Figura 9A).

Respecto al Tiempo de permanencia en la zona central (Figura 9B), la coadministración del antagonista M871 y GAL(1-15), igualmente produce un bloqueo significativo ($p < 0.05$) respecto a la disminución producida por GAL(1-15) 3nmol ($p < 0.05$).

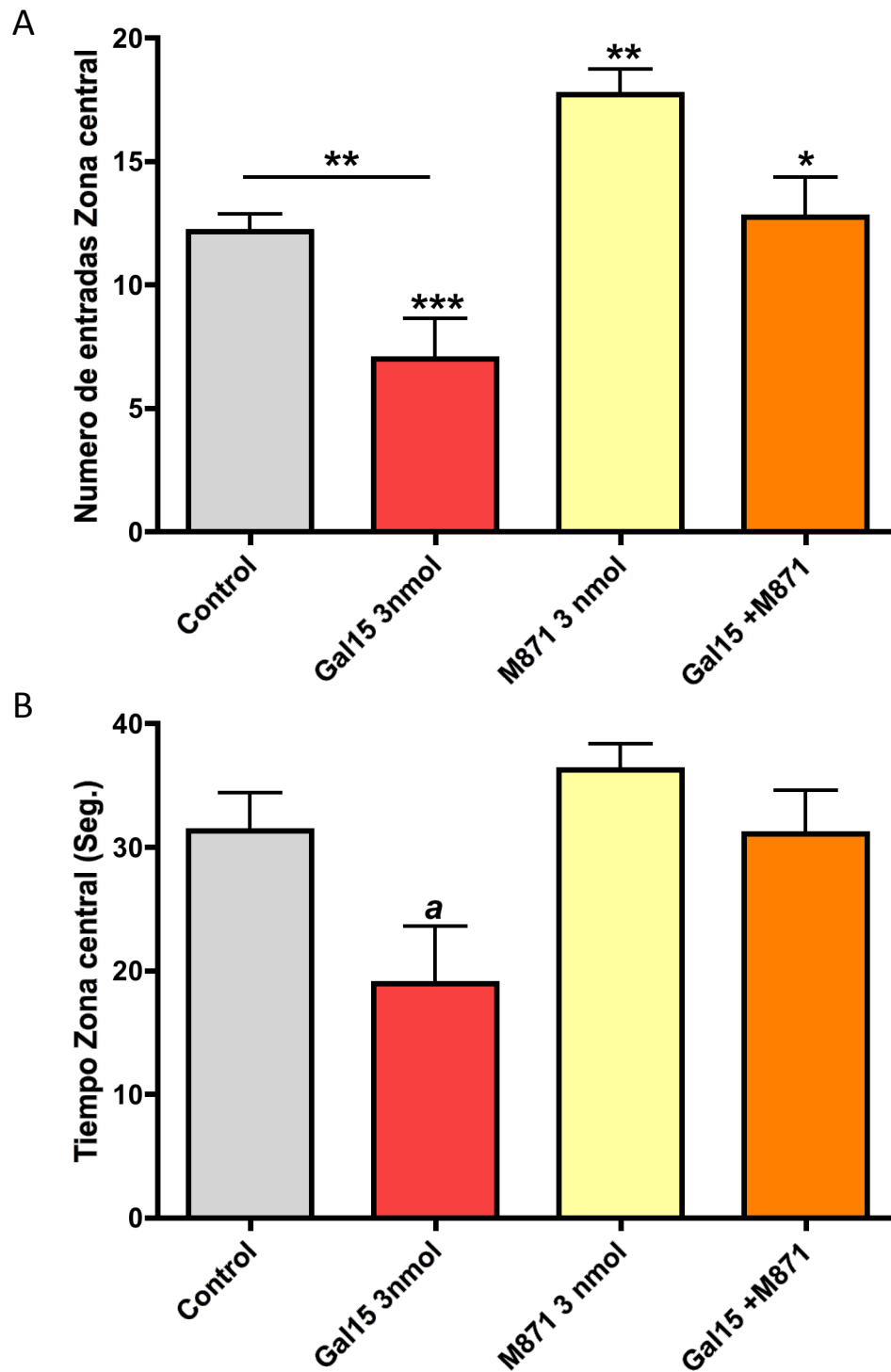


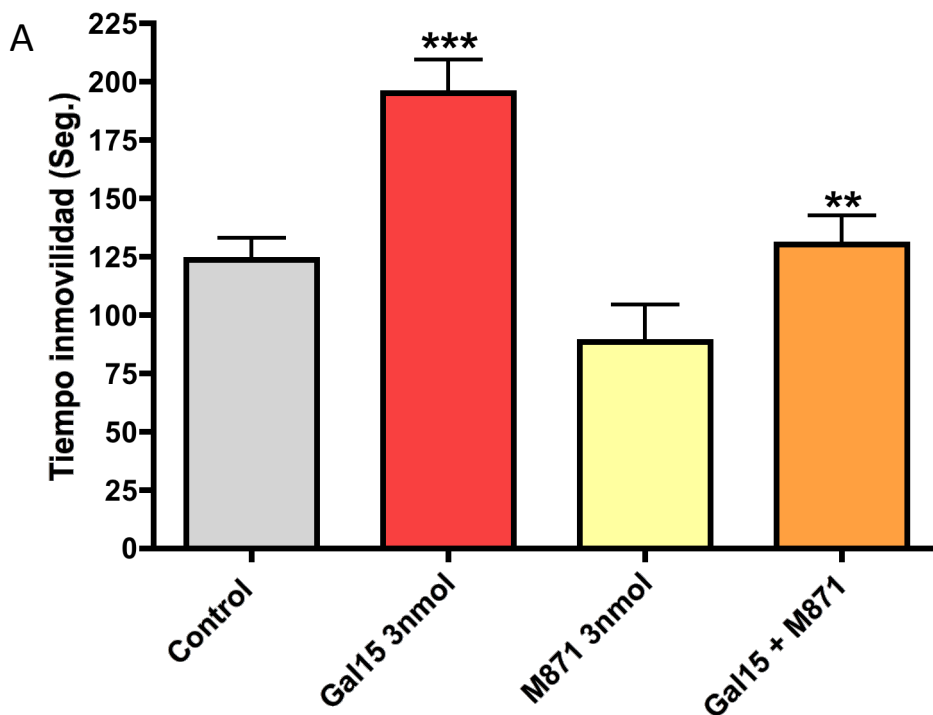
Figura 9. Representación gráfica del número de entradas en la zona central (A) y del tiempo de permanencia en la zona central (B) del campo abierto tras la administración de GAL(1-15) 3nmol, M871 3nmol y la coadministración de ambos. LCRA fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ versus Gal15; ** $p < 0.01$ versus Control y versus Gal15+M871; *** $p < 0.001$ versus M871; ^a $p < 0.05$ versus el resto de grupos según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 6-12 ratas por grupo.

1.3.2 Test de la Natación Forzada.

Como se muestra en la Figura 10, la administración del antagonista M871 a dosis de 3 nmol no produce diferencias significativas respecto al grupo control, ni en el tiempo de inmovilidad (Figura 10A), ni en el tiempo de escalada (Figura 10B) registrado en el test de la natación forzada.

Como ocurre en la prueba del campo abierto, la coadministración icv del antagonista M871 3nmol con GAL(1-15) 3nmol, produce un bloqueo significativo ($p < 0.01$), en el tiempo de inmovilidad, respecto al aumento producido en animales inyectados con GAL(1-15) 3nmol ($p < 0.001$) (Figura 10A).

Además, respecto a el tiempo de escalada, la coadministración de GAL(1-15) con M871, ambos a dosis de 3nmol, bloquea significativamente ($p < 0.01$) la disminución ($p < 0.05$) en el tiempo de escalada producida por la inyección de GAL(1-15) a dosis de 3nmol (Figura 10B).



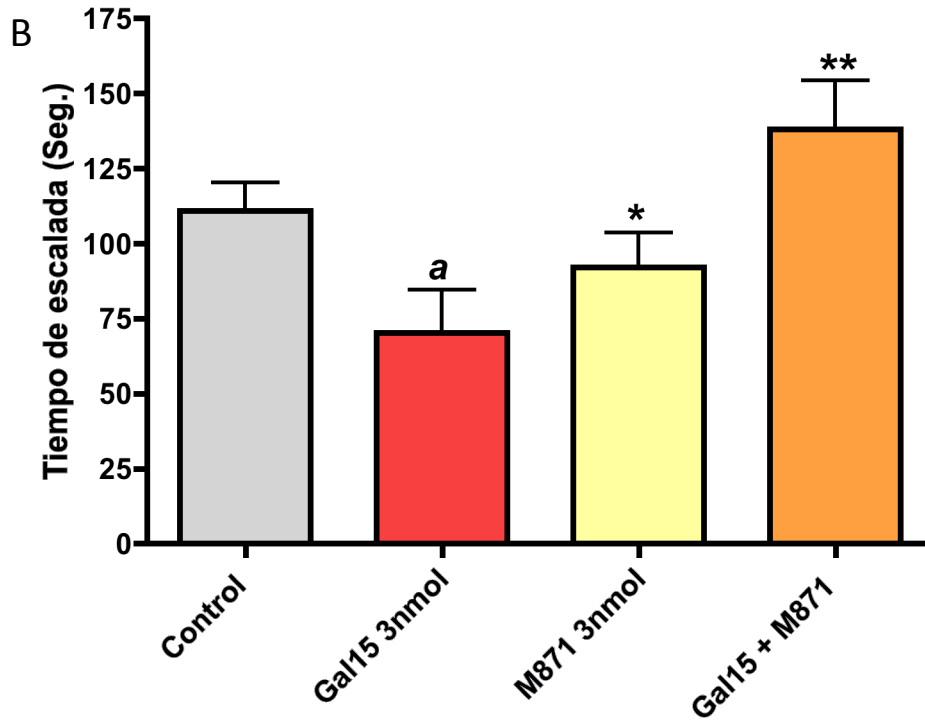


Figura 10. Representación gráfica del Tiempo de inmovilidad (A) y del Tiempo de escalada (B) registrado durante la prueba de la natación forzada tras la administración de GAL(1-15) 3nmol, M871 3nmol y la coadministración de ambos. LCRA fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ versus Gal15+M871; ** $p < 0.01$ versus Gal15; *** $p < 0.001$ versus Control y versus M871; ^a $p < 0.05$ versus Control según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 7-13 ratas por grupo.

2. Técnicas inmunohistoquímicas.

2.1 Inmunohistoquímica simple.

2.1.1 Inmunohistoquímica de GALR1.

Para determinar la localización del receptor GALR1 se ha analizado mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica la expresión del receptor en el Hipocampo dorsal y en el núcleo dorsal del Rafe. En la inmunofluorescencia utilizamos el fluorocromo verde Alexa-488 para marcar los receptores GALR1, y los núcleos celulares, se tiñen con DAPI apareciendo de color azul, lo cual permite diferenciar cada célula y localizar los receptores en la membrana plasmática.

En los experimentos de inmunohistoquímica se estudiaron las zonas del Hipocampo dorsal y núcleo del Rafe mediante microscopía óptica, utilizando un revelado con DAB.

La especificidad de la señal se comprueba omitiendo el anticuerpo primario, utilizándose este experimento como control negativo (Figura 11).

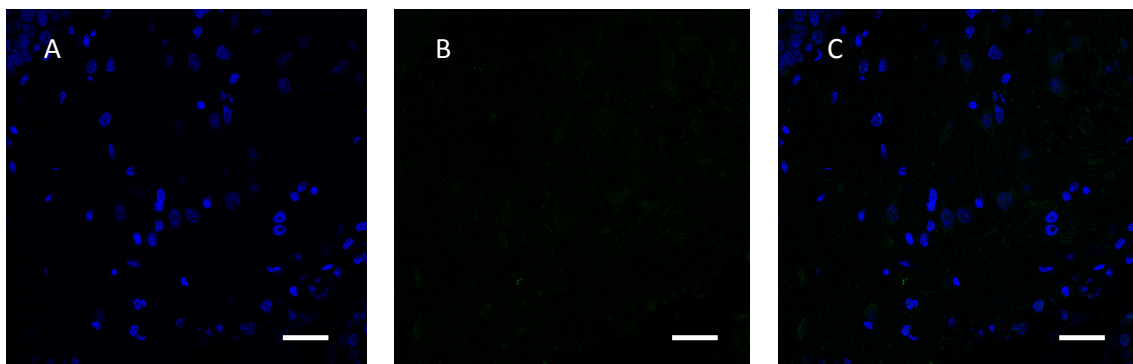


Figura 11. Control primario de la inmunofluorescencia GALR1 en la zona del Giro dentado del Hipocampo dorsal. Se observa que al omitir el anticuerpo GALR1 no se detecta señal del fluorocromo específico verde.(A) detección DAPI (azul), (B) detección de GALR1 (verde) y (C) suma de ambos canales. Barra de escala 50 μ m.

A nivel del hipocampo dorsal, observamos la presencia del receptor GALR1 en las distintas porciones del Cuerno de Ammon (CA1, CA2 y CA3) así como en el Giro Dentado (DG). En el núcleo dorsal del Rafe (DR), también se observa señal específica indicando la presencia del receptor GALR1 (Tabla 3). En las Figuras 12 y 13 se muestran algunas microfotografías representativas del marcaje, mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, de GALR1 en los distintos núcleos.

Núcleo		Detección de GALR1
Hipocampo Dorsal	CA1	Si
	CA2	Si
	CA3	Si
	GD	Si
Rafe Dorsal	RD	Si

Tabla 3. Análisis de la distribución del receptor GALR1 mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en el Hipocampo dorsal (Cuerno de Ammon 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3 respectivamente) y Giro Dentado (GD)) y el núcleo dorsal del Rafe (RD).

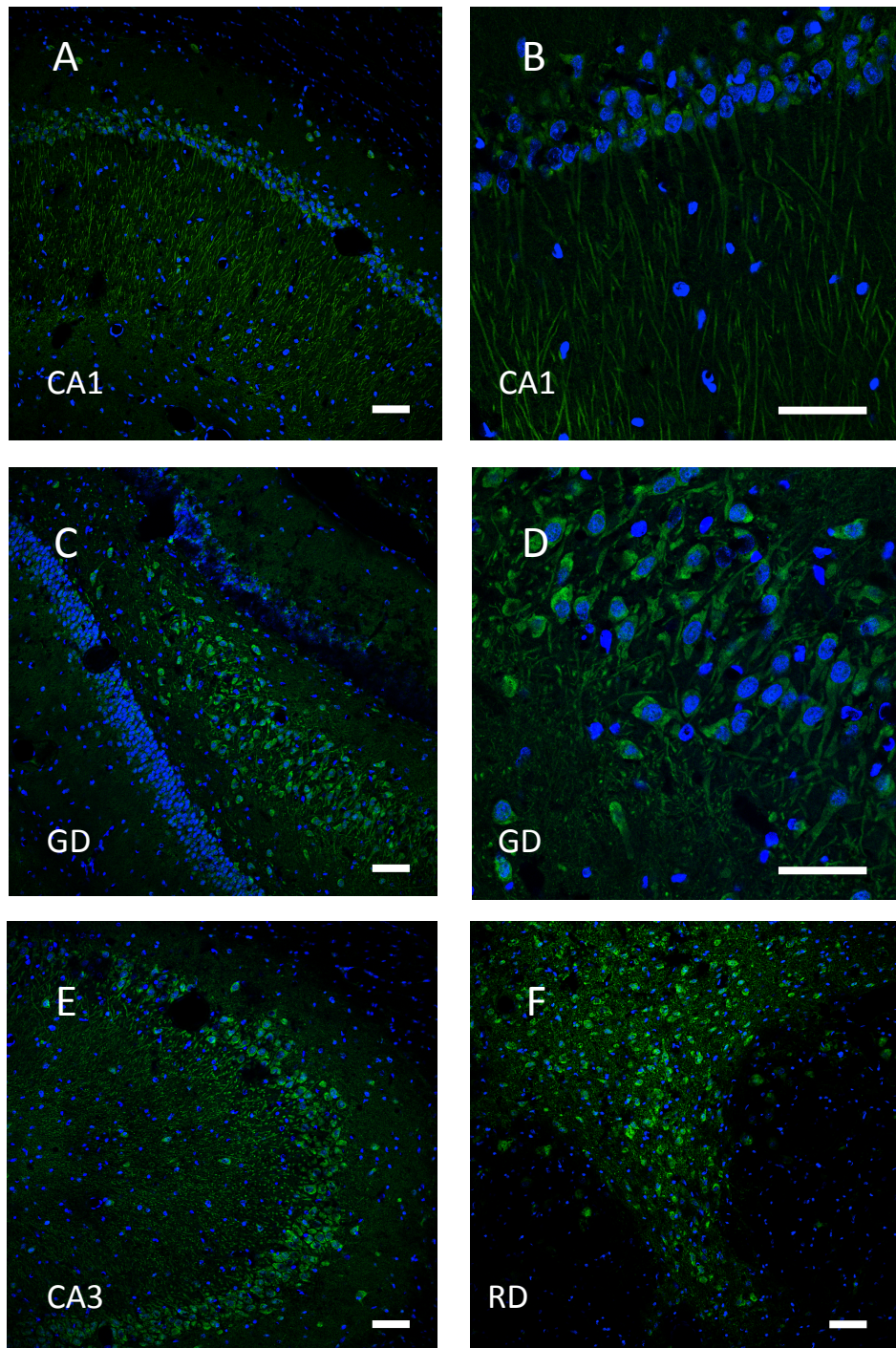


Figura 12. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la detección del receptor GALR1 (verde) por inmunofluorescencia. Se observa, marcaje positivo de GALR1 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1(A ,B), CA3(E) y GD(C,D) así como en el Rafe dorsal (RD)(F). Barra de escala 50 µm.

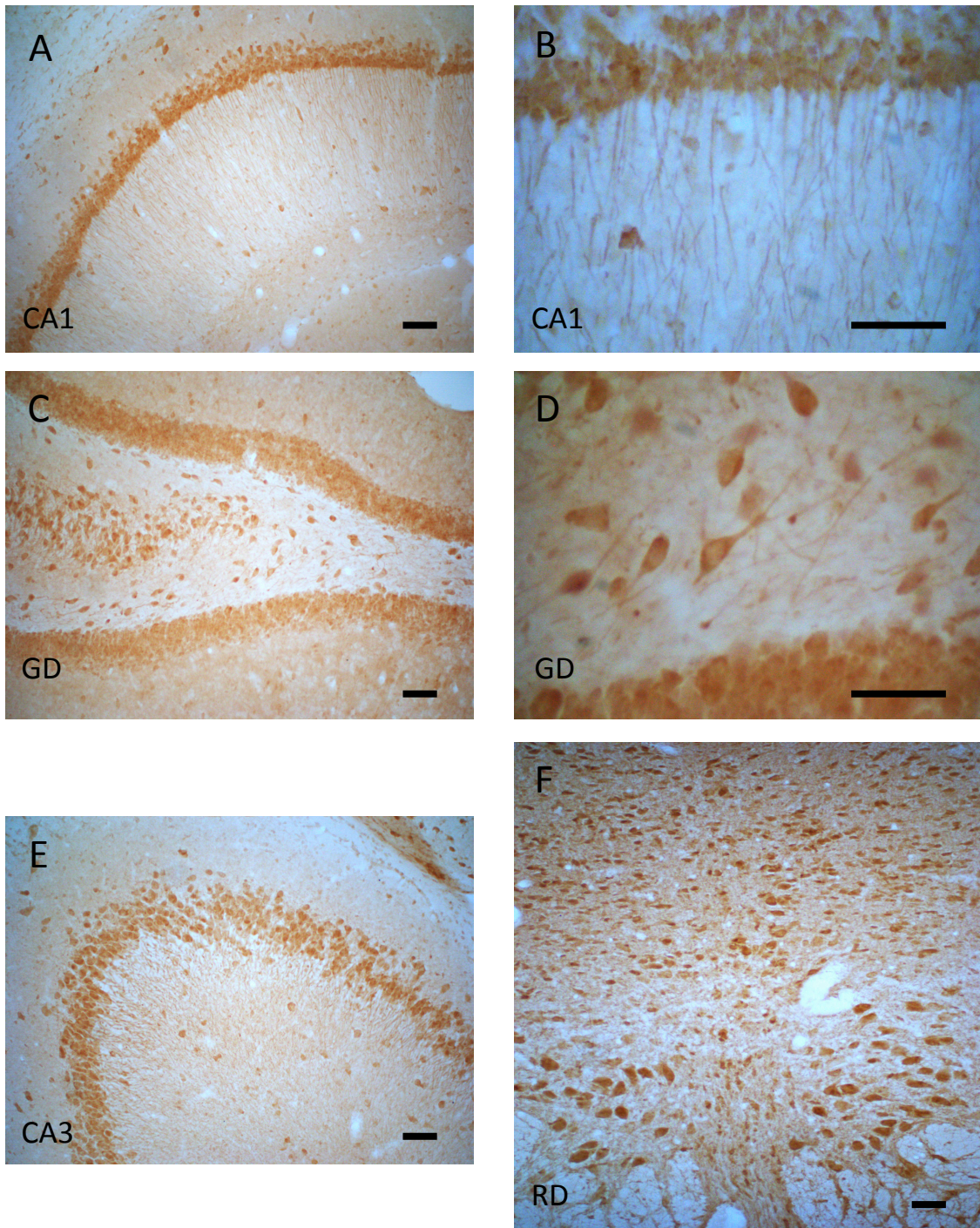


Figura 13. Microfotografías representativas tomadas mediante microscopía óptica de la detección del receptor GALR1 por inmunohistoquímica. Se observa, marcaje positivo de GALR1 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1(A ,B), GD(C,D) y CA3(E) así como en el Rafe dorsal (RD)(F). Barra de escala 50 μ m.

2.1.2 Inmunohistoquímica de GALR2.

Para determinar la distribución del receptor GALR2 se estudia la expresión del receptor en los núcleos objeto de estudio. Para ello, se realiza una inmunofluorescencia donde se marca el receptor GALR2 con el fluorocromo verde Dylight-488 y donde los núcleos celulares se tiñen con DAPI, lo que les confiere un color azul, y permite distinguir las células y determinar la presencia del receptor GALR2 en el citoplasma. Además analizamos las mismas zonas mediante una inmunohistoquímica con un revelado químico.

La especificidad de la señal se comprueba mediante la omisión del anticuerpo de GALR2, mostrándose que no hay señal específica producida por el anticuerpo secundario, dirigido contra él. (Figura 16).

En el análisis de la distribución del receptor de GALR2 en los núcleos objeto de estudio, se observa la presencia del receptor en distintas partes del Hipocampo dorsal, detectándose a lo largo del Cuerno de Ammon (CA1, CA2 y CA3) así como en el Giro Dentado (GD). También se obtuvo señal positiva del receptor GALR2 en el núcleo dorsal del Rafe (RD) (Tabla 4). En las Figuras 14 y 15 se muestran algunas microfotografías representativas del marcaje de GALR2 en los distintos núcleos.

Núcleo		Detección de GALR2
Hipocampo Dorsal	CA1	Si
	CA2	Si
	CA3	Si
	GD	Si
Rafe Dorsal	RD	Si

Tabla 4. Análisis de la distribución del receptor GALR2 mediante inmunofluorescencia en el Hipocampo dorsal (Cuerno de Ammon 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3 respectivamente) y Giro Dentado (GD)) y el núcleo dorsal del Rafe (RD).

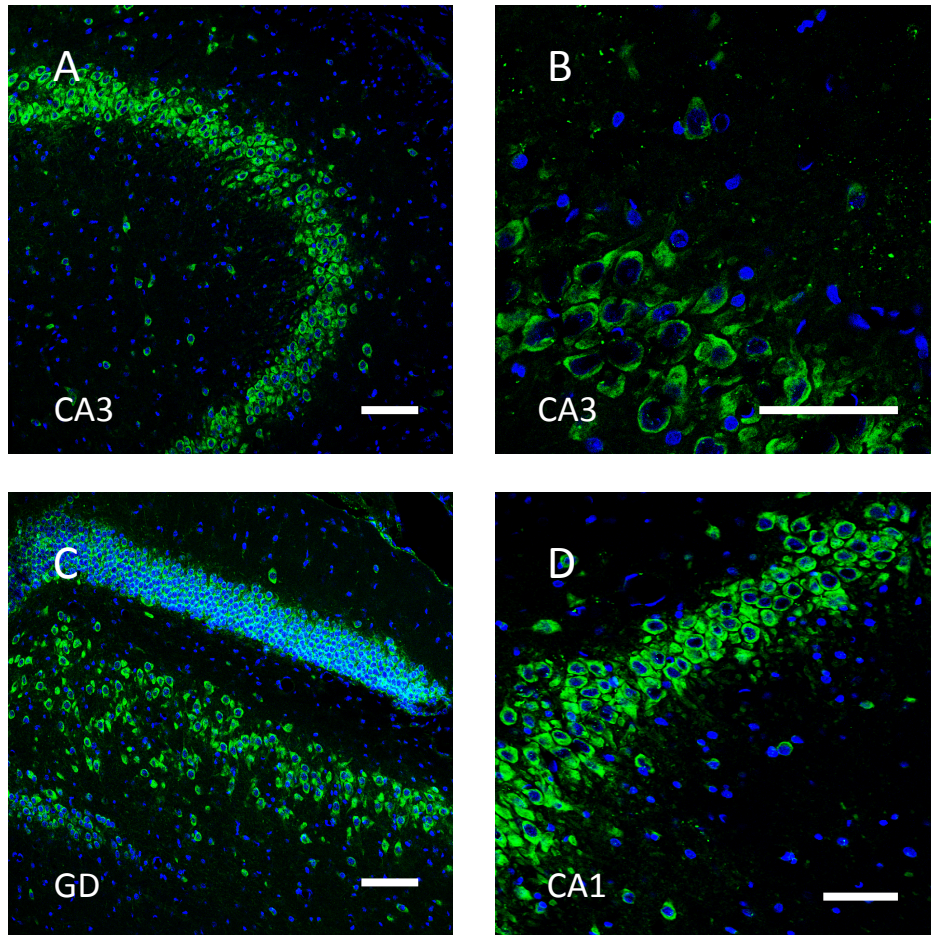


Figura 14. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la detección del receptor GALR2 (verde) por inmunofluorescencia. Se muestra, marcaje positivo de GALR2 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA3(A ,B), GD(C) y CA1(D)). Barra de escala 50 μ m.

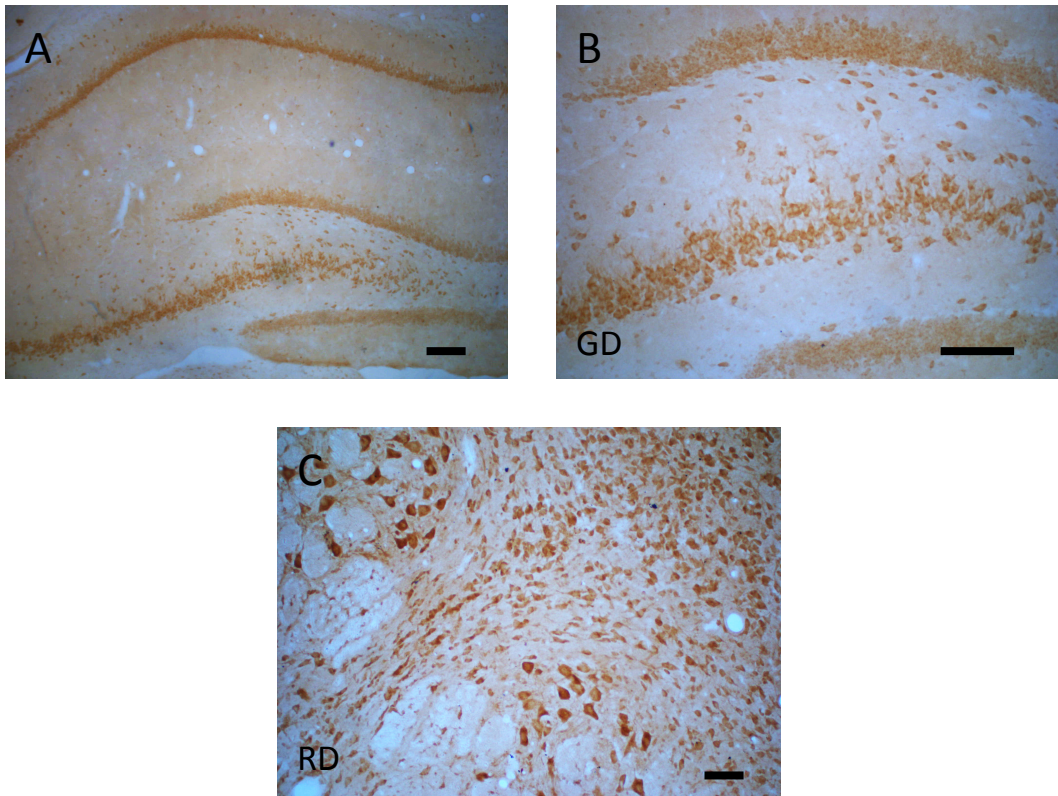


Figura 15. Microfotografías representativas tomadas mediante microscopía óptica de la detección del receptor GALR2 por inmunohistoquímica. Se observa, marcaje positivo de GALR2 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (A) y el Giro dentado (B) así como en el Rafe dorsal (RD)(C). Barra de escala 100 μm (A); 50 μm (B,C).

2.2 Inmunofluorescencia doble GALR1/GALR2.

Se ha analizado mediante doble inmunofluorescencia la coexpresión y colocalización celular de los receptores GALR1 y GALR2 en el Hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe. Para ello, mediante microscopía confocal, se detectan el fluorocromo verde Alexa-488 para marcar el receptor GALR1 y el fluorocromo rojo Dylight 549 para la detección del receptor GALR2.

Mediante controles primarios se comprueba que la señal detectada es específica, demostrando como al omitir un anticuerpo primario no se detecta la señal producida por su fluorocromo específico (El Control negativo de GALR1 se muestra en la Figura 11 y el Control negativo de GALR2 en la Figura 16)

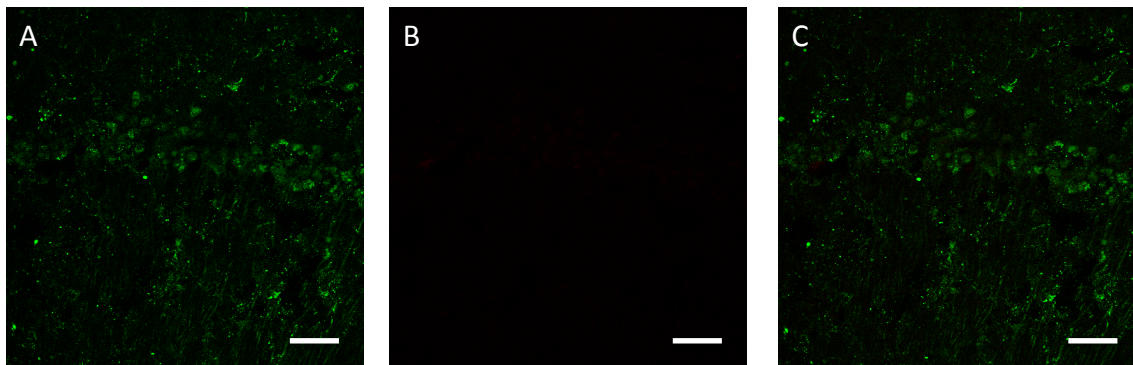


Figura 16. Control primario del anticuerpo de GALR2 en la zona CA1 del Hipocampo dorsal. Se observa que al omitir el anticuerpo GALR2 (B) no se detecta señal del fluorocromo específico rojo.(A) detección de GALR1 (verde), (B) detección de GALR2 (rojo) y (C) suma de ambos canales. Barra de escala 50 μm .

Al analizar las zonas del Hipocampo dorsal, observamos que los receptores GALR1 y GALR2 se colocan en las mismas neuronas a lo largo del Cuerno de Ammon (CA1, CA2 y CA3) así como en el Giro Dentado (GD) (Figuras 17, 18 y 19). También se observa de forma similar la colocación de ambos receptores en el núcleo dorsal del Rafe (RD) (Figura 17). En la Tabla 5 se muestra un resumen de las zonas con colocación de los receptores GALR1 y GALR2 en el Hipocampo dorsal y el Rafe dorsal.

En la Figura 17 se observa la detección tanto de receptores GALR1 (verde) como GALR2 (rojo). El marcaje amarillo-anaranjado, indica que ambos receptores se coexpresan y se colocan en la misma neurona, pudiéndose ver un alto grado de colocación de estos receptores.

Núcleo		Detección de GALR1/GALR2
Hipocampo Dorsal	CA1	Si
	CA2	Si
	CA3	Si
	GD	Si
Rafe Dorsal	RD	Si

Tabla 5. Análisis de la colocación de los receptores GALR1 y GALR2 mediante inmunofluorescencia doble en el Hipocampo dorsal (Cuerno de Ammon 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3 respectivamente) y Giro Dentado (GD)) y el núcleo dorsal del Rafe (RD).

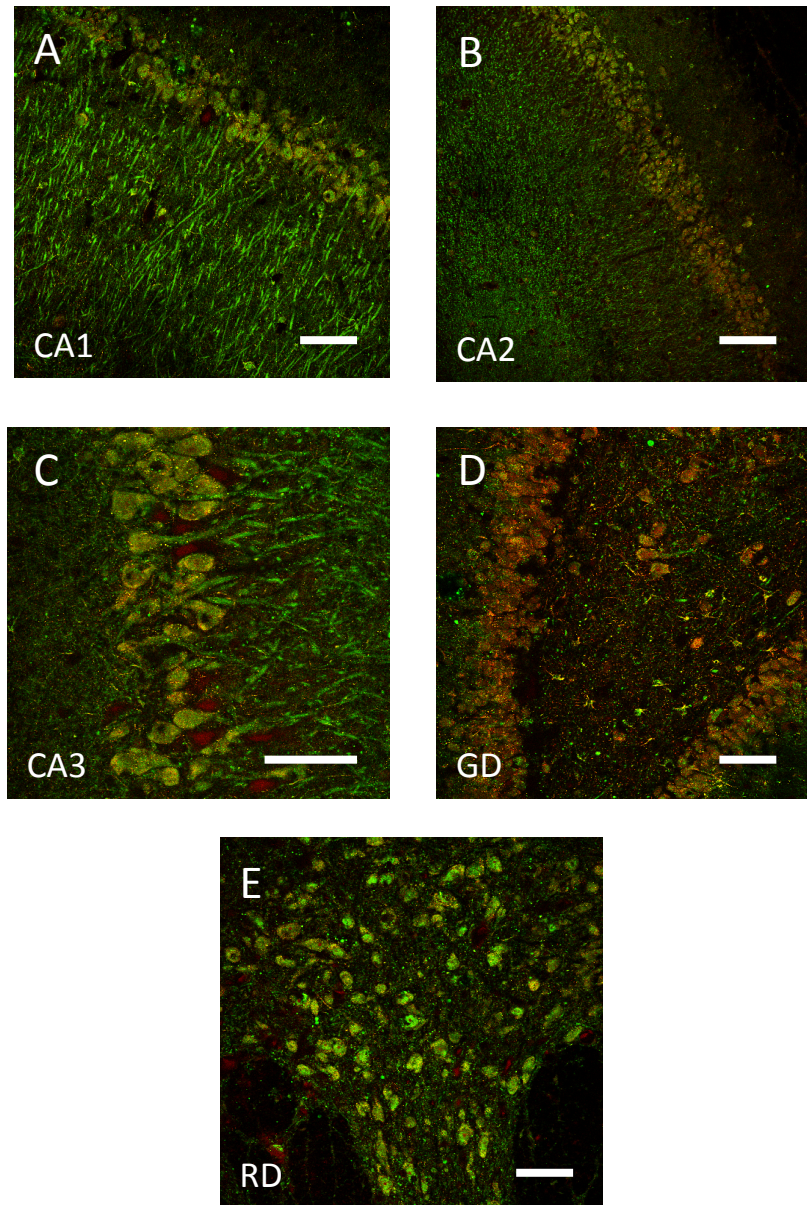


Figura 17. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores GALR1 (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo naranja). Se observa, colocalización de GALR1 y GALR2 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1(A), CA2(B), CA3(C) y GD(D) así como en el Rafe dorsal (RD)(E). Barra de escala 50 μ m.

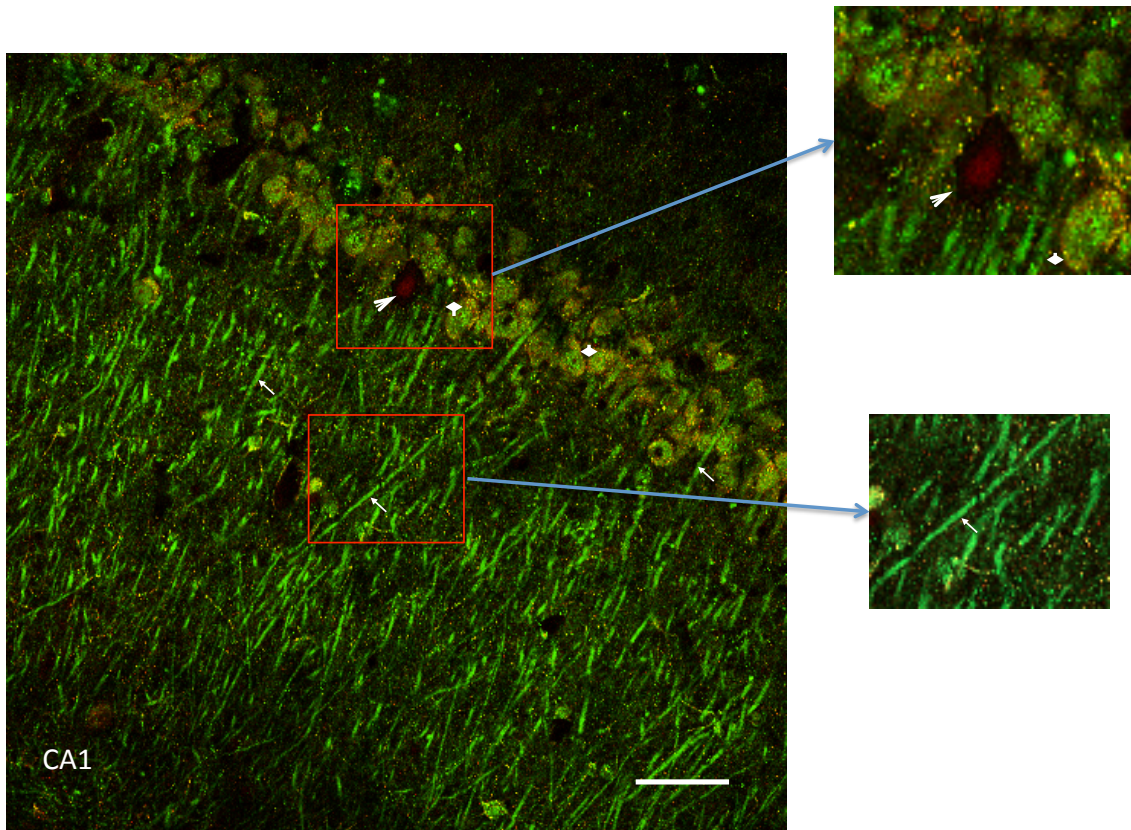


Figura 18. Fotografía representativa mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores GALR1 (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo-naranja). Se muestra, colocalización de GALR1 y GALR2 (Rombo) en la zona de CA1 del Hipocampo dorsal así como magnificaciones donde se observan células que presentan sólo inmunorreactividad para GALR2 (cabeza de flecha) y fibras con señal única de GALR1 (flecha). Barra de escala 50 μ m.

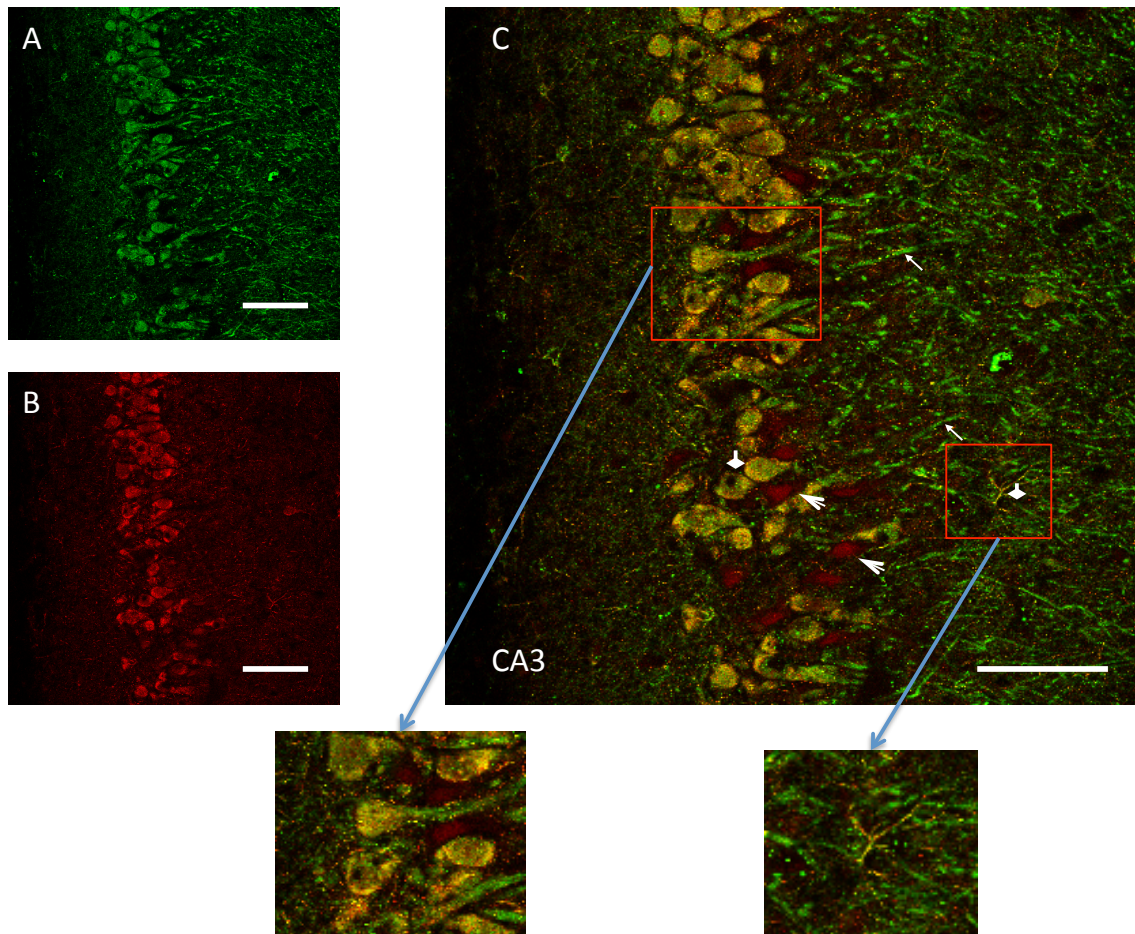


Figura 19. Fotografía representativa mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores GALR1 (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo-naranja). Se muestra, colocalización de GALR1 y GALR2 en la zona de CA3 del Hipocampo dorsal. Las flechas indican sólo la presencia de GALR1, las cabezas de flecha muestran únicamente la presencia de GALR2 y la colocalización de ambos receptores está indicada por los rombos. En las magnificaciones se observan tanto células como fibras donde coexisten ambos receptores. Barra de escala 50 μ m.

3. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en tejido.

Hemos analizado, mediante la técnica de ligazón por proximidad, si los receptores GALR1 y GALR2 se encuentran en estrecha proximidad (entre 10 y 20 nm) en los núcleos estudiados lo que se detecta como puntos rojos. Esta proximidad permitiría la posible formación de complejos heterodímeros entre ambos receptores. Los núcleos celulares se tiñen con DAPI, lo que les confiere un color azul, y permite distinguir las células y determinar la presencia del complejo GALR1-GALR2 en el citoplasma.

Para comprobar la especificidad de la señal obtenida, además de los controles primarios que se realizaron en las pruebas de inmunofluorescencias (ver apartados anteriores), se analizan zonas con ausencia de señal por la falta de algunos de los receptores, como es el caso del Cuerpo Calloso (CC). Como se muestra en la Figura 20, la ausencia de señal demuestra la especificidad de la señal.

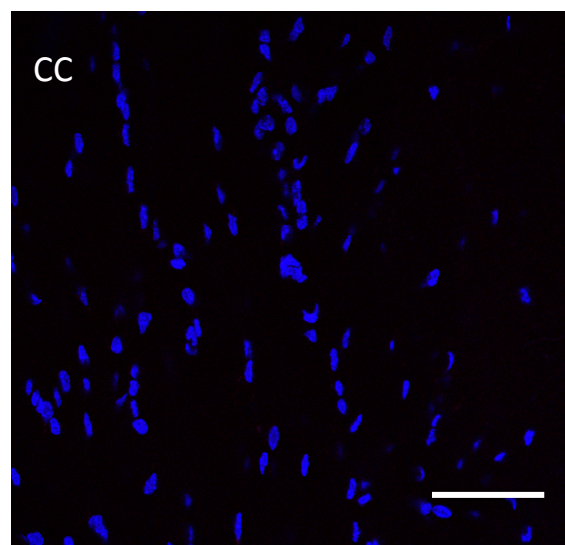


Figura 20. Fotografía representativa de zonas negativas en la prueba de ligazón por proximidad como es el Cuerpo Calloso (CC), debido a la ausencia del receptor GALR2 en esta zona. La ausencia de señal positiva en estas zonas, tras el análisis, demuestra que la señal encontrada es específica del complejo GALR1/GALR2. Barra de escala 50 μ m.

Al analizar la señal producida mediante la técnica de ligazón por proximidad en las zonas del Hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe (Figura 21), observamos que existe proximidad de los receptores GALR1 y GALR2 (se observan puntos rojos) en distintas zonas del Hipocampo dorsal, como son el Cuerno de Ammon (CA1, CA2 y CA3) y el Giro Dentado (GD). En las neuronas del núcleo dorsal del Rafe (RD) también se puede observar señal roja, lo que indica la formación del complejo GALR1-GALR2.

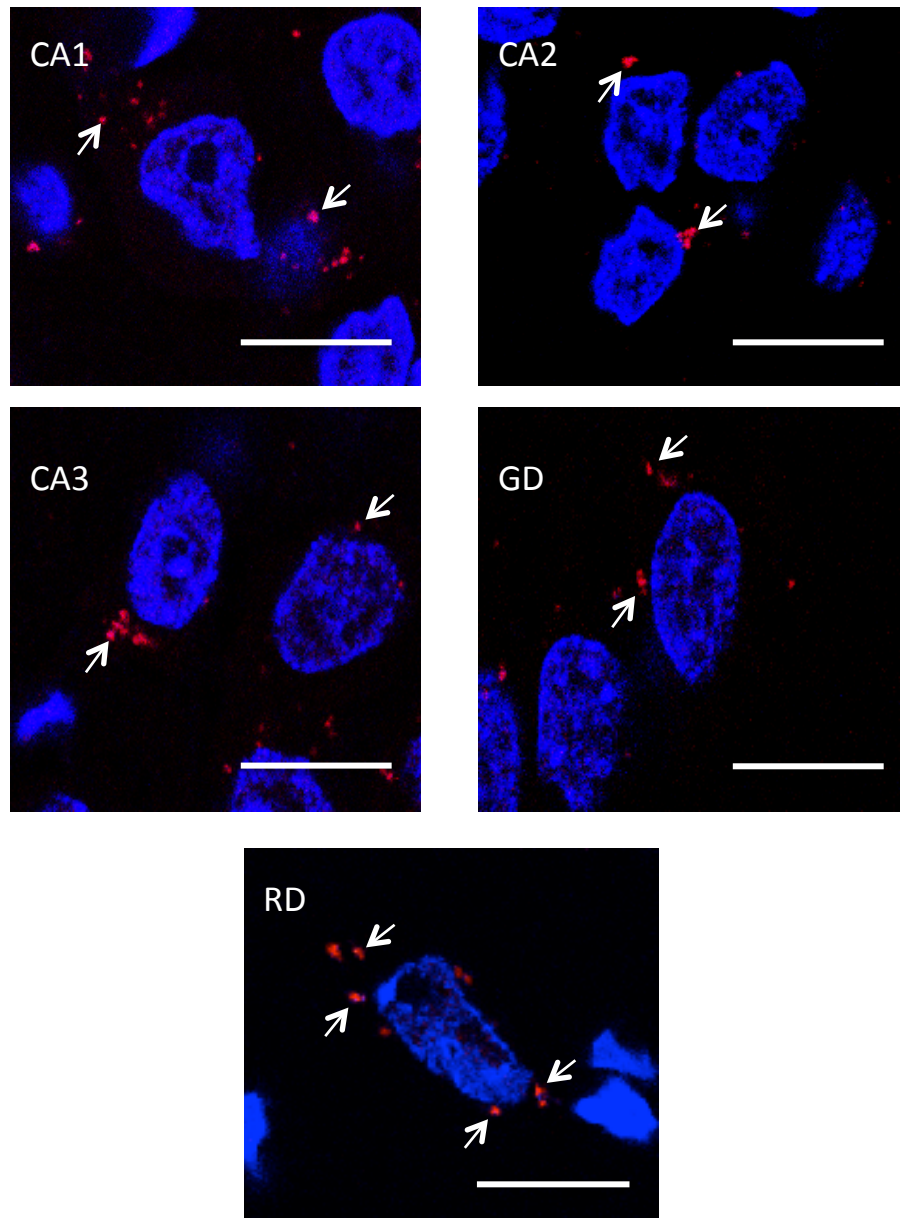


Figura 21. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la técnica del PLA de los receptores GALR1 y GALR2 donde se observa la estrecha proximidad entre ambos receptores (puntos rojos). Se observa, proximidad entre GALR1 y GALR2 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD así como en el Rafe dorsal (RD)). Barra de escala 10 μm.

Al realizar la cuantificación de estos complejos (puntos rojos) en el citoplasma celular de las distintas zonas observamos que, como se muestra en la Figura 22, la media de complejos GALR1-GALR2 por célula, en las distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD), se mantiene constante, no habiendo diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, se observa un aumento significativo ($p < 0.001$), de más del 100% en la media de complejos por célula, en el núcleo del Rafe dorsal con respecto a las distintas zonas estudiadas del Hipocampo.

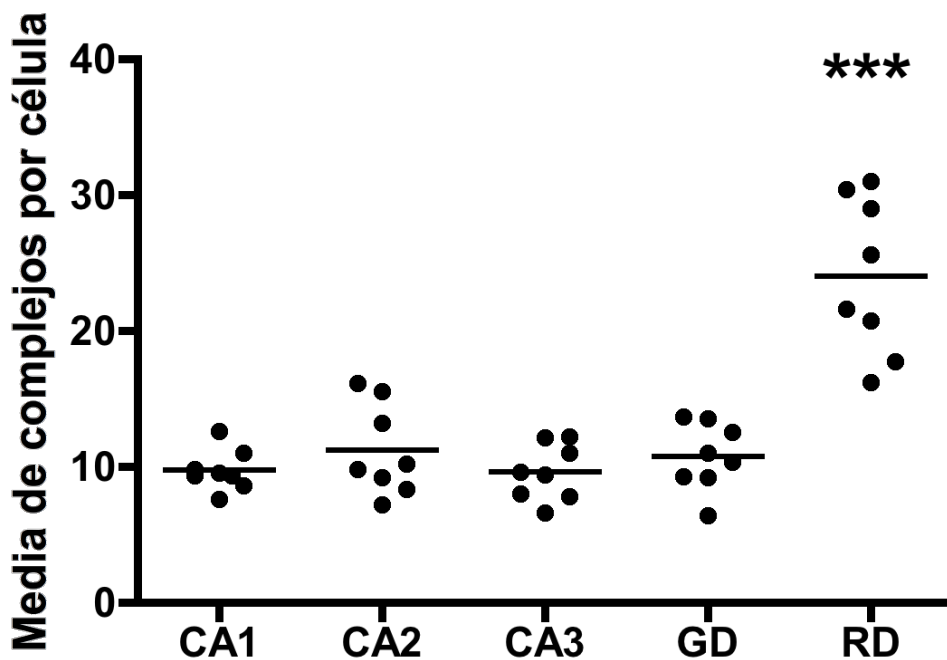


Figura 22. Representación gráfica de la cuantificación de complejos GALR1-GALR2 en la técnica de PLA. Se analizan distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD) así como núcleo dorsal del Rafe (RD). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. La cuantificación fue realizada sobre 10-20 células por fotografía, y se realizaron 8 fotografías por zona. Cada punto en la grafica representa una media de entre 10 y 20 células. Se analizaron entre 80 y 160 células por zona. *** $p < 0.001$ versus resto de grupos según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls.

En la Figura 23, se muestra una fotografía representativa de la capa molecular del giro dentado, en el Hipocampo dorsal, donde no se ve señal positiva de PLA aunque existen receptores GALR1 y GALR2. Esto confirma que la formación del heterodímero es específica en algunas zonas del cerebro.

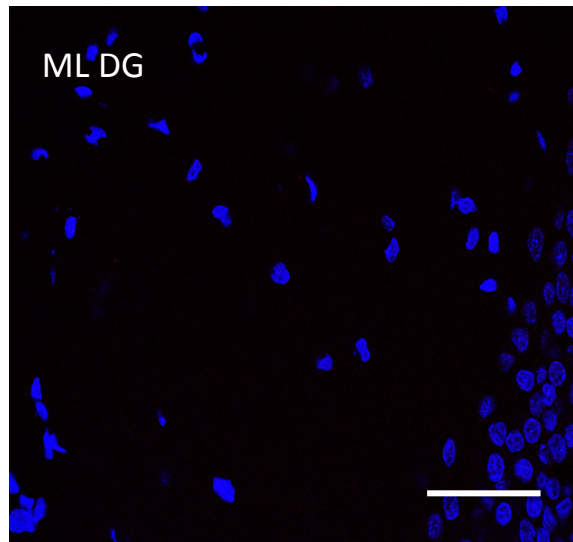


Figura 23. Fotografía representativa de zonas negativas en la prueba de ligazón por proximidad como es la capa molecular del Giro Dentado (ML DG). La ausencia de señal positiva en esta zonas demuestra que la señal encontrada en otras zonas es específica del complejo GALR1/GALR2. Barra de escala 50 µm.

4. Animales KnockDown para el receptor GALR2.

4.1 Análisis de la expresión de GALR2 mediante Inmunohistoquímica en animales KnockDown de GALR2.

El modelo de animal knockdown para el receptor GALR2 se generó inyectando icv siRNA contra GALR2. Se realizó una curva de tiempo con el fin de comprobar el punto de mínima expresión del receptor tras la administración de siRNA. La expresión del receptor GALR2 se cuantificó, mediante la técnica de inmunohistoquímica en el Hipocampo dorsal (CA1), uno de los núcleos objeto de estudio, y en la Corteza Piriforme, zona alejada del ventrículo. El análisis en zonas alejadas nos permitió comprobar la difusión efectiva del siRNA tras la administración icv.

Como se muestra en la Figura 24, en el Hipocampo dorsal (CA1) hay una máxima reducción de la expresión de GALR2 en el día 8, en torno al 35% ($p < 0.001$). Esa reducción en la expresión del receptor se mantiene durante los días 10 y 12 volviendo a niveles de vehículo al día 14 tras la administración del siRNA.

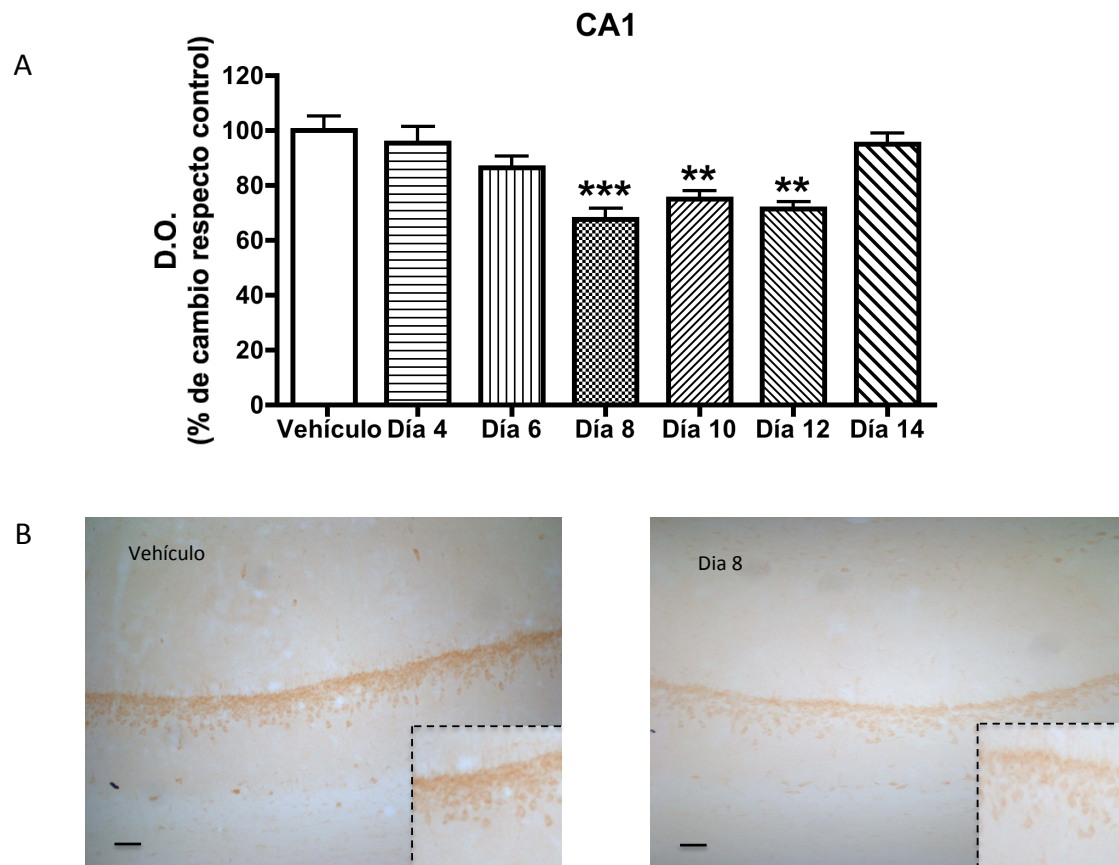


Figura 24. (A) Representación gráfica de la expresión del receptor GALR2 en el Hipocampo dorsal (CA1), estimada mediante la cuantificación de la densidad óptica (D.O.) de la señal obtenida por inmunohistoquímica, en animales después de 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días de la inyección icv de siRNA GALR2. $**p<0.01$ y $***p<0.001$ respecto al grupo inyectado con vehículo según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. (B) Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica realizada en animales inyectados con la sustancia vehículo y animales 8 días después de la inyección icv de siRNA GALR2. Barra de escala 50 μm .

De la misma manera, en la Corteza Piriforme, se observa una reducción de la expresión significativamente ($p<0.001$) del receptor GALR2, de alrededor del 50%, 8 días tras la inyección del siRNA GALR2. Por tanto, el día 8 es el de menor expresión del receptor. El Día 10, existe también una reducción significativa ($p<0.05$) de la expresión de GALR2, restableciéndose la cantidad de expresión de proteína progresivamente hasta volver a los niveles del grupo vehículo el día 14 (Figura 25). El hecho de que la expresión de GALR2 se reduce tras la inyección icv del siRNA GALR2 en la Corteza Piriforme, núcleo alejado del ventrículo lateral, indica que la difusión de la inyección es óptima.

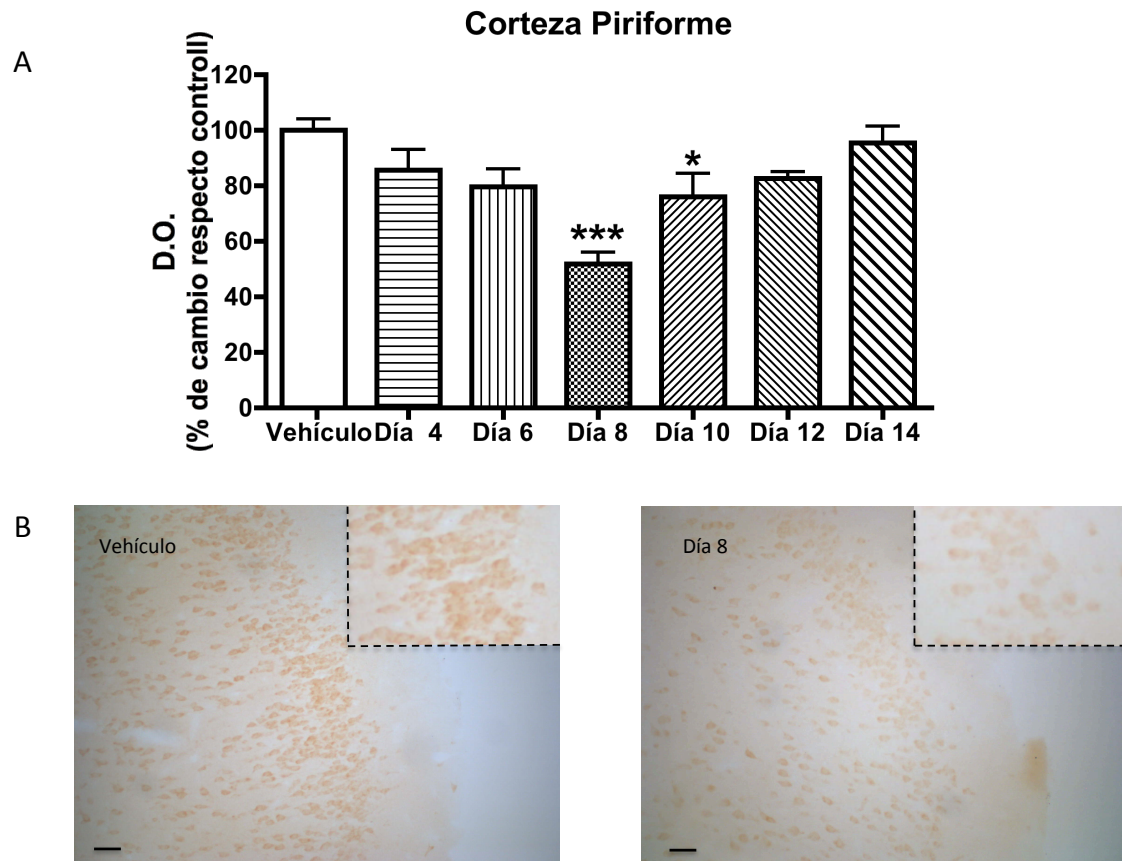


Figura 25. (A) Representación gráfica de la expresión del receptor GALR2 en la Corteza Piriforme, estimada mediante la cuantificación de la densidad óptica (D.O.) de la señal obtenida por inmunohistoquímica, en animales después de 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días de la inyección icv de siRNA GALR2. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ respecto al grupo inyectado con vehículo según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. (B) Microfotografías representativas de la inmunohistoquímica realizada en animales inyectados con la sustancia vehículo y animales 8 días después de la inyección icv de siRNA GALR2. Barra de escala 50 μm .

4.2 Inmunofluorescencia doble GALR1/GALR2 en tejido de rata Knockdown GALR2.

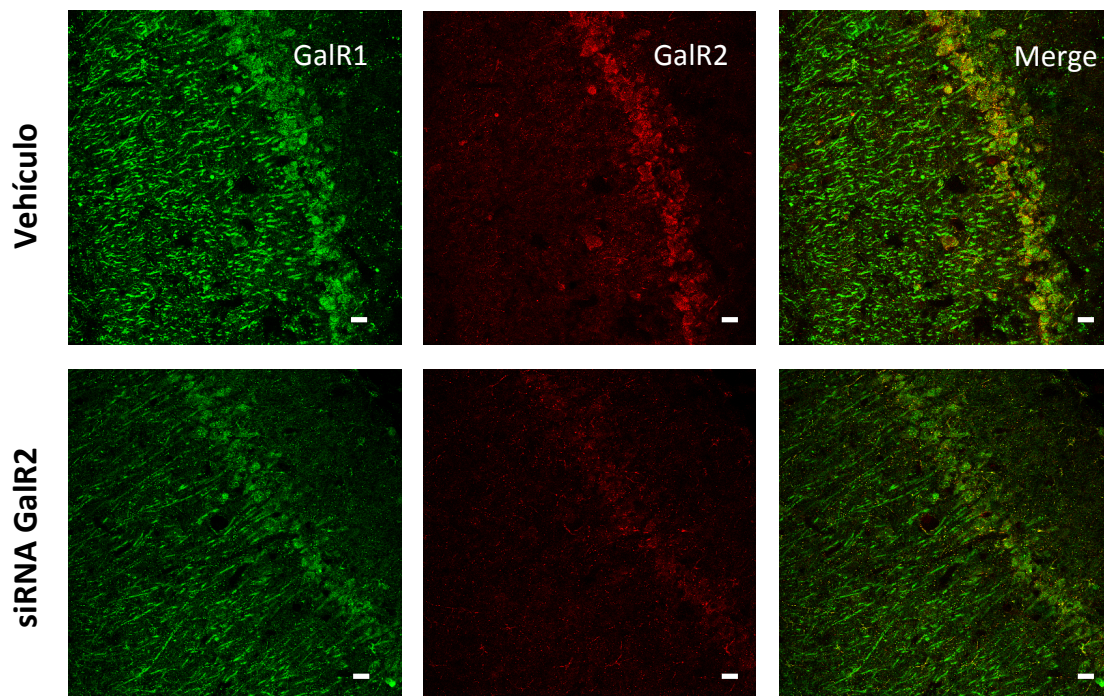
Mediante inmunofluorescencia doble contra los receptores GALR1 y GALR2 analizamos la reducción de la expresión del receptor GALR2 en los núcleos objeto de estudio.

Como se observa en la Figura 26 A, se produce una reducción del marcaje de GALR2 (Rojo) en la zona del Hipocampo dorsal (CA1) de los animales Knockdown. Observando también, que la coexpresión y colocalización de GALR2 y GALR1 (amarillo; merge) queda muy reducida, siendo visible en muy superior medida, el receptor GALR1 (verde).

De igual forma, en la Figura 26 B, se observa una reducción de la señal de GALR2 (Rojo) en las células del Rafe dorsal comparado con el vehículo, quedando muy reducida la coexpresión y colocalización de GALR1 y GALR2 en este núcleo (Amarillo; merge).

Además el modelo nos sirve para confirmar la especificidad del anticuerpo anti-GALR2, así al observar una reducción importante de la señal de GALR2, en animales donde específicamente se ha reducido la expresión de este receptor, comprobamos que la mayor parte de la unión del anticuerpo anti-GALR2 es específica.

A



B

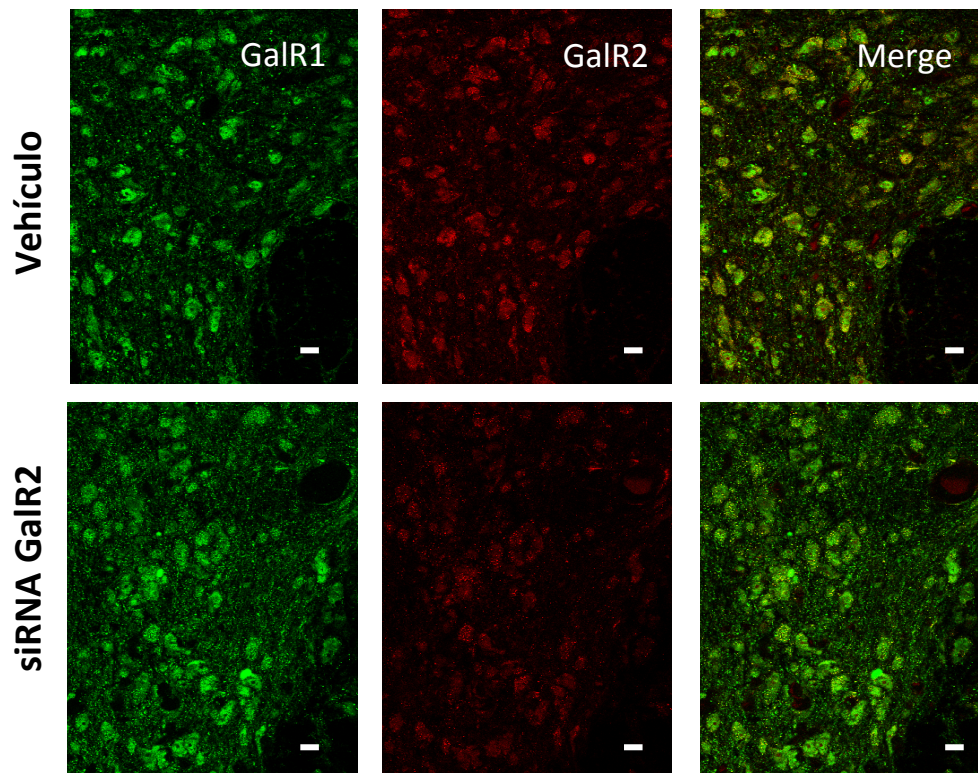


Figura 26. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores GALR1 (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo-naranja; merge), en animales inyectados con siRNA GALR2, 9 días antes (Knockdown GALR2) y animales inyectados con el Vehículo. (A) Hipocampo dorsal (CA1). (B) Rafe dorsal. Barra de escala 20 μm .

4.3 Análisis de la expresión de ARNm de GALR2 mediante RT-qPCR en animales KnockDown de GALR2.

La expresión de ARN mensajero (ARNm) del receptor GALR2 en el Hipocampo dorsal se cuantifica mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR) para hallar el punto de mínima expresión de ARNm en animales inyectados con siRNA GALR2 en los distintos días.

A los 4 días tras la inyección del siRNA se observa una reducción significativa ($p < 0.05$) de la expresión del mensajero del receptor GALR2, reducción que perdura hasta el día 6. A partir de este día se vuelve progresivamente a los niveles basales de vehículo en el día 14 (Figura 27).

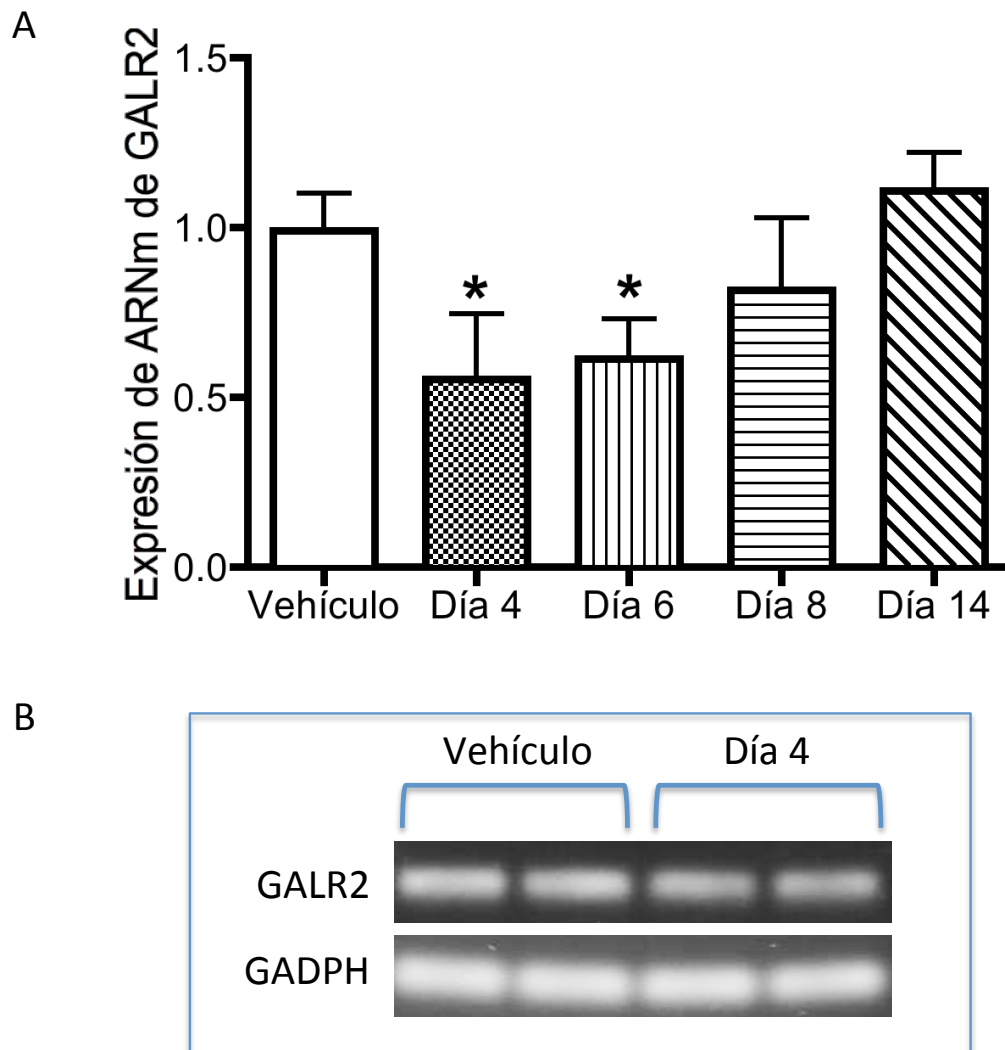


Figura 27. (A) Representación gráfica de la expresión del ARNm de GALR2 en el Hipocampo dorsal, obtenida mediante RT-PCRq, en animales después de 4, 6, 8 y 14 días de la inyección icv de siRNA GALR2. El resultado de la PCRq fue normalizado con respecto a la expresión del gen GADPH y expresado en unidades arbitrarias. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ respecto al grupo inyectado con vehículo según test de T-Student. (B) Imágenes representativas de los productos de la PCRq de animales Vehículo y día 4 en un gel de agarosa.

4.4 Efecto de la administración de la dosis efectiva de GAL(1-15) en animales Knockdown en las pruebas de la Natación Forzada y del Campo abierto.

4.4.1 Test de la Natación Forzada.

Para verificar que el sistema Accell empleado en el silenciamiento del gen del receptor GALR2 no afecta a ningún parámetro de la natación forzada, generamos animales siRNA Control (inyectados con siRNA sin diana) y animales Vehículo (Inyectados con Delivery Media). Observándose que el sistema Accell no produce ningún efecto en los parámetro del test de la natación forzada, no existiendo diferencias significativas ni en el tiempo de inmovilidad, ni en el tiempo de escalada, ni en el tiempo de natación medidos durante el test, en ninguno de los grupos de animales (Tabla 6).

	Control (LCRa)	Vehículo (DM)	siRNA Control
Tiempo de inmovilidad (Seg.)	123±9	102,3±49	86,8±12
Tiempo de escalada (Seg.)	110,8±9	67,3±22	88,9±15
Tiempo de natación (Seg.)	50,5±8	95,2±40	89±18

Tabla 6. Tiempo de inmovilidad, escala y natación en el test de la natación forzada, de animales Control (LCRa), Vehículo (Delivery Media) y siRNA Control (siRNA sin diana). Los resultados se muestran como la media ± error estándar de la media.

Al comparar los animales siRNA Control, los Knockdown GALR2 y los Knockdown GALR2 inyectados 15 minutos antes de la prueba con GAL(1-15) 3 nmol, observamos, que al igual que ocurre en el campo abierto, los animales knockdown GALR2 no se comportan significativamente diferente de los siRNA Control en los parámetros medidos en el test de la natación forzada, comprobándose por tanto que la reducción de la expresión del receptor GALR2 no afecta en el test de la natación forzada(Figura 28 A, B y C).

También se observa, que la reducción del receptor GALR2 obtenida en los animales Knockdown es suficiente para bloquear el efecto producido por la inyección de GAL(1-15) 3nmol en la natación forzada (Figura 28).

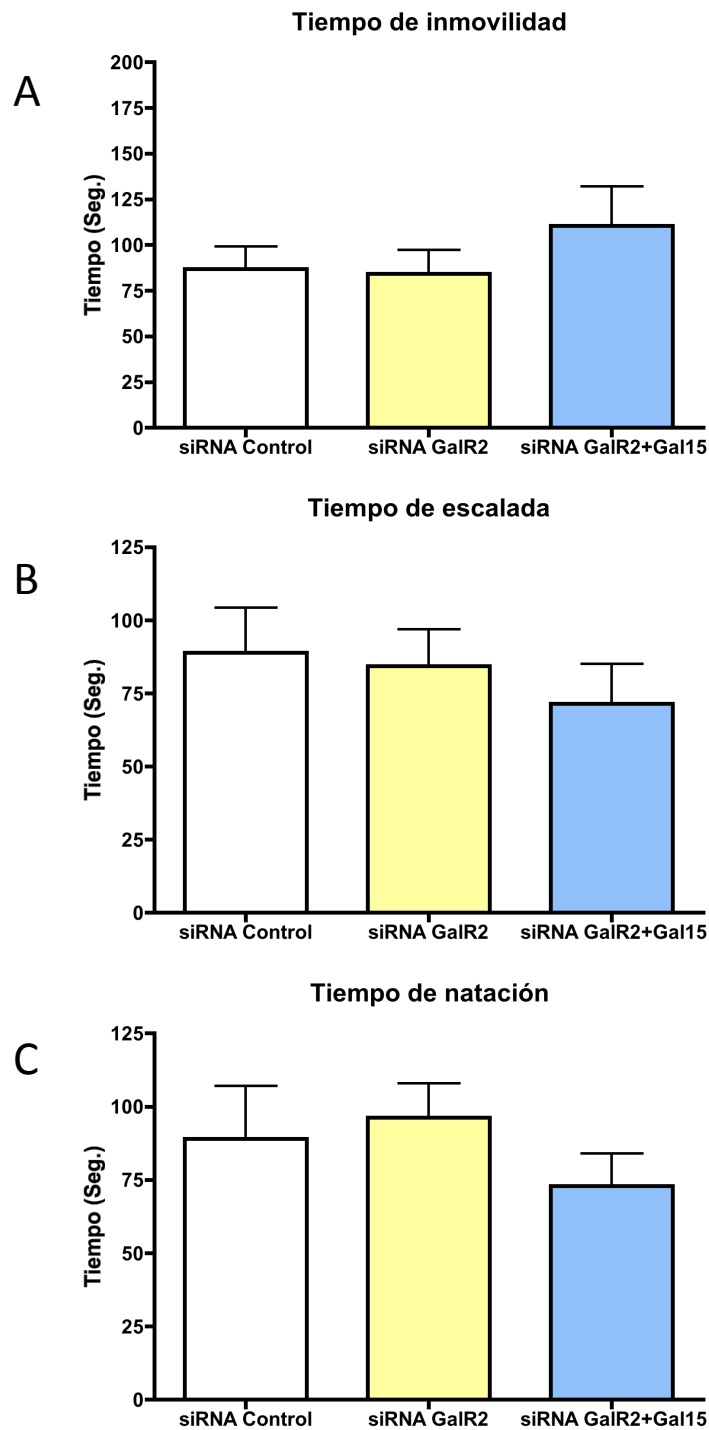


Figura 28. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada, tras la administración de siRNA Control, siRNA GALR2 9 días antes de la prueba (knockdown GALR2) y la Administración de GAL(1-15) 3nmol 15 minutos antes de la prueba en animales Knockdown GALR2. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. N= 5-8 ratas por grupo.

4.4.2 Test del Campo Abierto.

Como en el test de la natación forzada, el sistema Acell empleado en el silenciamiento del gen del receptor GALR2 no afecta a ningún parámetro del campo abierto, no observándose ninguna diferencia entre los distintos grupos de animales control.

En la Figura 29 se muestra el número de entradas y el tiempo de permanencia en la zona central del campo abierto de animales inyectados con siRNA Control, animales inyectados con siRNA GALR2 7 días antes de la realización de la prueba (Knockdown GALR2) y animales knockdown GALR2 a los que se les administra GAL(1-15) a dosis efectiva de 3 nmol 15 minutos antes de la prueba. Se puede observar, que no existen diferencias significativas ni en el número de entradas (Figura 29 A) ni en el tiempo de permanencia en la zona central (Figura 29 B) entre los grupos inyectados con siRNA Control y siGALR2. Comprobándose que los animales que presentan reducida la expresión del receptor GALR2 no presentan ninguna alteración en la prueba del campo abierto. Tampoco se observa diferencia significativa en los parámetros medidos en el campo abierto entre el grupo inyectado con GAL(1-15) en animales knockdown GALR2 y los grupos siRNA GALR2 y siRNA Control, lo que indica que la bajada de la expresión del GALR2 es suficiente para bloquear el efecto producido por GAL(1-15) tanto en el número de entradas (Figura 29 A) como en el tiempo en la zona central (Figura 29 B).

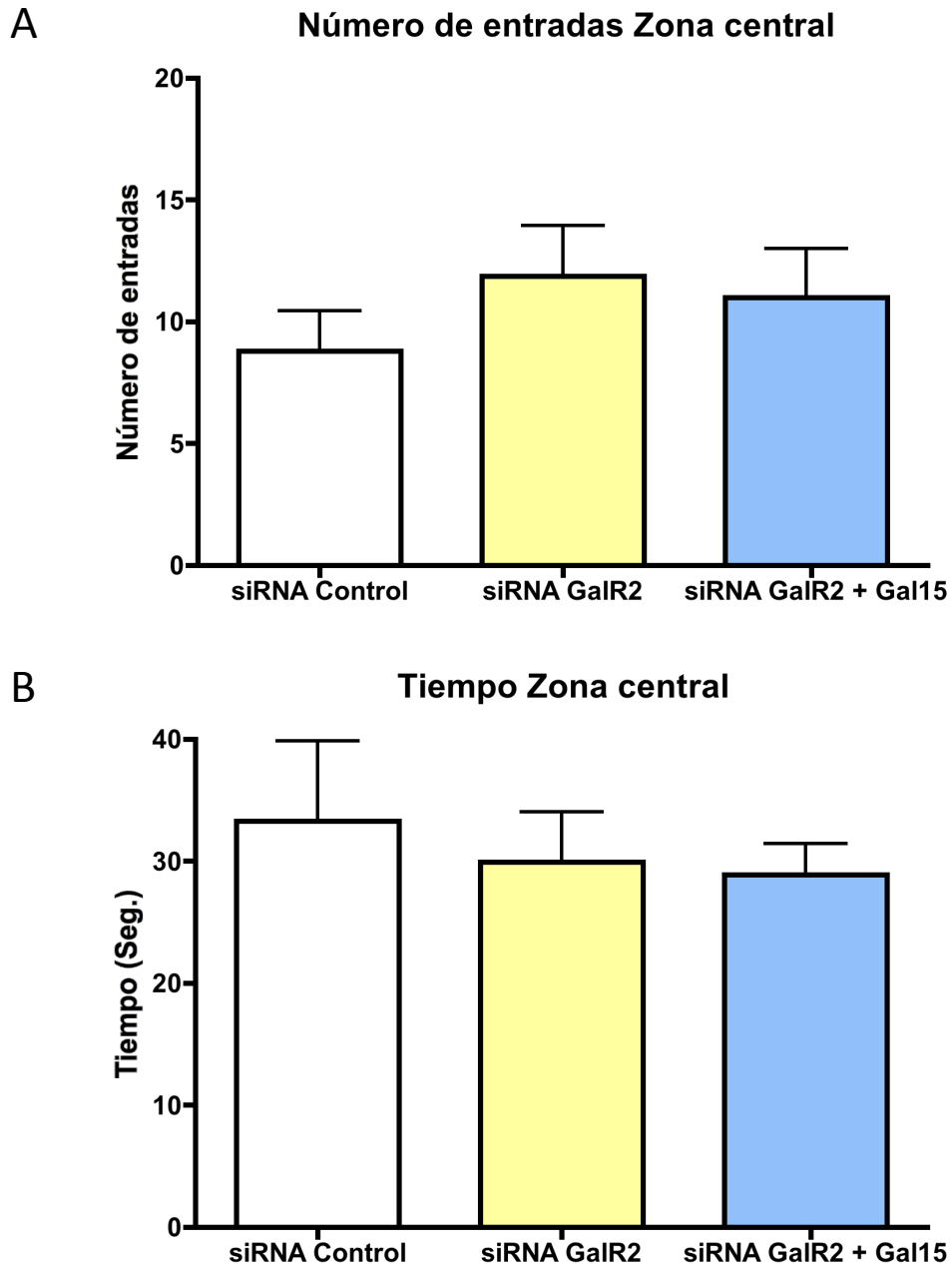


Figura 29. Representación gráfica del número de entradas en la zona central (A) y del tiempo de permanencia en la zona central (B) del campo abierto tras la administración de siRNA Control, siRNA GALR2 7 días antes de la prueba (knockdown GALR2) y la Administración de GAL(1-15) 3nmol 15 minutos antes de la prueba en animales Knockdown GALR2. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. N= 5-8 ratas por grupo.

4.5 Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en tejido de rata Knockdown GALR2.

La posible formación de complejos GALR1-GALR2 se estudia mediante la técnica de ligazón por proximidad (PLA) en secciones de animales Knockdown GALR2.

Tras la cuantificación de los complejos GALR1-GALR2 formados en las distintas zonas del Hipocampo dorsal (Figura 29), observamos que en CA1 se produce una reducción significativa ($p < 0.01$) del número de complejos GALR1-GALR2 por célula respecto a los vehículos (inyectados con Delivery Media), siendo esta reducción del 40% (Figura 29 A). También se observa una reducción significativa ($p < 0.05$) en el número de complejos formados en las zonas de CA2 y Giro Dentado (GD), no observándose esta reducción en CA3 (Figuras 29 B,C y D). En la Figura 30 se muestran algunas fotografías representativas.

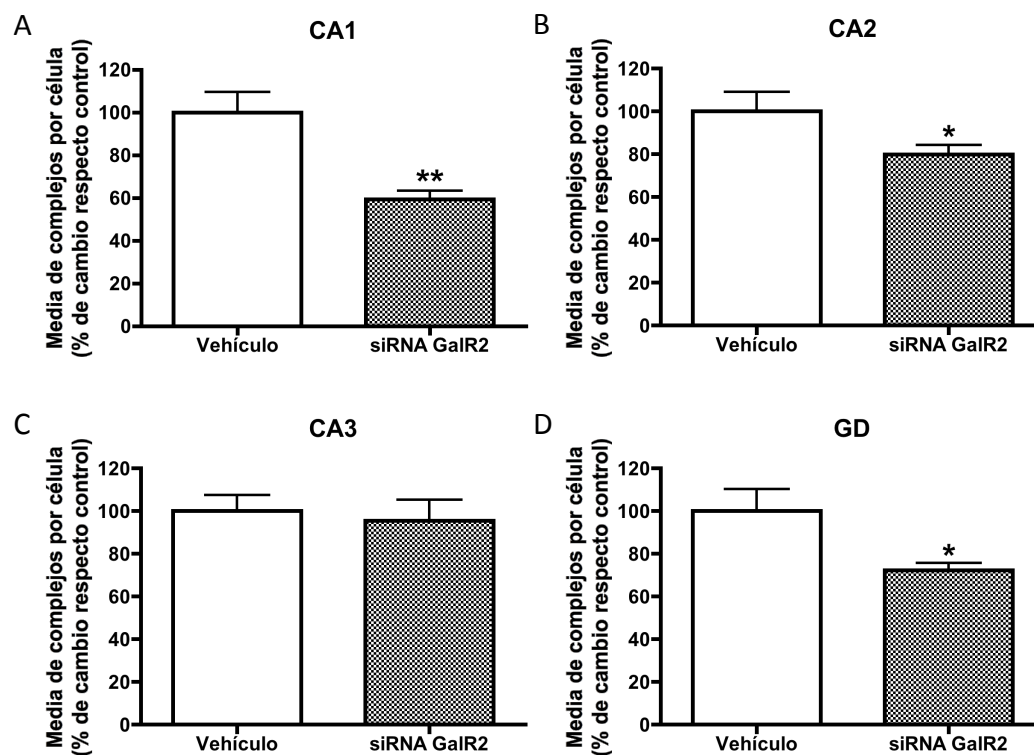


Figura 30. Representación gráfica de la cuantificación de complejos GALR1-GALR2 en la técnica de ligazón por proximidad en animales Knockdown GALR2 (siRNA GALR2) y Vehículos. Se analizan distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1 (A), CA2 (B), CA3 (C) y GD (D)). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media respecto control. La cuantificación fue realizada sobre 10-20 células por fotografía, y se realizaron 8 fotografías por zona. Se analizaron entre 80 y 160 células por zona. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ versus Vehículo según test de T-Student.

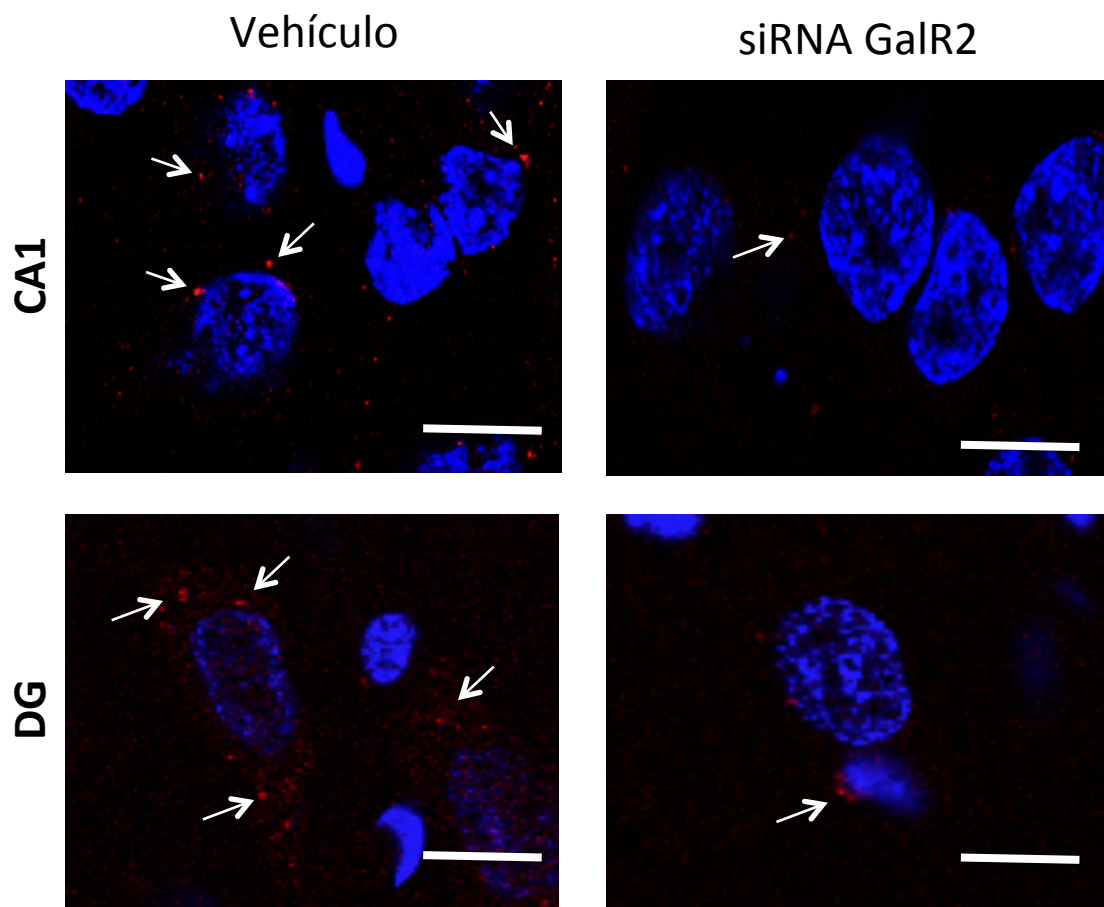


Fig.X. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la técnica del PLA de los receptores GALR1 y GALR2 en animales Knockdown GALR2 (siRNA GALR2) y animales Vehículo. Se observa la reducción de complejos GALR1-GALR2 (puntos rojos), en los animales Knockdown GALR2 con respecto a animales Vehículo, en las zonas del Hipocampo dorsal CA1 y Giro Dentado (GD). Barra de escala 10 μ m.

Con respecto a la cuantificación de complejos GALR1-GALR2 en animales Knockdown GALR2 en el núcleo del Rafe dorsal (RD)(Figura 31), se observa una reducción significativa ($p < 0.001$) en el número de complejos formados llegando esta reducción al 60% con respecto al grupo de vehículos.

Todos estos resultados confirman que en animales en los que existen una disminución del número de receptores GALR2, también existen una disminución de los complejos GALR1-GALR2.

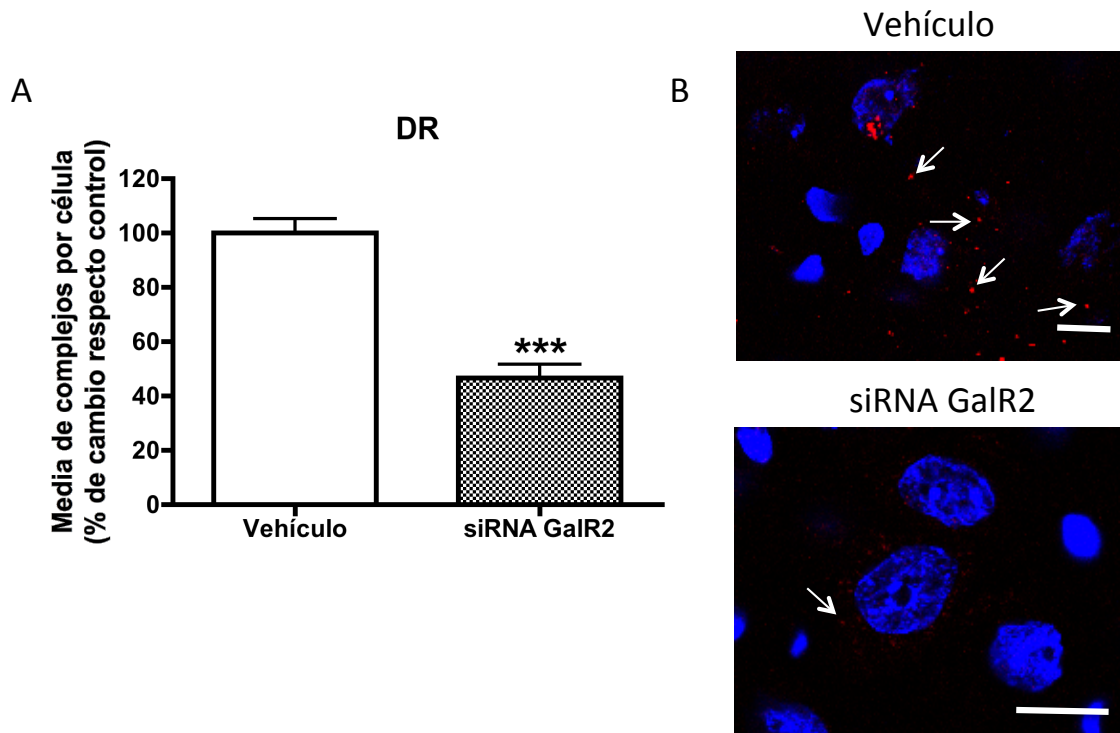


Figura 31. (A) Representación gráfica de la cuantificación de complejos GALR1-GALR2 en la técnica de PLA en animales Knockdown GALR2 (siRNA GALR2) y Vehículos en el Rafe dorsal (RD). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media respecto control. La cuantificación fue realizada sobre 10-20 células por fotografía, y se realizaron 8 fotografías por zona. Se analizaron entre 80 y 160 células por zona. *** $p < 0.001$ versus Vehículo según test de T-Student. (B) Fotografías representativas de la reducción de complejos GALR1-GALR2 (puntos rojos) en los animales Knockdown GALR2 con respecto a animales Vehículo, en el núcleo del Rafe dorsal (RD). Barra de escala 10 μ m.

Resultados de GAL(1-15) en cultivos celulares

Células HEK-293

1. Trafico vesicular de GALR1-YFP en células HEK-293 tras la incubación con GAL o GAL(1-15).

1.1 Internalización de GALR1-YFP en células HEK-293 que expresan GALR1-YFP o GALR1-YFP y GALR2 tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Se estudia la tasa de internalización del receptor GALR1 clonado con la Proteína Amarilla Fluorescente (YFP) en células HEK-293 transfectadas solo con el receptor GALR1-YFP o cotransfectadas con los receptores GALR1-YFP y GALR2, tras la estimulación con GAL o GAL(1-15) a una concentración de 500nM.

Como se observa en la Figura 32 A, en **células HEK** que expresan únicamente el receptor **GALR1-YFP**, tras la estimulación con GAL se produce un aumento en la internalización del receptor, llegando a su máximo a los 30 minutos, tras el cual disminuye progresivamente hasta niveles basales a los 120 minutos.

Sin embargo, en estas mismas células tras la estimulación con GAL(1-15), se produce un aumento en la internalización del receptor, siendo el punto máximo a los 60 minutos. Este punto de máxima internalización se mantuvo hasta los 120 minutos. En la Figura 32 B se muestran algunas fotografías representativas de este proceso.

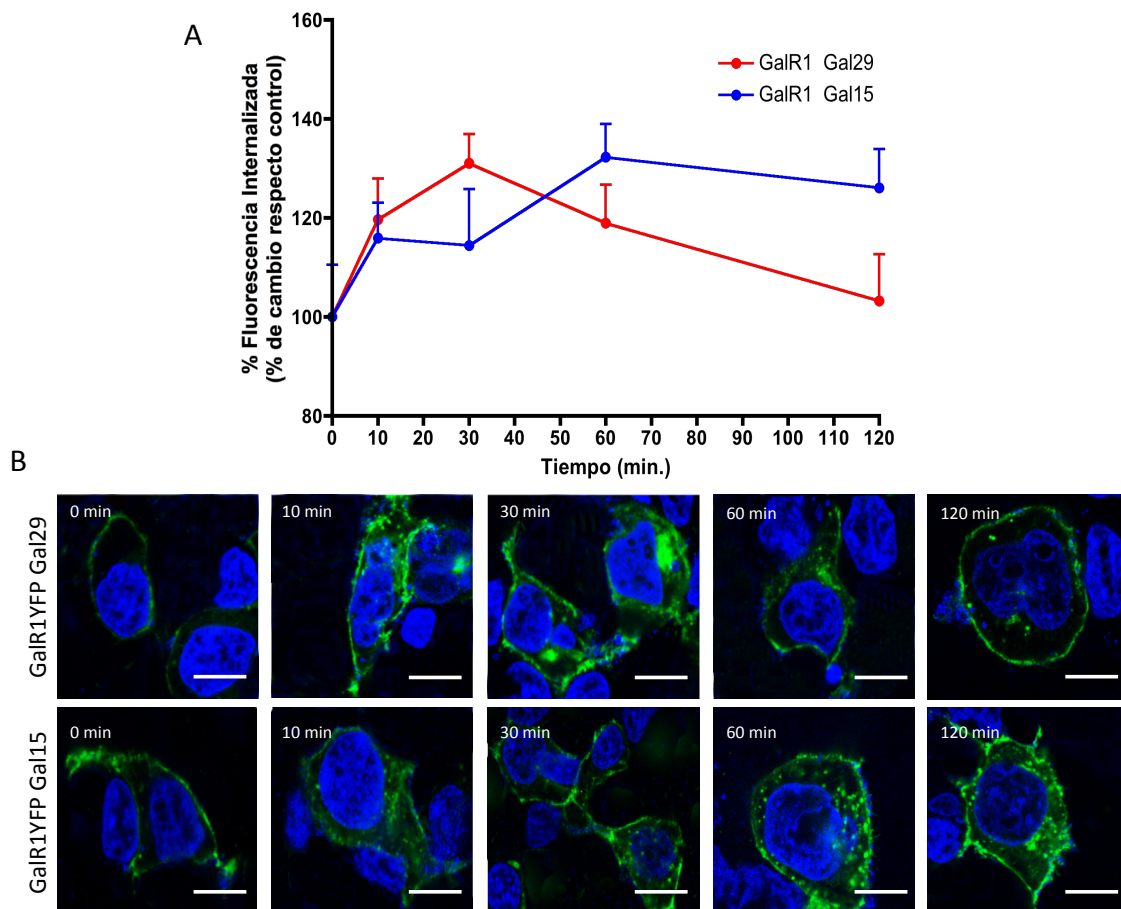


Figura 32. (A) Representación gráfica de la tasa de internalización (% de fluorescencia internalizada en el tiempo) en células que expresan el receptor GALR1 clonado con la proteína YFP (GALR1-YFP) tras la estimulación con GAL y GAL(1-15) a distintos tiempos. (B) Fotografías representativas de la internalización del receptor GALR1-YFP tras la estimulación con GAL y GAL(1-15) a distintos tiempo. Barra de escala 10 μ m.

En **células HEK cotransfectadas** con los receptores **GALR1-YFP y GALR2**, se puede observar que tras la incubación con GAL, el porcentaje de fluorescencia internalizada procedente del receptor GALR1-YFP, no sufre un gran aumento, observándose el receptor en la membrana plasmática, permaneciendo prácticamente constante a lo largo de todo el tiempo.

Por el contrario, la estimulación con GAL(1-15) induce un notable aumento en la internalización del receptor, llegando a un máximo a los 30 minutos, y permaneciendo constante hasta los 120 minutos (Figura 33). Por tanto, la internalización del receptor GALR1-YFP inducida por la estimulación de GAL(1-15) fue visiblemente superior a la producida tras la incubación con GAL (Figura 34).

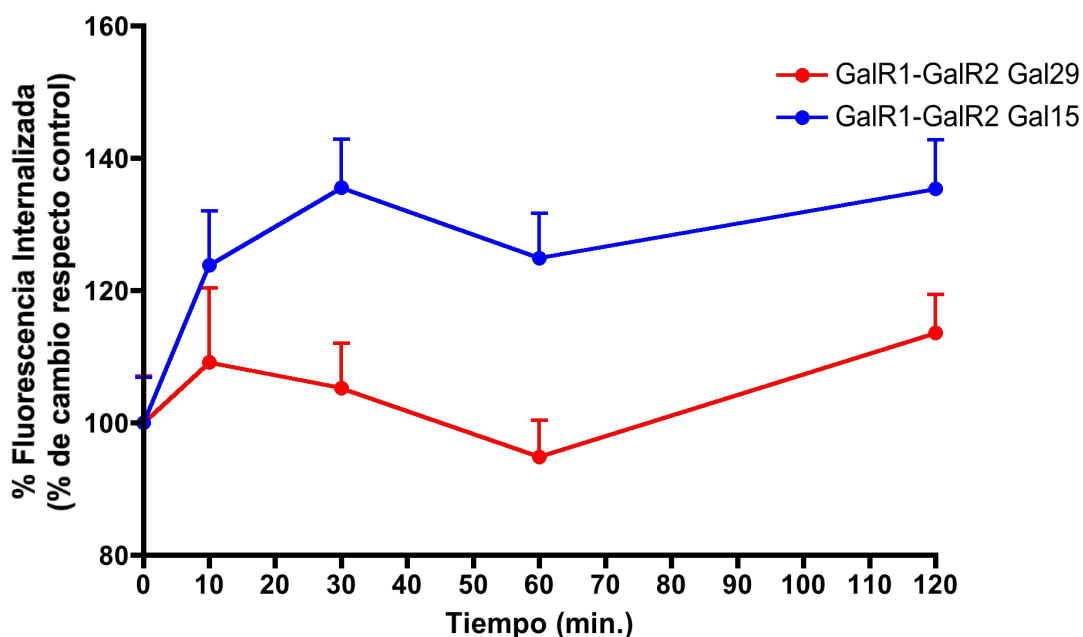


Figura 33. (A) Representación gráfica de la tasa de internalización (% de fluorescencia internalizada en el tiempo) en células que coexpresan el receptor GALR1 clonado con la proteína YFP (GALR1-YFP) y el receptor GALR2 tras la estimulación con GAL y GAL(1-15) a distintos tiempos.

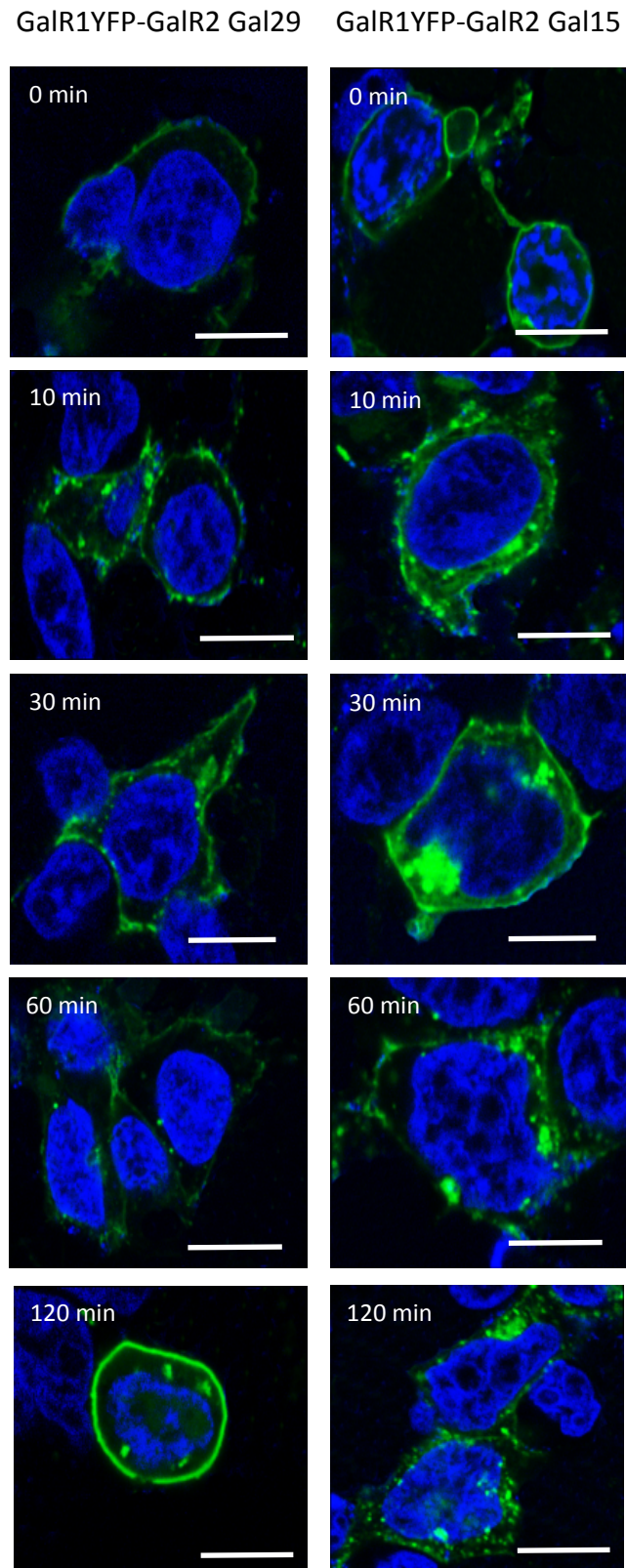


Figura 34. Fotografías representativas de la internalización del receptor GALR1-YFP tras la estimulación con GAL o GAL(1-15) a distintos tiempo. Barra de escala 10 μ m.

1.2 Formación de endosomas tempranos (Rab5-RFP) en células HEK-293 que expresan los receptores GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Para cuantificar el número de endosomas tempranos, se detectó la proteína Rab5 clonada con la proteína roja fluorescente (RFP). Los estudios se realizaron en células HEK transfectadas con el receptor GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

En células que expresan únicamente el **receptor GALR1-YFP**, se observa que la formación de endosomas tempranos, tras incubación con GAL, se mantiene prácticamente en niveles basales durante todo el periodo de tiempo, a excepción de una pequeña subida a los diez minutos tras la estimulación.

Sin embargo, tras la estimulación con GAL(1-15), se produce un aumento en los niveles a los 60 minutos, volviendo a los niveles basales a los 120 minutos (Figura 35 A).

El número de endosomas tempranos formados, en células que expresan únicamente el **receptor GALR2**, sigue un patrón muy parecido tanto tras la estimulación con GAL como con GAL(1-15), produciéndose un aumento de endosomas a los 10 minutos que vuelve a niveles basales progresivamente hasta alcanzarlos en el minuto 120 (Figura 35 B).

En células que **coexpresan** ambos receptores, **GALR1-YFP y GALR2**, la incubación con GAL no produjo ningún efecto en la formación de endosomas tempranos, siendo el número de estos similar al número basal a lo largo de todo el periodo de tiempo.

Por el contrario, la incubación con GAL(1-15) produjo un gran aumento en el número de endosomas tempranos siendo de hasta el 100% a los 60 minutos de la estimulación (Figura 35 C). Por tanto, la coexpresión induce un visible aumento en la formación de endosomas tempranos tras la estimulación GAL(1-15) mientras que la GAL no produce ningún cambio en el número de estos (Figura 35 D).

Por lo tanto, observamos que cuando la célula expresa solo uno de los receptores independientemente, se produce la formación de endosomas tempranos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15). Sin embargo, cuando la célula coexpresa ambos receptores, GALR1 y GALR2, solo se produce la formación de endosomas tempranos tras la estimulación con GAL(1-15) y no con la molécula completa GAL.

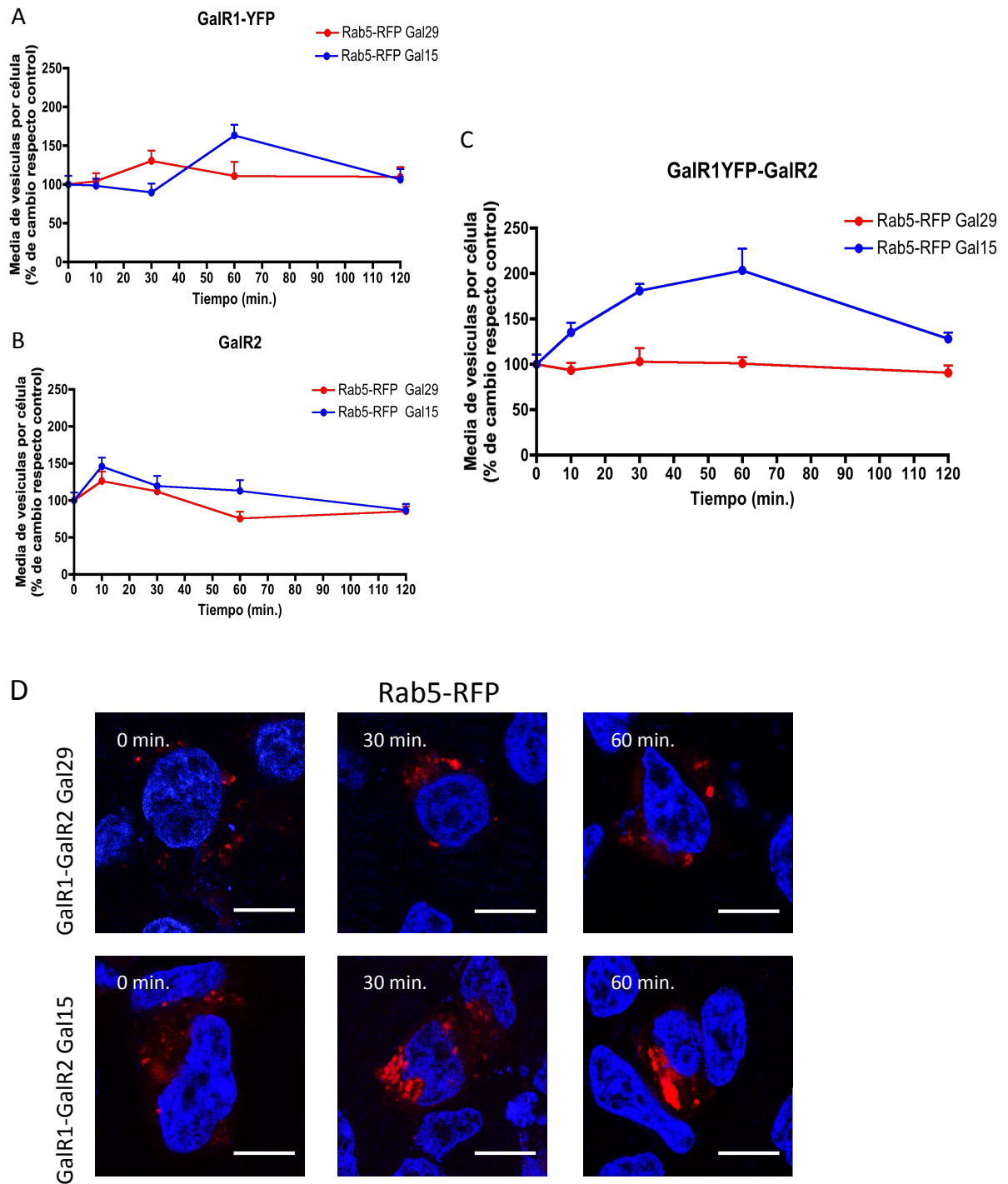


Figura 35. Representación gráfica del número de endosomas tempranos por célula (vesículas Rab5-RFP) tras la estimulación con GAL y GAL(1-15), en células que expresan el receptor GALR1-YFP (A), el receptor GALR2 (B) o coexpresan ambos, GALR1-YFP y GALR2 (C) a distintos tiempos. (B) Fotografías representativas del número de endosomas tempranos en células transfectadas con los receptores GALR1-YFP y GALR2 tras la estimulación con GAL y GAL(1-15) a distintos tiempo. Barra de escala 10 μ m.

1.3 Formación de lisosomas (LAMP1-RFP) en células HEK-293 que expresan los receptores GALR1-YFP, GALR2 o ambos tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

Cuantificamos la proteína LAMP1, proteína presente en la membrana de los lisosomas, clonada con la proteína roja fluorescente (RFP), detectando el número de lisosomas tanto en células HEK que han sido transfectadas con el receptor GALR1-YFP, el receptor GALR2 o los receptores GALR1-YFP y GALR2, tras la incubación con GAL o GAL(1-15).

La incubación con GAL aumenta considerablemente respecto al nivel basal el número de lisosomas detectados en las células que expresan sólo el **receptor GALR1**, llegando a el punto máximo a los 30 minutos y disminuyendo lenta y progresivamente a partir de este punto.

Sin embargo, tras la estimulación con GAL(1-15), se produce un aumento en el número de lisosomas a los 10 minutos de tratamiento, permaneciendo prácticamente constante en ese nivel a lo largo de todo el periodo registrado y siendo menor que el alcanzado tras la incubación con GAL. Existiendo, por tanto, un patrón diferencial entre ambos tratamientos, siendo mayor el número de lisosomas detectados a lo largo de todo el periodo tras el tratamiento con GAL que con GAL(1-15) (Figura 36 A).

En células que expresan únicamente el **receptor GALR2**, se observa, que tras la estimulación con GAL, existe un aumento en el número de lisosomas a los 10 minutos, tras el cual el nivel de estos se restablece a niveles basales hasta los 120 minutos registrados.

Sin embargo, el número de lisosomas tras el tratamiento con GAL(1-15) aumenta progresivamente, hasta alcanzar un punto máximo a los 30 minutos, nivel que se mantiene durante el resto del periodo de tiempo.

Por tanto, el patrón producido por el tratamiento con GAL es distinto al producido con la GAL(1-15), produciendo la GAL(1-15) un mayor número de lisosomas durante el tiempo estudiado (Figura 36 B).

En las células que **coexpresan** los receptores **GALR1-YFP y GALR2**, se observa que el patrón producido en el número de lisosomas es muy similar, tanto tras la incubación con GAL como con GAL(1-15), produciéndose un aumento en el número tras 10 minutos de incubación y permaneciendo constante en este nivel durante el resto del periodo medido, aunque en el caso de estimulación con GAL(1-15) a los 120 minutos se observa otro aumento en el número de lisosomas, llegando a duplicar en este punto el nivel basal (Figura 36 C). Se observa, por tanto un patrón diferente en el número de lisosomas que el que se presenta en células que expresan ambos receptores de forma aislada. En la Figura 36 D se muestran fotografías representativas del número de lisosomas a distintos tiempo tras los tratamientos con GAL y GAL(1-15).

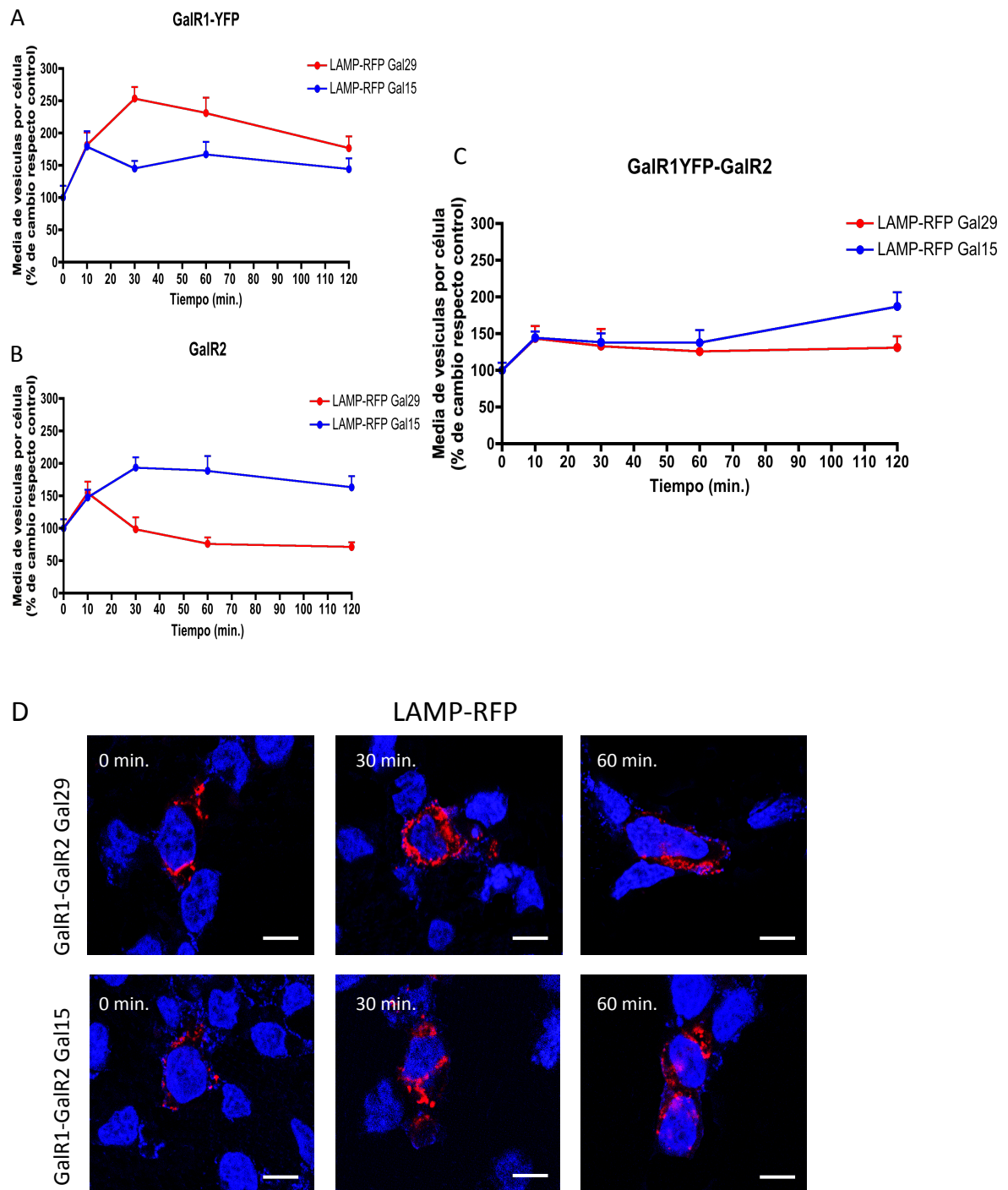


Figura 36. Representación gráfica del número de lisosomas por célula (vesículas LAMP1-RFP) tras la estimulación con GAL y GAL(1-15), en células que expresan el receptor GALR1-YFP (A), el receptor GALR2 (B) o coexpresan ambos, GALR1-YFP y GALR2 (C) a distintos tiempos. (B) Fotografías representativas del número de lisosomas en células transfectadas con los receptores GALR1-YFP y GALR2 tras la estimulación con GAL y GAL(1-15) a distintos tiempo. Barra de escala 10 μ m.

Células derivadas del núcleo del Rafe: RN33B

2. Expresión de GALR1 y GALR2 en células en cultivo derivadas del núcleo del Rafe RN33B.

En células en cultivo derivadas del núcleo del Rafe RN33B se realiza la técnica de inmunofluorescencia contra los receptores GALR1 y GALR2, para demostrar la expresión de estos receptores en este tipo celular.

Como muestra la Figura 37, en las células RN33B se obtiene señal positiva para el receptor GALR1 (Figura 37 A) y para el receptor GALR2 (Figura 37 B), indicando que este tipo celular, derivado del núcleo de Rafe, expresa de forma endógena los receptores estudiados.

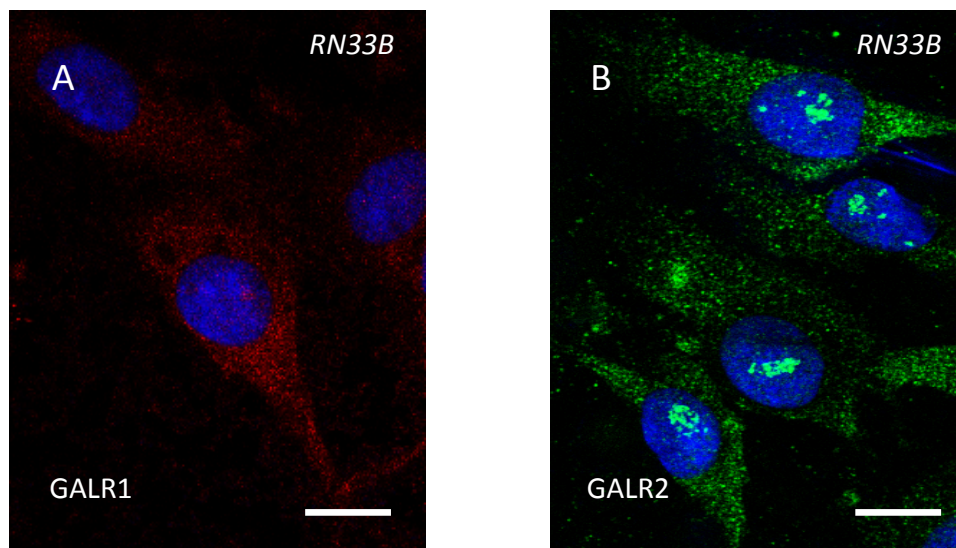


Figura 37. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la detección del receptor GALR1 (rojo) (A) y GALR2 (verde) (B) mediante inmunofluorescencia, en células derivadas del núcleo de Rafe RN33B. Se muestra, marcaje positivo de ambos receptores en células RN33B. Barra de escala 10 μ m.

3. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/GALR2 en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B.

Se comprueba, mediante la técnica de ligazón por proximidad (PLA), si los receptores GALR1 y GALR2 se encuentran en estrecha proximidad (entre 10 y 20 nm) en las células RN33B, indicando esto la posible formación de complejos heterodímeros entre ambos receptores (Puntos rojos). Los núcleos celulares se tiñen con DAPI, lo que les confiere un color azul, y permite distinguir las células y determinar la presencia del complejo GALR1-GALR2 en el citoplasma.

Al analizar la señal producida mediante la técnica del PLA en las células RN33B (Figura 38), observamos que existe proximidad de los receptores GALR1 y GALR2 en el citoplasma (se ve como puntos rojos), correspondiente con el complejo GALR1-GALR2. Indicando esto, no solamente que las células derivadas del núcleo del Rafe RN33B expresan de forma endógena los receptores GALR1 y GALR2, como veíamos en el apartado anterior, sino que estos receptores se encuentran en estrecha proximidad posibilitando la formación de un complejo GALR1-GALR2.

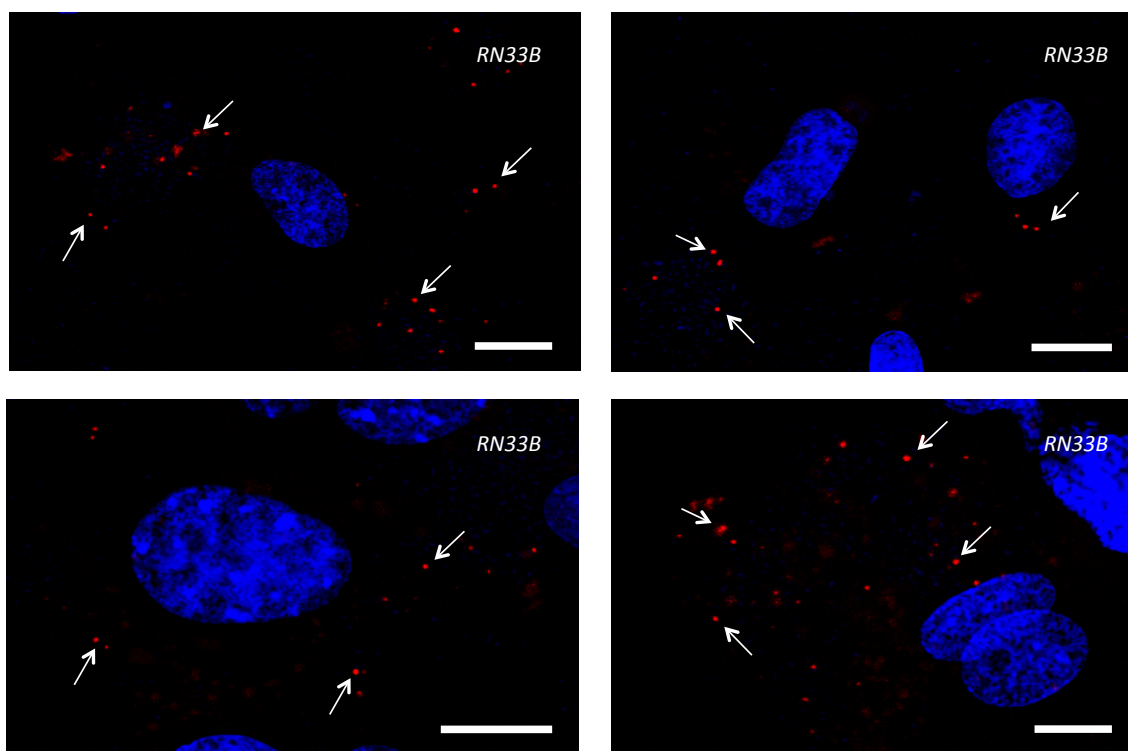


Figura 38. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la técnica de ligazón por proximidad de los receptores GALR1 y GALR2 en células RN33B, donde se observa la estrecha proximidad entre ambos receptores en el citoplasma (puntos rojos). Barra de escala 10 μm .

4. Síntesis y almacenamiento de Serotonina (5HT) en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la estimulación con GAL o GAL(1-15).

El efecto de la incubación de las células con GAL y GAL(1-15) en la tasa de síntesis y almacenamiento de serotonina (5HT) se analiza mediante la cuantificación de la inmunofluorescencia de 5HT.

Como se muestra en la gráfica de la Figura 39 A, la disminución en la inmunorreactividad de 5HT provocada por la incubación con el fragmento GAL(1-15) ($p < 0.001$) fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que la disminución inducida por la molécula completa GAL ($p < 0.001$). Por tanto, se observa que el tratamiento de las células con el fragmento GAL(1-15) produce un descenso en la síntesis y almacenamiento de 5HT mayor que el producido por la incubación con la molécula completa GAL (Figura 39 B).

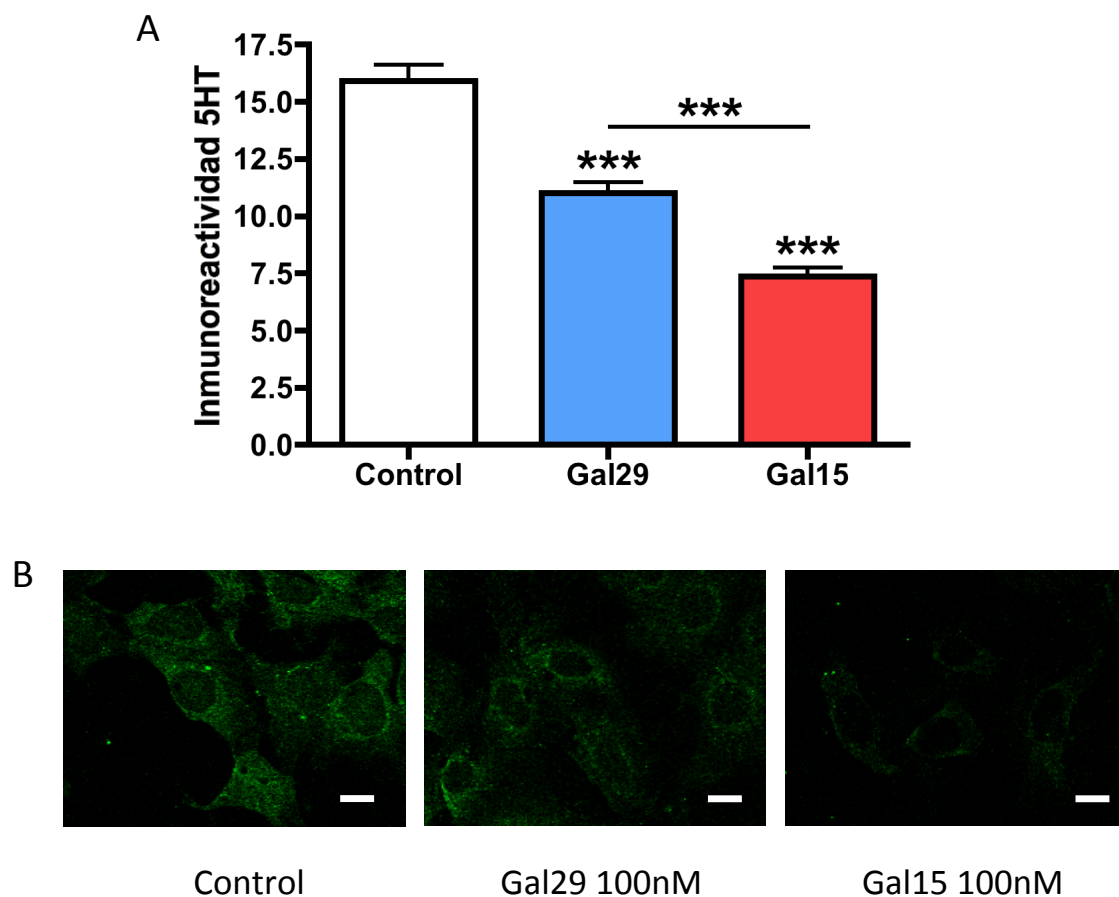


Figura 39. (A) Representación gráfica de la inmunorreactividad de 5HT (Unidades Arbitrarias), como indicador de la síntesis y almacenamiento de 5HT en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la incubación de GAL y GAL(1-15). El mantenimiento de las células en medio de cultivo fue utilizado como Control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. *** $p < 0.001$ según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. (B) Fotografías representativas de la disminución de la inmunorreactividad de 5HT producida por la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15). Barra de escala 10 μ m.

5. Expresión de la proteína C-Fos en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

5.1 Cuantificación de la proteína C-Fos por inmunofluorescencia.

Para medir la actividad celular en células RN33B tras la estimulación con GAL y GAL(1-15), se cuantifica la fluorescencia obtenida contra la proteína nuclear C-Fos.

La disminución observada en la inmunoreactividad de C-Fos, tras la estimulación del fragmento GAL(1-15) ($p < 0.001$) fue significativamente mayor ($p < 0.01$) al descenso de la inmunoreactividad producido por la molécula completa GAL ($p < 0.001$). Por tanto, GAL(1-15) produce una disminución más importante de la expresión de la proteína nuclear C-Fos y por tanto una mayor disminución en la actividad celular que la producida por la incubación con GAL (Figura 40).

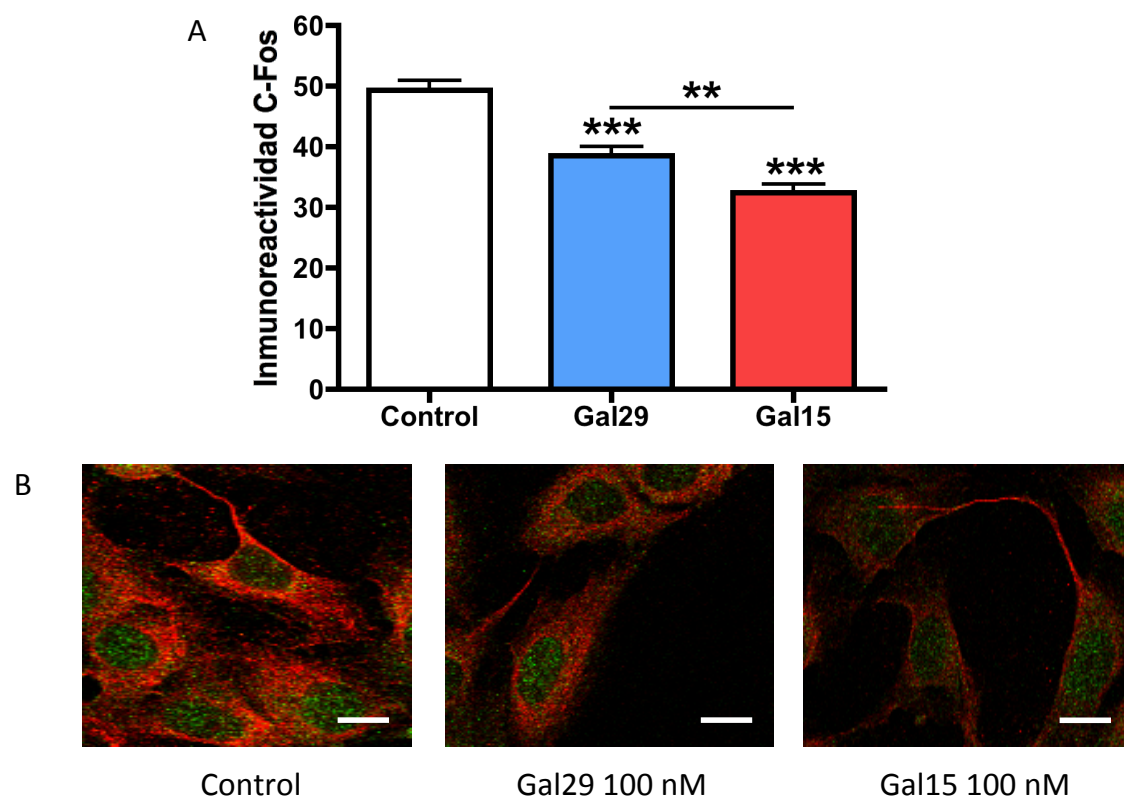


Figura 40. (A) Representación gráfica de la inmunoreactividad de la proteína C-Fos (Unidades Arbitrarias), como indicador de la actividad celular en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la incubación de GAL y GAL(1-15). El mantenimiento de las células en medio de cultivo fue utilizado como Control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. (B) Fotografías representativas de la disminución de la inmunoreactividad de C-Fos en el núcleo de células RN33B, producida por la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15). El citoplasma celular presenta inmunotinción contra el receptor 5HT1A como se detallará en próximos apartados de esta tesis. Barra de escala 10 μ m.

5.2 Cuantificación de la proteína C-Fos por *In cell western*.

Como indicador de la actividad celular de las células RN33B después del tratamiento con GAL 100nM y GAL(1-15) 100 nM, se cuantifica la expresión de la proteína C-Fos, mediante la técnica de *In cell western*.

Como se observa en la Figura 41A, hay una tendencia a la reducción de la inmunorreactividad de C-Fos que no llega a ser significativa, tras la incubación con GAL. Sin embargo, tras la estimulación por GAL(1-15) si existe una reducción significativa ($p < 0.05$) respecto del grupo control de la inmunorreactividad de C-Fos. En la Figura 41B, se muestra una imagen representativa de la disminución de la inmunorreactividad de C-Fos tras la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15).

Por tanto, estos resultados junto con los del apartado anterior confirman que la GAL(1-15) produce una reducción la expresión de la proteína C-Fos en este tipo celular.

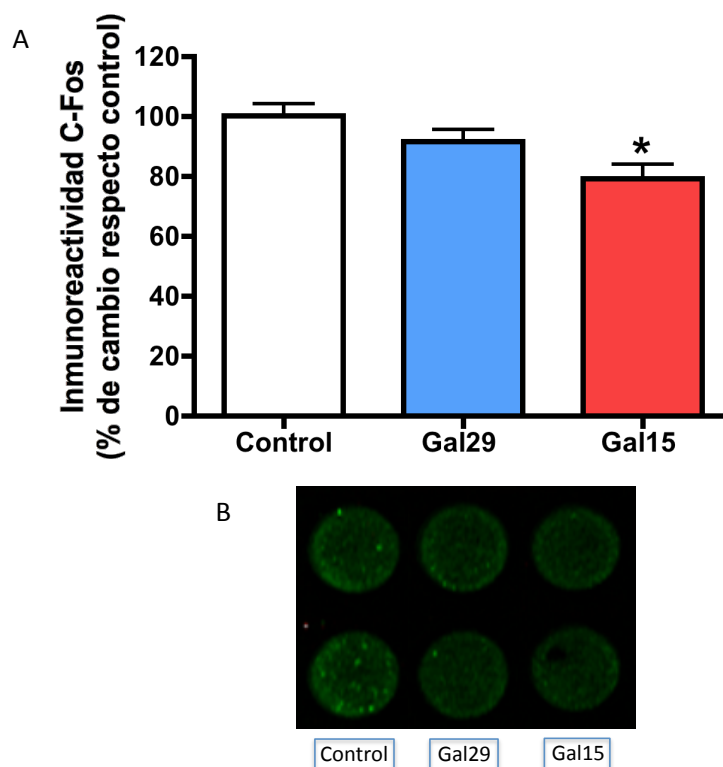


Figura 41. (A) Representación grafica de la inmunorreactividad de la proteína C-Fos (Unidades Arbitrarias), medida mediante *In cell western*, como indicador de la actividad celular en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la incubación de GAL y GAL(1-15). El mantenimiento de las células en medio de cultivo fue utilizado como Control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. * $p < 0.05$ según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de post-test de Dunn's. (B) Fotografías representativas de la disminución de la inmunorreactividad de C-Fos en células RN33B, producida por la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15).

**RESULTADOS DE LA INTERACCIÓN
GAL(1-15)/5HT1A**

1. Estudios de comportamiento animal.

Interacción GAL(1-15)/5HT1A

1.1 Estudios de comportamiento animal: *Inyección de 8-OH-DPAT (sc. 20 min.) y GAL(1-15) (icv. 15 min.) antes de las pruebas de comportamiento.*

1.1.1 Efecto del 8-OH-DPAT en pruebas de ansiedad y depresión animal.

1.1.1.1 Test de la natación forzada.

La curva dosis-respuesta realizada mediante la inyección vía subcutánea de 8-OH-DPAT, 20 minutos antes de la prueba, a las dosis de 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/kg muestra que, con respecto al tiempo de inmovilidad, la dosis de 0.25 mg/kg disminuye significativamente ($p < 0.01$) este parámetro con respecto al grupo control, mientras que las dosis de 0.125 y 0.0625 mg/kg no afectan significativamente a la inmovilidad (Figura 42). Con respecto al tiempo de escalda, las tres dosis ensayadas disminuyen el tiempo de escalada con respecto al grupo control, siendo la de 0.25 mg/kg la que disminuye este parámetro en mayor medida ($p < 0.01$). En el tiempo de natación, las dosis de 0.25 y 0.125 mg/kg aumentan significativamente ($p < 0.01$) el tiempo que los animales estuvieron nadando comparado con los controles, mientras que la dosis de 0.0625 mg/kg no produce diferencias significativas en este parámetro. Estos resultados indican que la dosis de 0.25 mg/kg se utiliza como dosis efectiva, mientras que la de 0.0625 mg/kg será dosis subumbral.

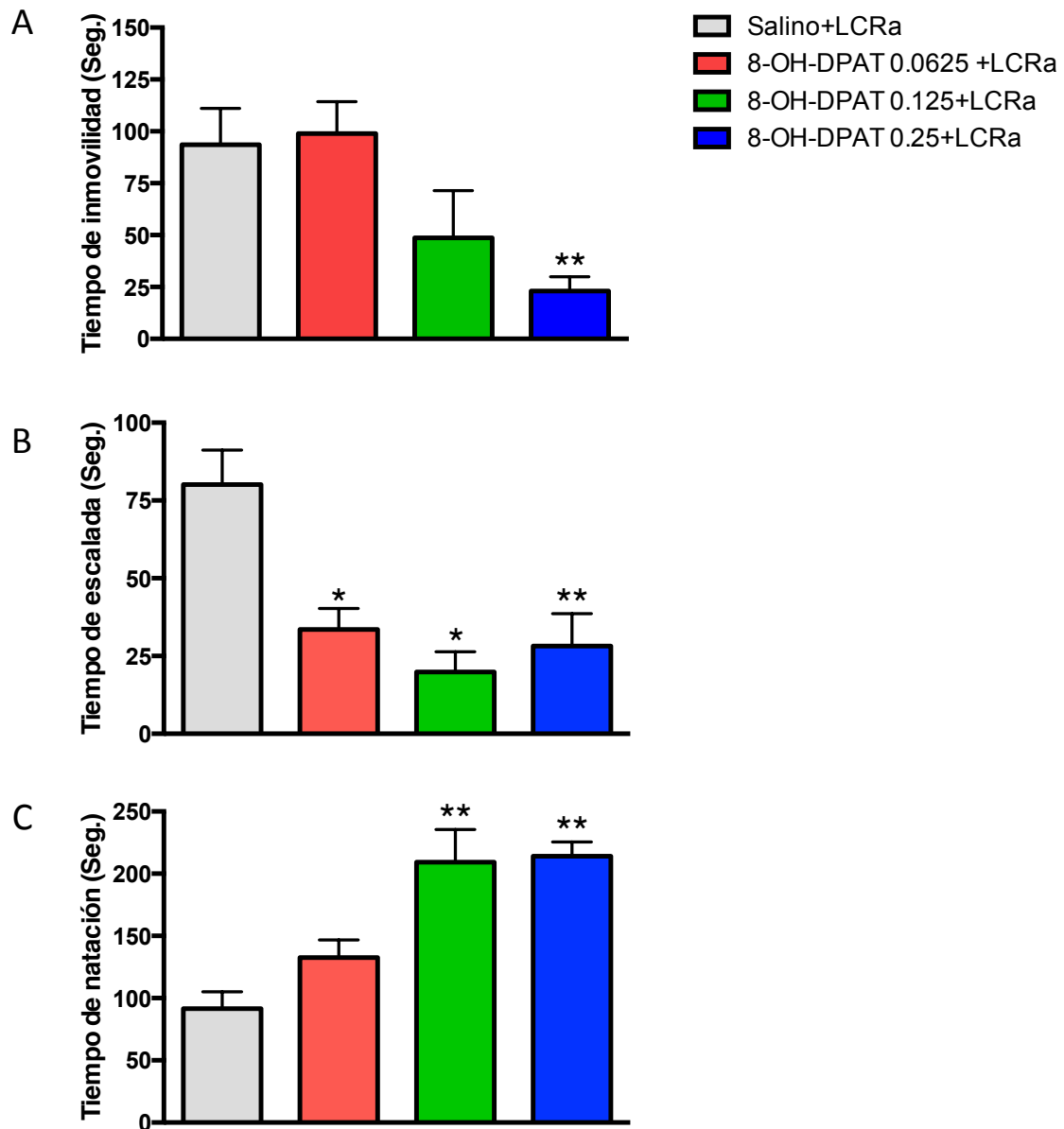


Figura 42. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración vía subcutánea de 8-OH-DPAT a diferentes dosis 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/kg 20 minutos antes del test y LCRa vía icv 15 minutos antes de la prueba. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett.

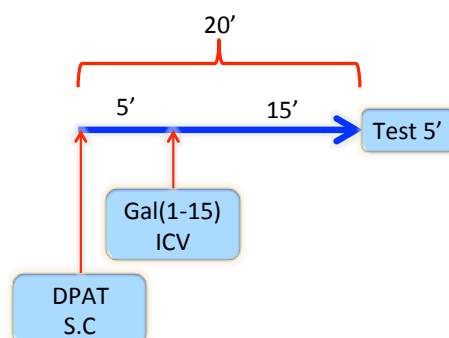
1.1.1.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora.

Para analizar si los animales administrados subcutáneamente con 8-OH-DPAT a las dosis de 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/kg presentan alteración locomotora, se miden en la prueba del campo abierto los parámetros de distancia total recorrida y velocidad media. Como se muestra en la Tabla 7. todas las dosis de 8-OH-DPAT ensayadas disminuyen significativamente tanto la distancia recorrida como la velocidad media comparado con el grupo control, siendo la dosis de 0.25 mg/kg la que produce un mayor descenso de estos parámetros ($p < 0.01$). Por tanto, los animales inyectados 20 minutos antes de realizar la prueba con 8-OH-DPAT 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/kg presentan una alteración locomotora, con una menor actividad comparada con los animales control.

Parámetros Locomotores	Salino+LCRa	8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg +LCRa	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg +LCRa	8-OH-DPAT 0,0625 mg/Kg +LCRa
Distancia Total (cm)	3546 ±125,9	2204 ±161,4**	2366 ±190,1*	2388 ±336,5**
Velocidad Media (cm/Seg)	11,7 ±0,4	7,3 ± 0,5**	7,9 ±0,6*	8 ±1,1**

Tabla 7. Parámetros de la actividad locomotora en el campo abierto de los animales inyectados con las dosis 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/Kg 8-OH-DPAT vía S.C y LCRa icv 20 y 15 minutos respectivamente, antes de la prueba. Los resultados se muestran como la media ± error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett.

1.1.2 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en pruebas de comportamiento animal.



1.1.2.1 Test de la natación forzada.

Se observa que la coadministración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.0625 mg/Kg, s.c) y GAL(1-15) (1 nmol, icv) 20 y 15 minutos, respectivamente, antes de la prueba, induce en los animales una tendencia a la reducción en el tiempo de inmovilidad respecto a los animales inyectados con la dosis no efectiva de 8-OH-DPAT de forma aislada (Figura 43A). De igual forma, la coadministración de dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT produce una tendencia a la reducción del tiempo de escalada respecto al grupo inyectado con 8-OH-DPAT (Figura 43B). Sin embargo, la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT induce un aumento significativo ($p < 0.05$) del tiempo de natación respecto a los animales inyectados con la dosis no efectiva de 8-OH-DPAT (Figura 43C). Por tanto, podemos observar una tendencia a la potenciación del efecto producido por el 8-OH-DPAT debida a la coadministración con GAL(1-15), potenciación que se hace significativa en el tiempo de natación en la prueba de la natación forzada.

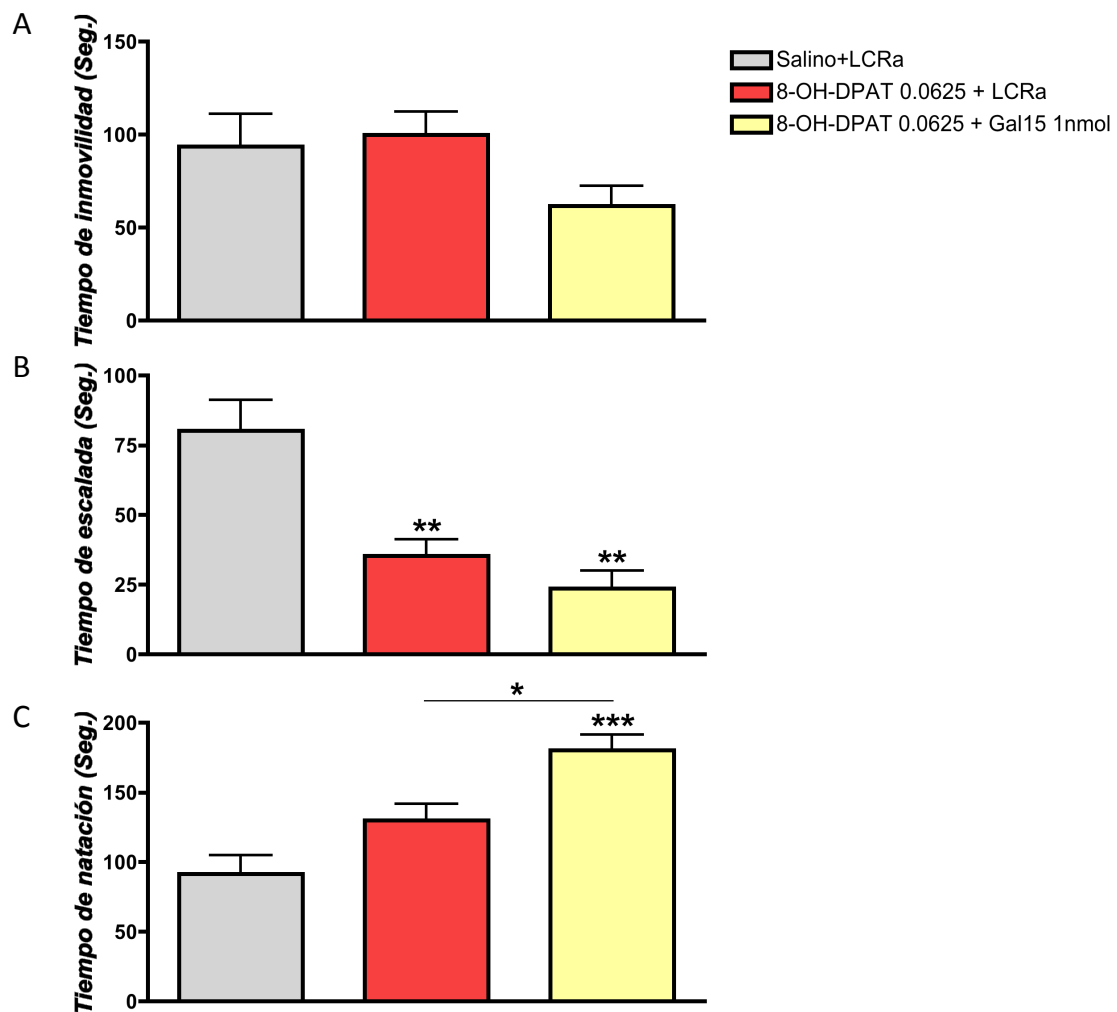


Figura 43. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.0625 mg/kg) y de GAL(1-15) (1 nmol) 20 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino +

LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs 8-OH-DPAT 0.0625 mg/Kg, ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa y *** $p < 0.001$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 6-11 ratas por grupo.

1.1.2.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora.

En la Tabla 8 se muestran los parámetros, distancia total recorrida y velocidad media medidos, en el campo abierto para evaluar la actividad locomotora de los animales, tras la coadministración con dosis no efectivas de 8-OH-DPAT y GAL(1-15). Se observa que los animales coadministrados presentan una disminución significativa en la distancia recorrida ($p < 0.01$) y la velocidad media ($p < 0.01$) respecto al grupo control. Por lo tanto, presentan una disminución en su actividad locomotora, que es mayor a la presentada por los animales administrados únicamente con 8-OH-DPAT.

Parámetros Locomotores	Salino + LCRa	8-OH-DPAT 0,0625 mg/Kg + LCRa	8-OH-DPAT 0,0625 mg/Kg + GAL(1-15) 1nmol
Distancia Total (cm)	3531 \pm 139,2	2590 \pm 329,5*	2080 \pm 276,1**
Velocidad Media (cm/Seg)	11,8 \pm 0,5	8,6 \pm 1,1*	7,2 \pm 31,1**

Tabla 8. Parámetros de la actividad locomotora en el campo abierto tras la administración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.0625 mg/kg) y de GAL(1-15) (1 nmol) 20 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett. N= 5-10 ratas por grupo.

1.1.3 Efecto de la coadministración de la dosis no efectiva de GAL(1-15) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT en pruebas de comportamiento animal.

1.1.3.1 Test de la natación forzada.

En la Figura 44, se muestra que la coadministración de la dosis no efectiva de GAL(1-15) (1 nmol) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT (0.25 mg/kg), produce una tendencia a reducir el tiempo de inmovilidad comparado con el efecto producido por la dosis efectiva de 8-OH-DPAT de forma aislada. En los demás parámetros estudiados en el test de la natación forzada, el tiempo de escalada y el tiempo de natación, la coadministración de ambas sustancias no produce ninguna diferencia con la administración de 8-OH-DPAT administrado individualmente.

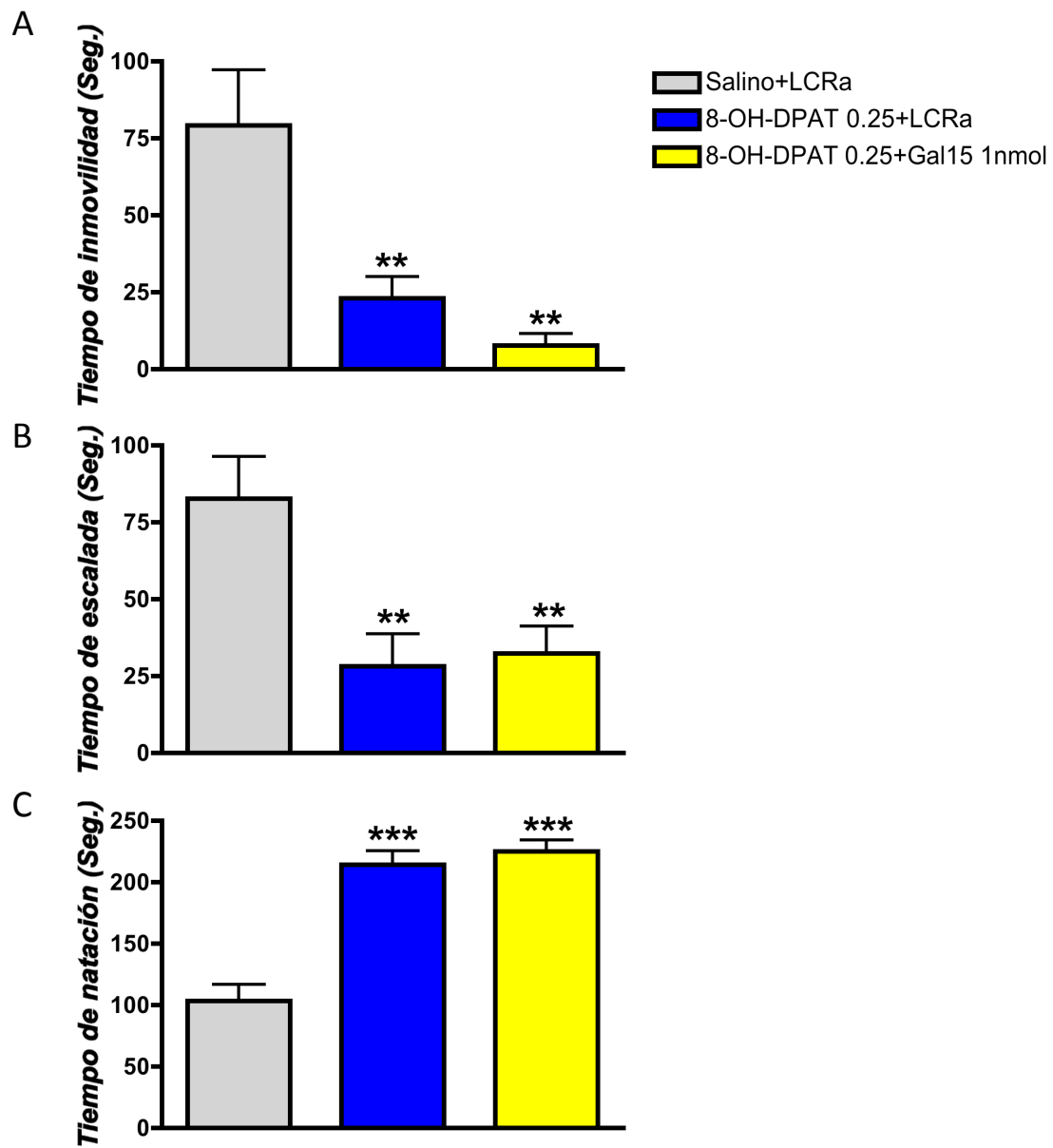


Figura 44. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración de la dosis efectiva de 8-OH-DPAT (0.25 mg/kg) y no efectiva de GAL(1-15) (1 nmol) 20 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 8-9 ratas por grupo.

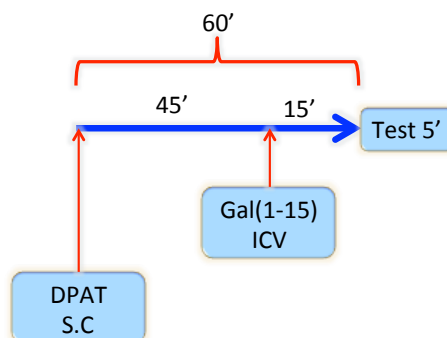
1.1.3.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora.

La coadministración de la dosis efectiva del 8-OH-DPAT y la no efectiva de GAL(1-15) produjo, en los parámetros de distancia total y velocidad media, una disminución significativa ($p < 0.05$) respecto de los animales inyectados con Salino y LCRa (Tabla 9).

Parámetros Locomotores	Salino + LCRa	8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg + LCRa	8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg + GAL(1-15) 1nmol
Distancia Total (cm)	3257 ±255,3	2095 ±181**	2316 ±197,8*
Velocidad Media (cm/Seg)	10,9 ±0,8	6,7 ±0,6**	7,7 ±0.6*

Tabla 9. Parámetros de la actividad locomotora en el campo abierto tras la administración de la dosis efectiva de 8-OH-DPAT (0.25 mg/kg) y no efectiva de GAL(1-15) (1 nmol) 20 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se muestran como la media ± error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett. N= 7-10 ratas por grupo.

1.2. Estudios de comportamiento animal: *Inyección de 8-OH-DPAT (sc. 60 min.) y GAL(1-15) (icv. 15 min.) antes de las pruebas de comportamiento.*



1.2.1 Efecto del 8-OH-DPAT en pruebas de ansiedad y depresión animal.

1.2.1.1 Test de la natación forzada.

En la Figura 45 se muestra la curva dosis-respuesta producida por la administración subcutánea de 8-OH-DPAT a las dosis de 0.125 y 0.25 mg/Kg junto con la administración icv de LCRa, a los 60 y 15 minutos, respectivamente, antes de realizar la prueba de la natación forzada. Con respecto al tiempo de inmovilidad, la dosis de 8-OH-DPAT de 0.25 mg/Kg disminuye significativamente ($p < 0.05$) este parámetro, sin embargo, la dosis de 0.125 mg/Kg no produce ningún cambio significativo respecto al grupo control (Figura 45A). En el tiempo de escalada, 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg, de nuevo, volvió a disminuir significativamente ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, por el contrario la dosis de 0.125 mg/Kg no induce cambio alguno en este parámetro comparado con los controles (Figura 45B). En el tiempo en el que los animales están nadando, 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg, produce un aumento significativo ($p < 0.01$) de este parámetro respecto al grupo control y la dosis de 0.125 mg/Kg se comporta igual que los animales inyectados con Salino y LCRa, no habiendo diferencias significativas entre ambos (Figura 45C).

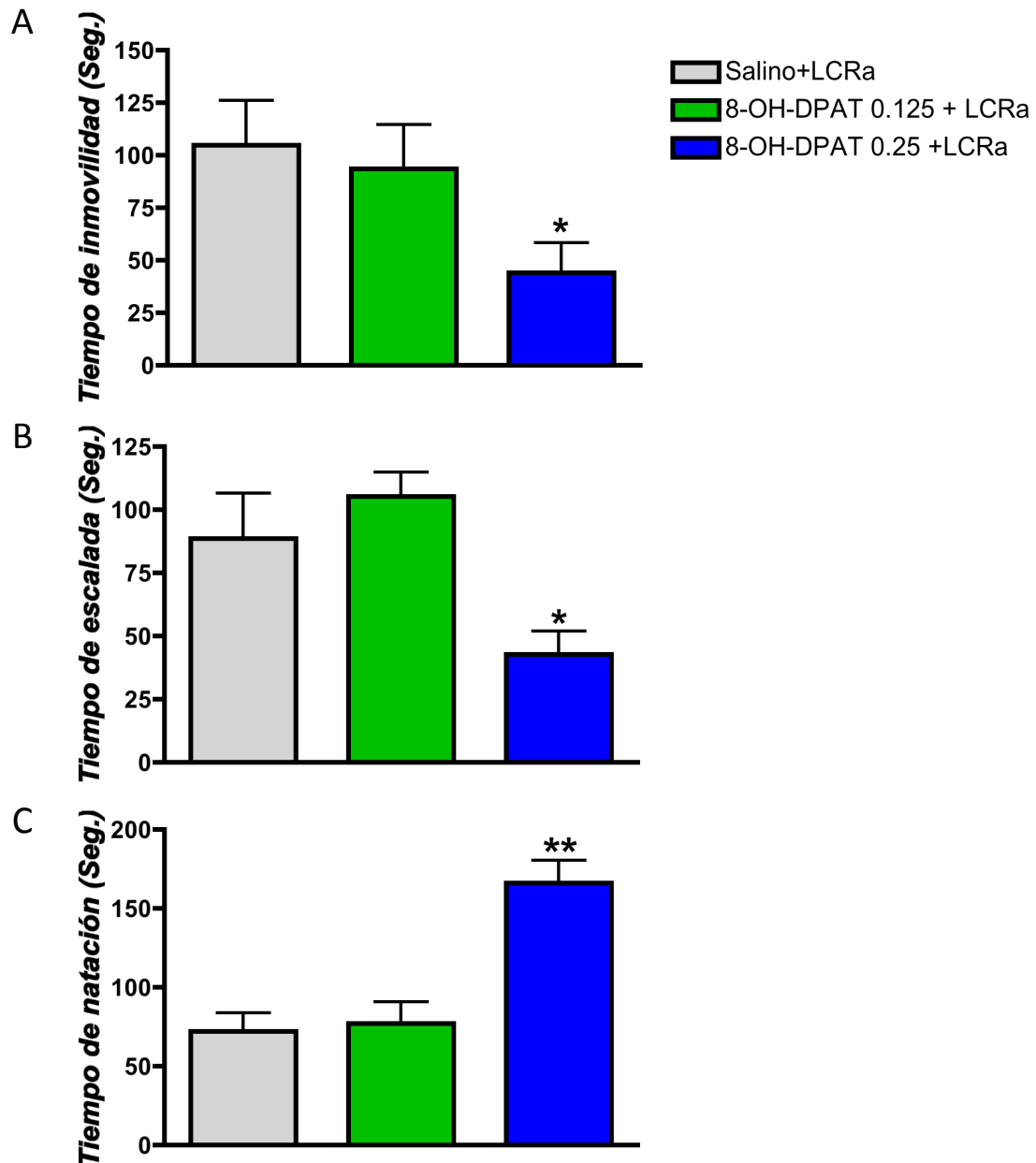


Figura 45. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración vía subcutánea de 8-OH-DPAT a diferentes dosis 0.125 y 0.25 mg/kg 60 minutos antes del test y LCRa vía icv 15 minutos antes de la prueba. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett. N= 5-8 ratas por grupo.

1.2.1.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora.

Como se muestra en la Tabla 10, la administración de 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg produce una disminución significativa en la distancia total ($p < 0.01$) y la velocidad media ($p < 0.01$) comparado con el grupo control, observándose una alteración locomotora en los animales. Por el contrario, la administración de 8-OH-DPAT a la dosis de 0.125 mg/Kg, no induce cambios significativos en los parámetros locomotores medidos en el campo abierto, comportándose como los animales inyectados con Salino y LCRa.

Parámetros Locomotores	Salino + LCRa	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg + LCRa	8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg + LCRa
Distancia Total (cm)	3827 ±255	3302 ±207,7	1854 ±223,2**
Velocidad Media (cm/Seg)	12,7 ±0,8	11 ± 0,7	6,2 ±0,7**

Tabla 10. Parámetros de la actividad locomotora en el campo abierto de los animales inyectados con las dosis 0.125 y 0.25 mg/Kg 8-OH-DPAT vía S.C y LCRa icv 60 y 15 minutos respectivamente, antes de la prueba. Los resultados se muestran como la media ± error estándar de la media. ** $p < 0.01$ vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett. N= 6-7 ratas por grupo.

1.2.2 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en pruebas de comportamiento animal.

1.2.2.1 Test de la natación forzada.

Se observa que la coadministración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.125 mg/Kg) y de GAL(1-15) (1 nmol), administradas 60 y 15 minutos, respectivamente, antes del test, induce una disminución significativa ($p < 0.05$) en el tiempo de inmovilidad en la natación forzada, en comparación con la respuesta desarrollada por lo animales inyectados con 8-OH-DPAT y LCRa únicamente (Figura 46A). De igual forma, la coadministración de 8-OH-DPAT con GAL(1-15) a dosis no efectivas, produce una disminución significativa ($p < 0.01$) en el parámetro tiempo de escalada comparado con el tratamiento 8-OH-DPAT + LCRa (Figura 46B).

En el tiempo de natación, la coadministración de 8-OH-DPAT con GAL(1-15) aumenta significativamente ($p < 0.001$) este parámetro en la natación forzada, con respecto a los animales tratados únicamente con dosis no efectiva de 8-OH-DPAT (Figura 46C). Lo que sugiere una potenciación del efecto del 8-OH-DPAT en esta prueba debido a la GAL(1-15).

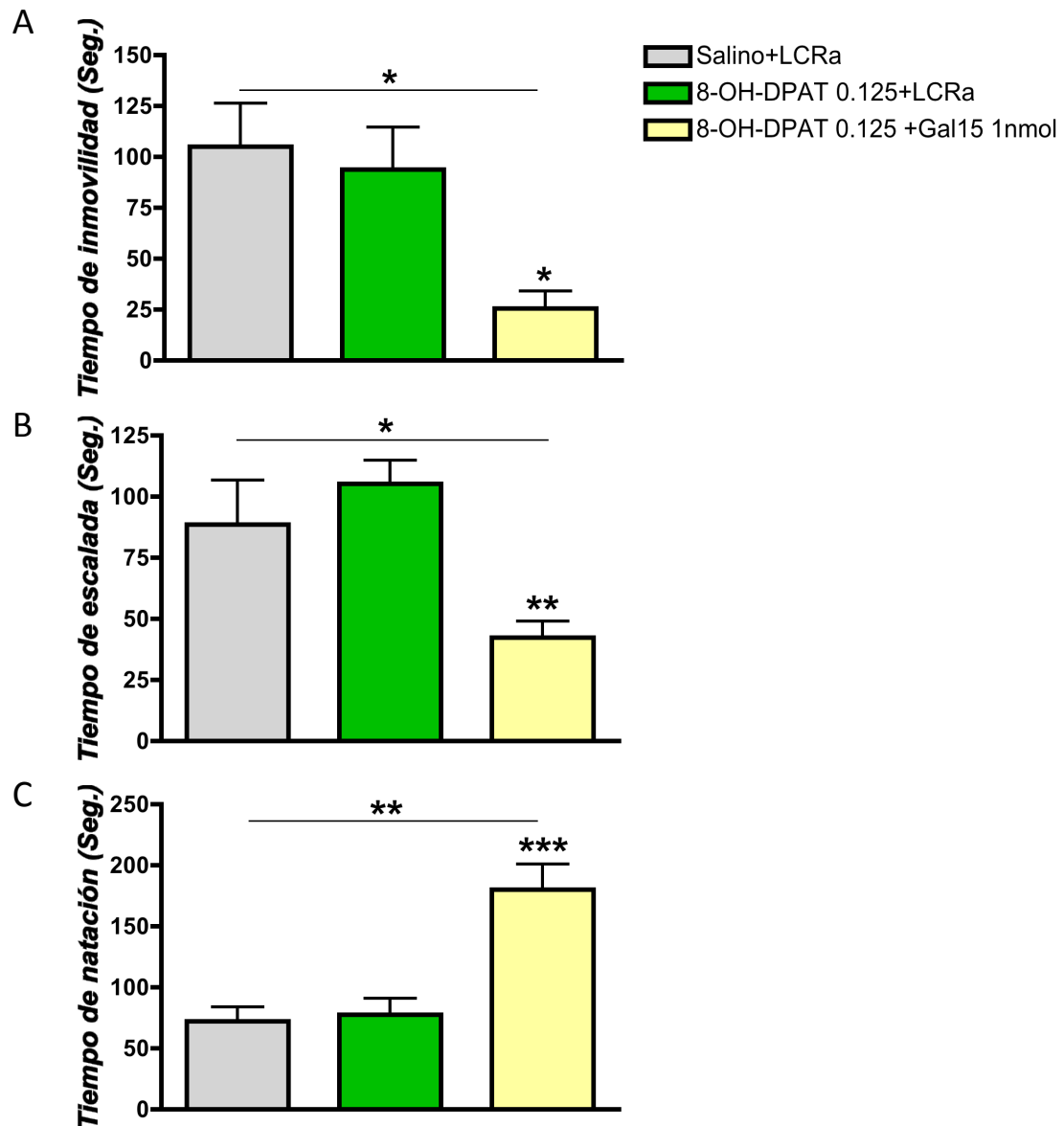


Figura 46. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.125 mg/kg) y de GAL(1-15) (1 nmol) 60 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs 8-OH-DPAT 0.125 mg/Kg, ** $p < 0.01$ vs 8-OH-DPAT 0.125 mg/Kg y *** $p < 0.001$ vs 8-OH-DPAT 0.125 mg/Kg según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 5-7 ratas por grupo.

1.2.2.2 Test del campo abierto: Análisis de la actividad locomotora.

Como se observa en la Tabla 11, la coadministración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT 0.125 mg/Kg y GAL(1-15) 1 nmol, administradas 60 y 15 minutos, respectivamente antes del campo abierto no produce cambio significativo, comparado con el grupo control, en los parámetros locomotores, como son la distancia total recorrida y la velocidad media, no mostrando los animales alteración locomotora. De igual forma, los animales administrados con 8-OH-DPAT y LCRA, no mostraron cambios significativos en los parámetros locomotores con respecto al grupo control.

Parámetros Locomotores	Salino + LCRA	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg + LCRA	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg + GAL(1-15) 1nmol
Distancia Total (cm)	4188 ±181,6	3318 ±245	3295 ±244,8
Velocidad Media (cm/Seg)	13,9 ±0,6	11,1 ±0,8	11 ±0.8

Tabla 11. Parámetros de la actividad locomotora en el campo abierto tras la administración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.125 mg/kg) y GAL(1-15) (1 nmol) 60 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRA fue utilizado como control. Los resultados se muestran como la media ± error estándar de la media. N= 4-6 ratas por grupo.

1.2.3 Efecto de la coadministración de la dosis no efectiva de GAL(1-15) con la dosis efectiva de 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada.

La coadministración de 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg con GAL(1-15) 1 nmol induce una disminución significativa ($p < 0.05$) del tiempo de inmovilidad respecto a los animales inyectados únicamente con una dosis efectiva de 8-OH-DPAT y LCRA (Figura 47A). De igual forma, la coadministración de ambas sustancias disminuye significativamente ($p < 0.05$) el tiempo de escala del animal respecto al efecto producido por la administración de 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg y LCRA (Figura 47B).

En el tiempo de natación, la administración de la dosis efectiva de 8-OH-DPAT junto con la dosis no efectiva de GAL(1-15), 60 y 15 minutos, respectivamente, antes del test, induce un aumento significativo ($p < 0.01$) del tiempo de natación respecto al aumento en este parámetro, producido por la dosis eficaz de 8-OH-DPAT (Figura 47C). Por tanto, la dosis no efectiva de GAL(1-15) produce una potenciación del efecto producido por la dosis efectiva del 8-OH-DPAT, en los parámetros medidos del test de la natación forzada.

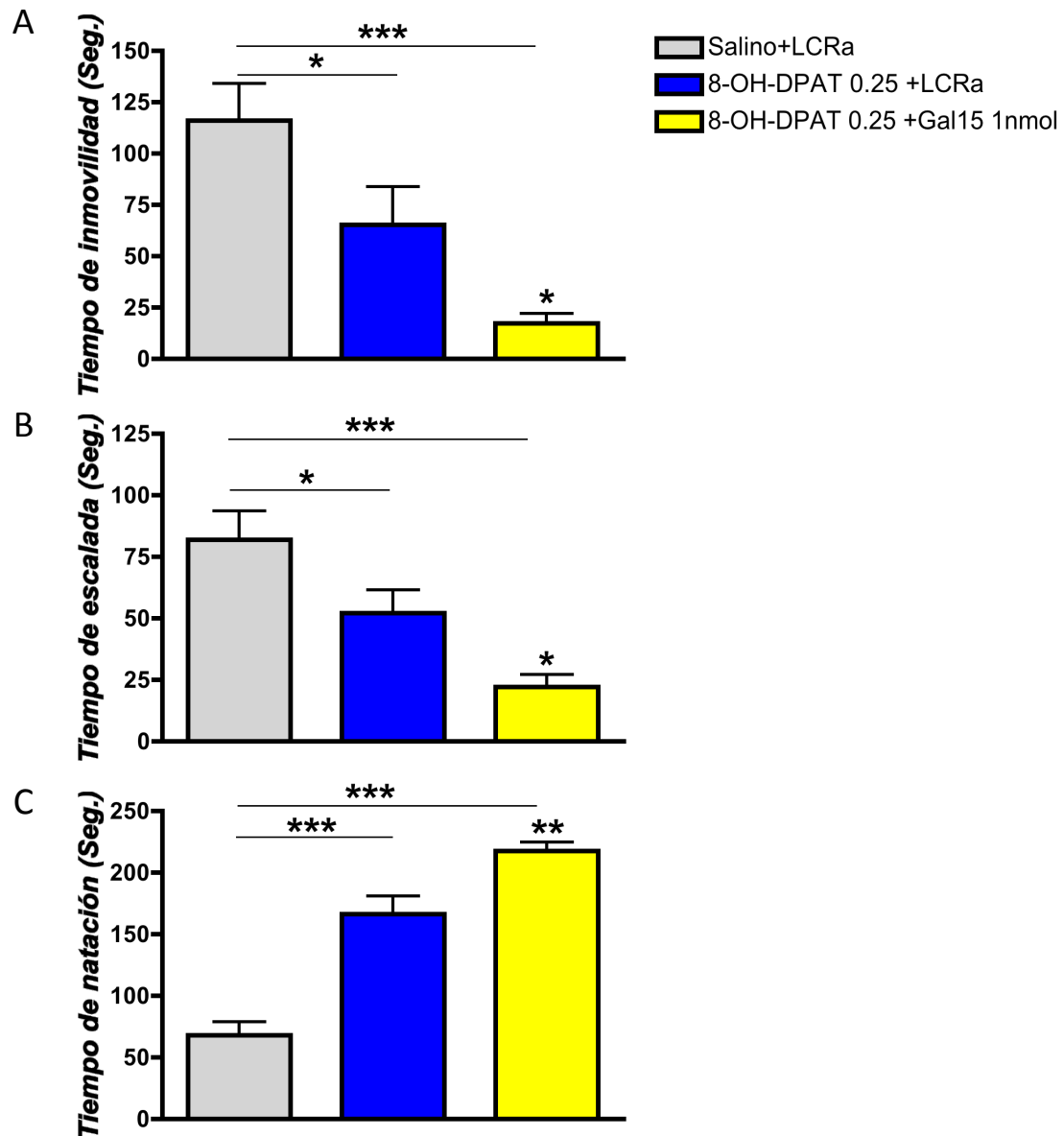


Figura 47. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración de la dosis efectiva de 8-OH-DPAT (0.25 mg/kg) y no efectiva de GAL(1-15) (1 nmol) 60 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg; ** $p < 0.01$ vs 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg y *** $p < 0.001$ 8-OH-DPAT 0.25 mg/Kg + GAL15 1nmol vs Salino+LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 6-11 ratas por grupo.

1.2.4 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL(1-15) y 8-OH-DPAT en presencia del antagonista de receptores GALR2, en la prueba de natación forzada.

La presencia del antagonista de GALR2 M871 en dosis de 3nmol produce un bloqueo significativo en un 78% ($p < 0.01$) en el tiempo de inmovilidad inducido por la coadministración de 8-OH-DPAT y GAL(1-15) (Figura 48A). Además dicho bloqueo no muestra diferencias significativas comparado con el efecto producido por la inyección de la dosis no efectiva de 8-OH-DPAT de forma aislada.

Respecto al tiempo de escalada, la presencia de la dosis de 3 nmol de M871 igualmente produce un bloqueo significativo en un 42% ($p < 0.05$) respecto a la disminución producido por los animales coadministrados con 8-OH-DPAT y GAL(1-15) (Figura 48B). La presencia del antagonista M871, también produce un bloqueo significativo en un 62% ($p < 0.001$) en el tiempo de natación respecto al aumento producido en los animales inyectados con 8-OH-DPAT y GAL(1-15) (Figura 48C). Por tanto el antagonista específico GALR2 bloquea la potenciación inducida por el fragmento GAL(1-15) sobre el 8-OH-DPAT.

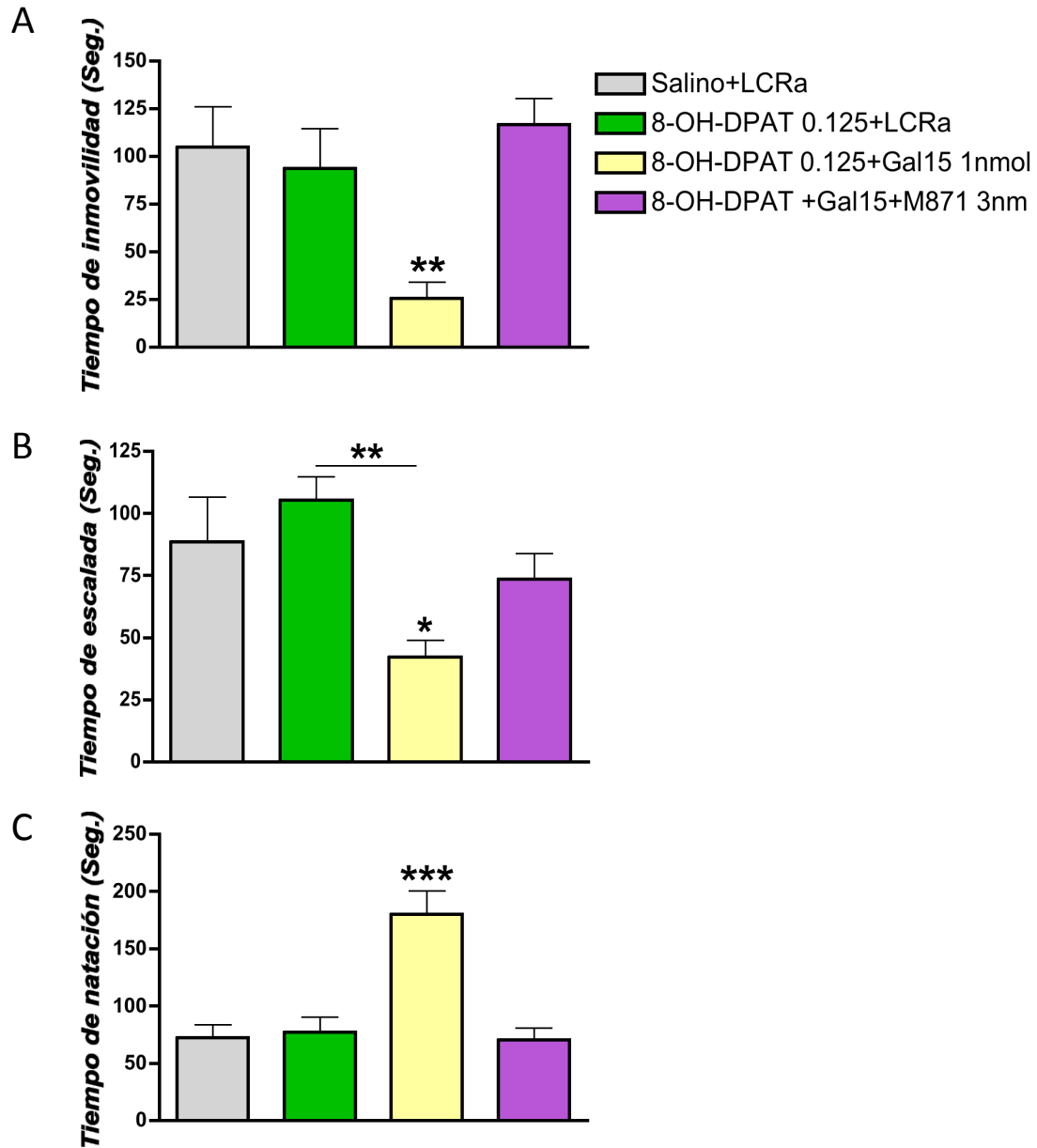


Figura 48. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.125 mg/kg) y de GAL(1-15) (1 nmol) en presencia del antagonista GALR2 M871 en el test de la natación forzada. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs resto de grupos, ** $p < 0.01$ vs resto de grupos y *** $p < 0.001$ vs resto de grupos según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 5-8 ratas por grupo.

Interacción GAL/5HT1A

1.3 Estudios de comportamiento animal: Inyección de 8-OH-DPAT (s.c 60 min) y GAL (icv. 15 min) antes de las pruebas de comportamiento.

1.3.1 Efecto de la GAL en la prueba de la natación forzada.

La administración icv 15 minutos antes del test de distintas dosis de GAL muestra, que la dosis de 3nmol produce, como se ha mostrado anteriormente en esta tesis, un descenso significativo en el tiempo de inmovilidad ($p < 0.05$) resultando efectiva en esta prueba, mientras que GAL 1nmol no produce diferencias con respecto al grupo inyectado con LCRa.

Por otro lado, en el tiempo de escalada y tiempo de natación tanto GAL 1 nmol como GAL 3nmol no muestran diferencias significativas con respecto al grupo control (Tabla 11).

Parámetros	Control	GAL 1nmol	GAL 3nmol
Tiempo de inmovilidad (Seg.)	78,2 ±13,2	89,5 ±25,2	138,1 ±15*
Tiempo de escalada (Seg.)	106,7 ±15,4	94,7 ±27,1	85,3 ±7,9
Tiempo de natación (Seg.)	57,8 ±12,1	66,8 ±11,1	67 ±15,3

Tabla 11. Tiempo de inmovilidad, tiempo de escalada y tiempo de natación en el test de la natación forzada de los animales inyectados con las dosis de 1 y 3 nmol de GAL vía icv 15 minutos antes de la prueba. Animales inyectados con LCRa fueron usados como Control. Los resultados se muestran como la media ± error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control según ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett. N= 6-9 ratas por grupo.

1.3.2 Efecto de la coadministración de las dosis no efectivas de GAL y 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada.

Como se muestra en la Figura 49, la coadministración de 8-OH-DPAT 0.125 mg/Kg y GAL 1nmol induce una tendencia a la reducción en el tiempo de inmovilidad comparado con los animales inyectados con la dosis no efectiva de 8-OH-DPAT únicamente. De igual forma, la coadministración de 8-OH-DPAT y GAL produce un descenso significativo ($p < 0.05$) del tiempo de escalada comparado con el grupo de animales administrados con 8-OH-DPAT. Con respecto al tiempo de natación, la coadministración de ambos compuestos aumenta significativamente ($p < 0.001$) este parámetro con respecto al efecto inducido únicamente con 8-OH-DPAT.

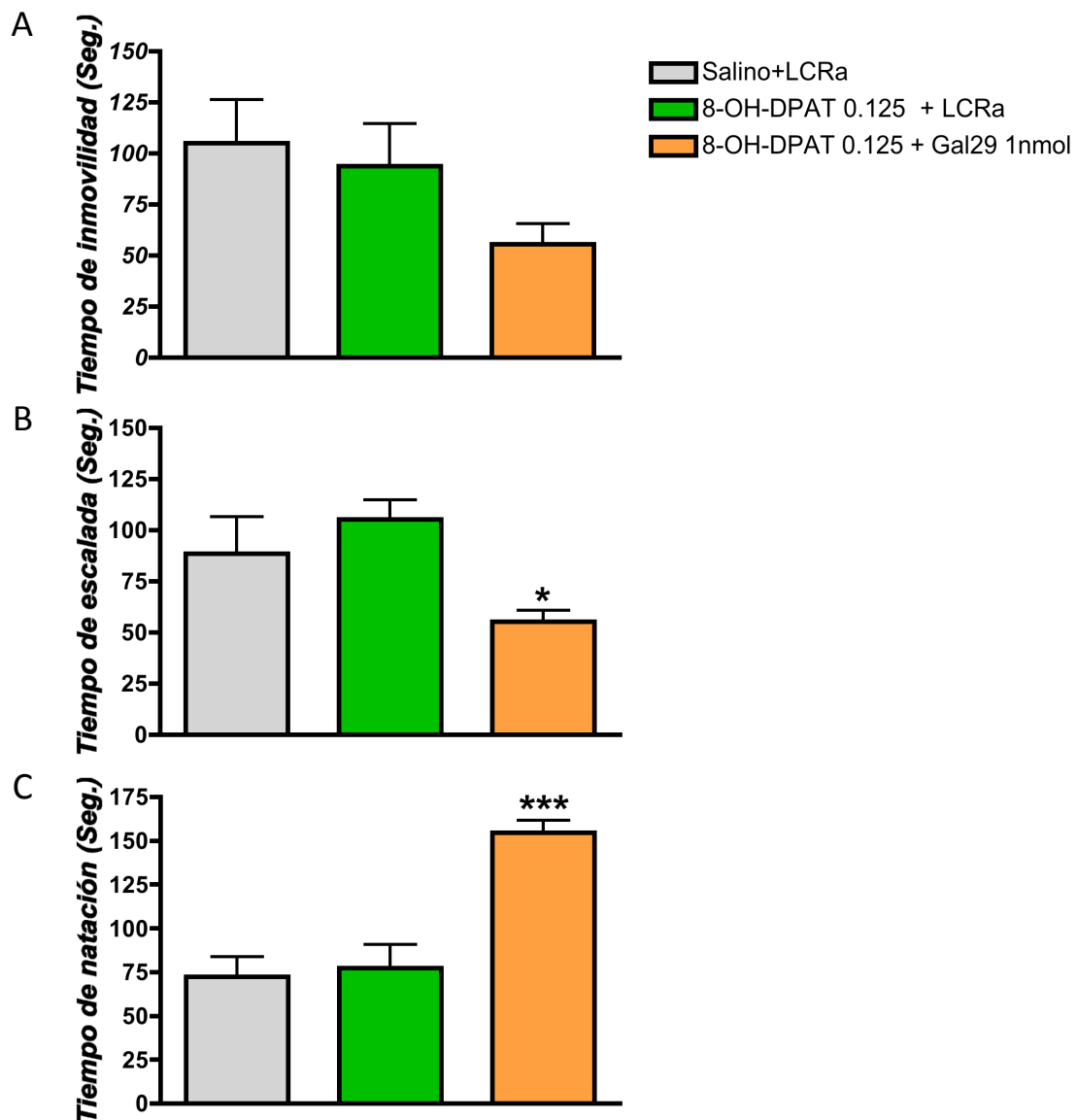


Figura 49. Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) en la prueba de la natación forzada tras la administración de las dosis no efectivas de 8-OH-DPAT (0.125 mg/kg) y de GAL (1 nmol) 60 y 15 minutos, respectivamente, antes del test. Salino + LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs resto de grupos y *** $p < 0.001$ vs resto de grupos según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 5-7 ratas por grupo.

1.4 Efecto en el test de la natación forzada tras la coadministración de 8-OH-DPAT y GAL y de 8-OH-DPAT y GAL(1-15).

Podemos observar que el fragmento GAL(1-15) induce una potenciación mayor del efecto del 8-OH-DPAT que la GAL. La comparativa realizada entre los efectos producidos por la coadministración del 8-OH-DPAT con la molécula completa de GAL y del 8-OH-DPAT con el fragmento GAL(1-15), muestra que a nivel de tiempo de inmovilidad, la disminución provocada por la coadministración del 8-OH-DPAT con el fragmento GAL(1-15) es significativamente mayor ($p < 0.05$) que la inducida por la coadministración del 8-OH-DPAT con GAL (Figura 50A).

De igual forma, se observa que la reducción significativa en el tiempo de escalada producida por la coadministración del 8-OH-DPAT con el fragmento GAL(1-15) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la disminución inducida por la coadministración de 8-OH-DPAT con GAL (Figura 50B). Si observamos el tiempo que permanece nadando el animal durante el test, vemos que el aumento significativo en este parámetro producido por la coadministración de 8-OH-DPAT con el fragmento GAL(1-15) es significativamente mayor ($p < 0.01$) al producido por la coadministración de 8-OH-DPAT con GAL (Figura 50C).

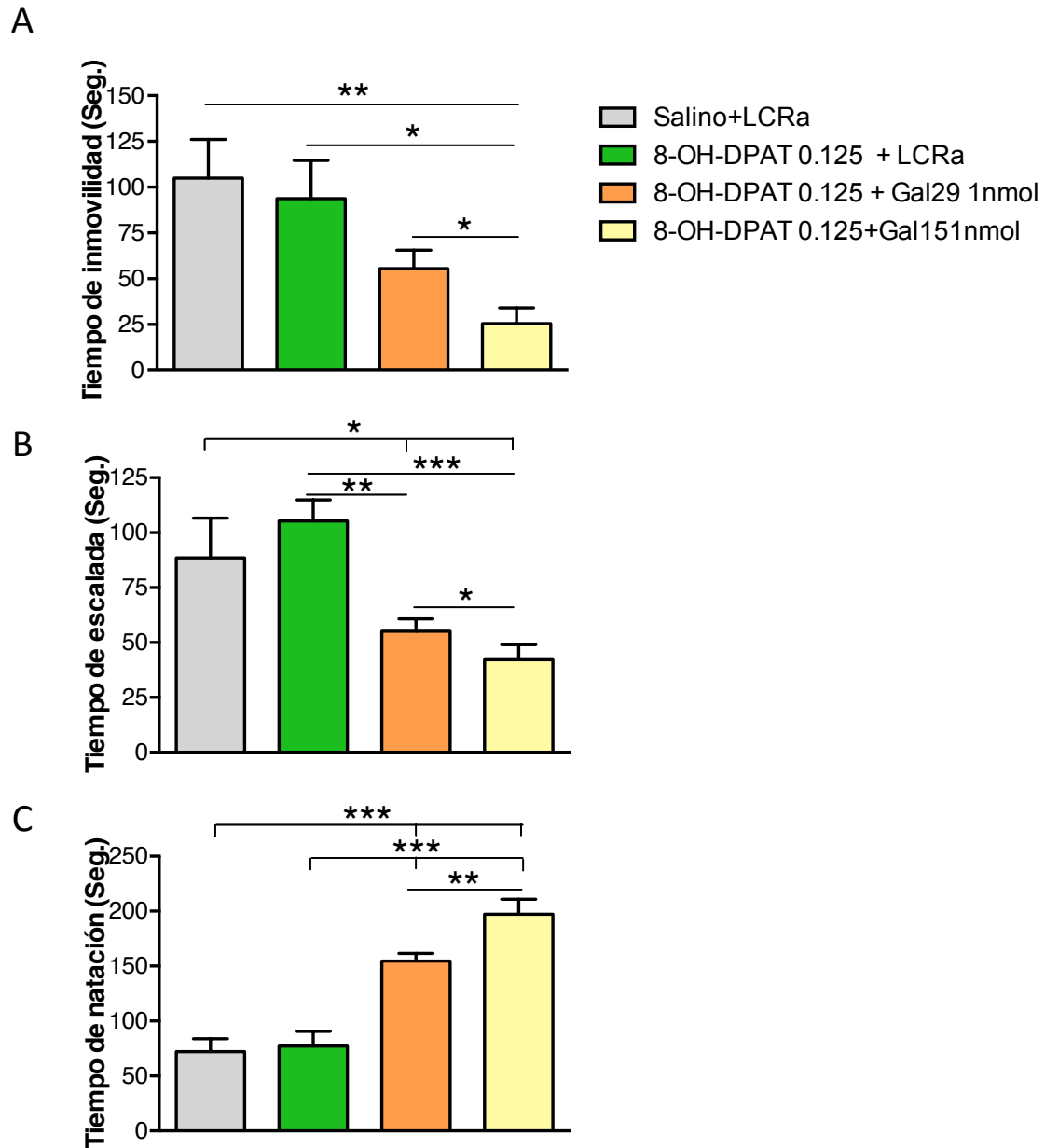


Figura 50. Representación gráfica de la comparativa del tiempo de inmovilidad (A), tiempo de escalada (B) y tiempo de natación (C) registrado durante el test de la natación forzada tras la coadministración de 8-OH-DPAT con GAL y 8-OH-DPAT con GAL(1-15), a dosis no efectivas. Salino+LCRa fue utilizado como control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N= 5-7 ratas por grupo.

2. Estudios a nivel de receptor: Autorradiografía.

2.1 Influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata.

Para estudiar los efectos del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A, hemos realizado experimentos de saturación con el agonista de 5HT1A 8-OH-DPAT marcado con ^3H . Se analizan la Afinidad (Kd) y el número de sitios de unión (Bmax) del receptor 5HT1A en las zonas CA1 y Giro dentado (GD) del hipocampo dorsal tras 10 minutos, 2h y 5h de la administración de GAL(1-15).

Al analizar el área **CA1** del hipocampo dorsal (Figura 51), observamos un aumento significativo de la Kd de los receptores 5HT1A ($p < 0.05$) respecto del grupo control a los 10 minutos y 2 horas tras la administración de la GAL(1-15). Esa disminución de la afinidad desaparece tras 5 h de la inyección del fragmento GAL(1-15).

Además observamos como tras 10 minutos y 2 horas de la administración de la GAL(1-15) se produce un aumento significativo de la Bmax de los receptores 5HT1A ($p < 0.05$), indicando un aumento del número de sitios de unión respecto a los controles. Nuevamente este efecto desaparece a las 5 horas de la administración.

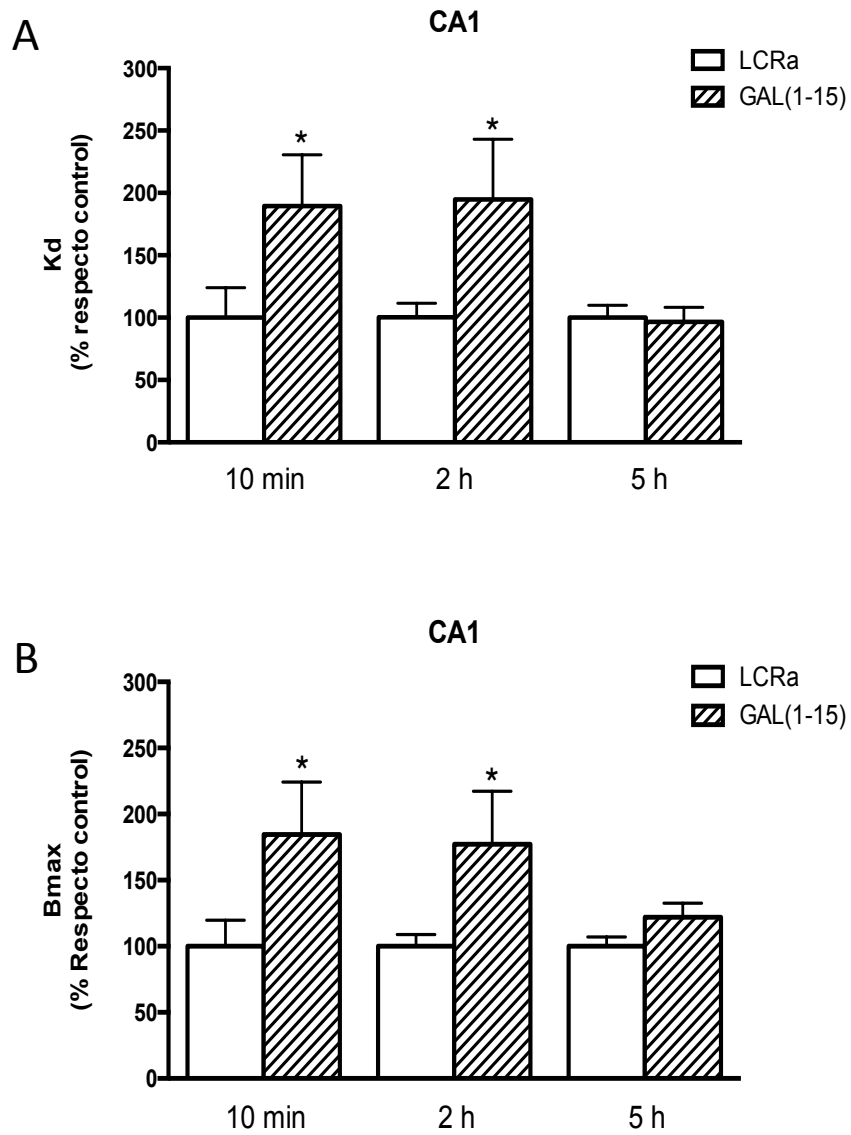


Figura 51. Afinidad (Kd) (A) y Densidad (Bmax) (B) de los receptores 5HT1A en el área CA1 del hipocampo dorsal 10 min, 2h y 5h después del tratamiento con GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $<p0.05$ vs Control según test de T-Student. N=6 ratas por grupo.

Con respecto a la zona del **Giro Dentado (GD)** (Figura 52), obtenemos un patrón similar al descrito en CA1. Observamos un aumento significativo de la Kd a los 10 minutos ($p < 0.01$) y a las 2 horas ($p < 0.05$) de la administración del fragmento GAL(1-15), que desaparece a las 5 horas de la inyección de GAL(1-15).

A nivel de Bmax, podemos observar que hay un aumento significativo del número de lugares de unión del agonista 5HT1A marcado a los 10 minutos ($p < 0.01$), a las 2 h ($p < 0.01$) y que se mantiene a las 5 h ($p < 0.05$) tras la administración del fragmento GAL(1-15).

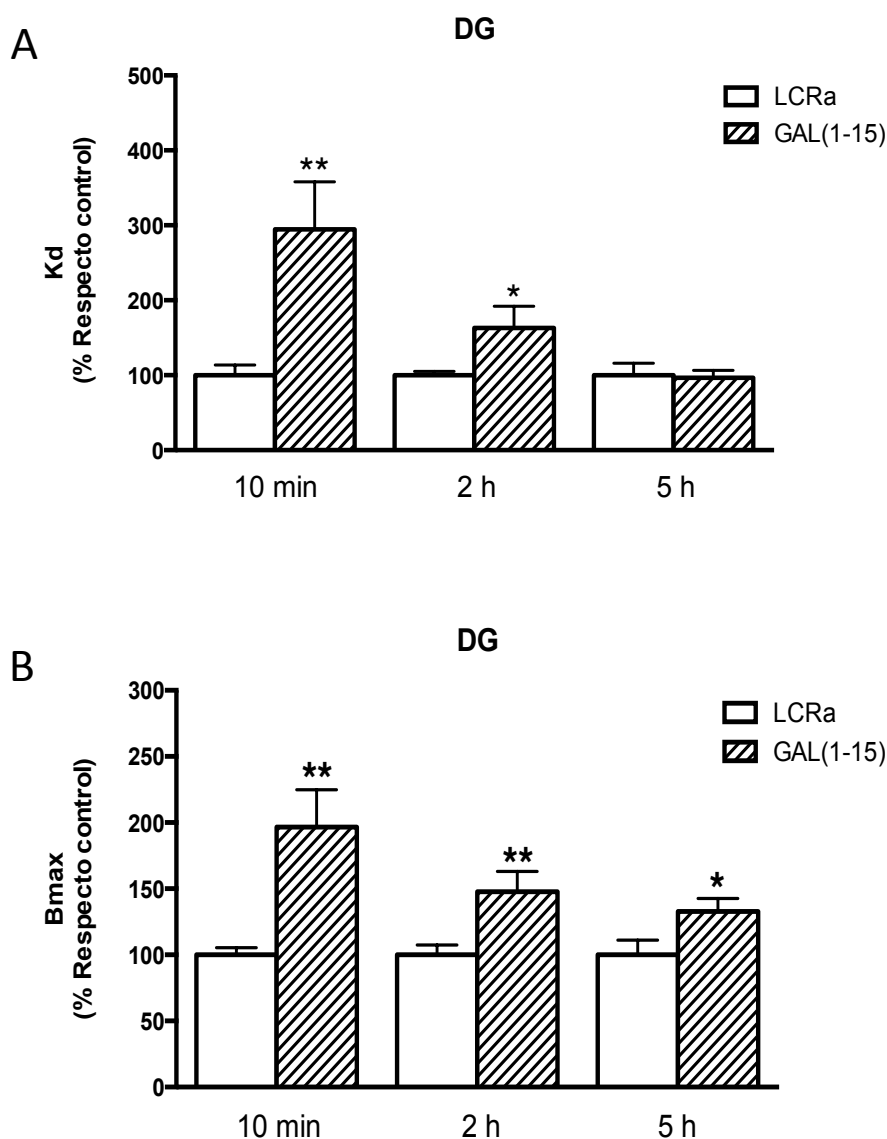


Figura 52. Afinidad (Kd) (A) y Densidad (Bmax) (B) de los receptores 5HT1A en el área GD del hipocampo dorsal 10 min, 2h y 5h después del tratamiento con GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs Control según test de T-Student. N=6 ratas por grupo.

En la Figura 53 se observa un autorradiograma representativo del aumento significativo de la densidad de receptores 5HT1A a los 10 minutos de la administración icv del fragmento GAL(1-15) en las zonas estudiadas de CA1 y DG.

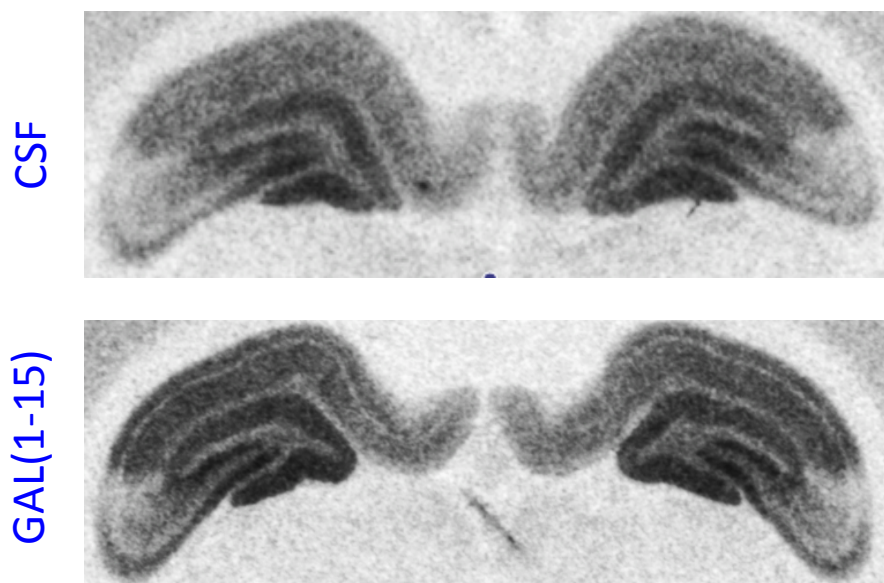


Figura 53. Autorradiogramas representativos donde se observa a dosis elevadas de isótopo (^3H -8OH-DPAT 7.2 nM) el incremento significativo de la densidad de receptores 5HT1A 10 minutos tras la administración icv del fragmento GAL(1-15) en las zonas de CA1 y GD.

2.1.1 Acción del M871, antagonista de los receptores GALR2, en la influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata.

Como se muestra en la Tabla 12, la presencia del antagonista GALR2 M871 bloquea, en **CA1**, el aumento significativo observado tanto de la K_d ($p < 0.01$) como de la B_{max} ($p < 0.05$) del receptor 5HT1A, producido por la inyección de la GAL(1-15) 10 minutos antes. Por otro lado, en esta zona del hipocampo dorsal, la administración del antagonista M871 solo no produjo ningún cambio en las características medidas del 5HT1A.

En **GD**, el otro área del hipocampo dorsal estudiada, el antagonista M871, también, bloquea tanto la disminución significativa de la afinidad ($p < 0.05$) como el aumento significativo de la densidad de receptores 5HT1A ($p < 0.01$) producido a los 10 minutos tras la administración icv del fragmento GAL(1-15). De igual forma que en CA1, la administración del M871 en solitario, no modificó ni la K_d ni la B_{max} del 5HT1A en el GD.

	Área	LCRa	GAL(1-15)	M871	GAL(1-15) +M871
Kd (nM)	CA1	3,28 ±0,53	7,05 ±0,8 ^{**}	3,96 ±0,27	4,85 ±0,68
	GD	2,65 ±0,3	4,55 ±0,4 ^a	3,3 ±0,3	3,3 ±0,73
Bmax (fmol/mg prot.)	CA1	1209 ±150,6	1874 ±127,4 [*]	1541 ±114,3	1337 ±142,5
	GD	1493 ±118,4	2312 ±188,2 ^{aa}	2013 ±124,2	1885 ±225,1

Tabla 12. Efecto del antagonista de GALR2 M871 en la modulación inducida por el fragmento GAL(1-15) en la unión del agonista marcado 8-OH-DPAT en el hipocampo dorsal (CA1 y GD). Se muestran valores de Kd y Bmax del receptor 5HT1A 10 minutos tras la inyección de GAL(1-15). Los valores se muestran como la media ± error estándar de la media. *p<0.05 vs LCRa y GAL(1-15)+M871; ** p<0.01 vs LCRa y M871; ^ap<0.05 vs LCRa; ^{aa}p<0.01 vs LCRa según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. N=6 ratas por grupo.

2.2 Influencia del fragmento GAL(1-15) sobre las características de los receptores 5HT1A en el núcleo del Rafe dorsal de rata.

Se realizan experimentos de saturación con el agonista de 5HT1A 8-OH-DPAT marcado para estudiar los efectos del fragmento GAL(1-15) sobre la Afinidad (Kd) y el número de sitios de unión (Bmax) del receptor 5HT1A tras 10 minutos, 2h y 5h de la administración de GAL(1-15) en el núcleo del Rafe dorsal (DR).

Como se observa en la Figura 54, el fragmento GAL(1-15) no produce ninguna modificación de la Kd de los receptores 5HT1A a ninguno de los tiempos estudiados en el Rafe dorsal. Sin embargo, la GAL(1-15) produce una disminución significativa (p<0.05) en la Bmax del receptor 5HT1A 2 horas después de la administración de la GAL(1-15), por tanto disminuye significativamente la densidad de estos receptores en el Rafe dorsal, sin observarse modificaciones de este parámetro a los 10 minutos y a las 5 horas.

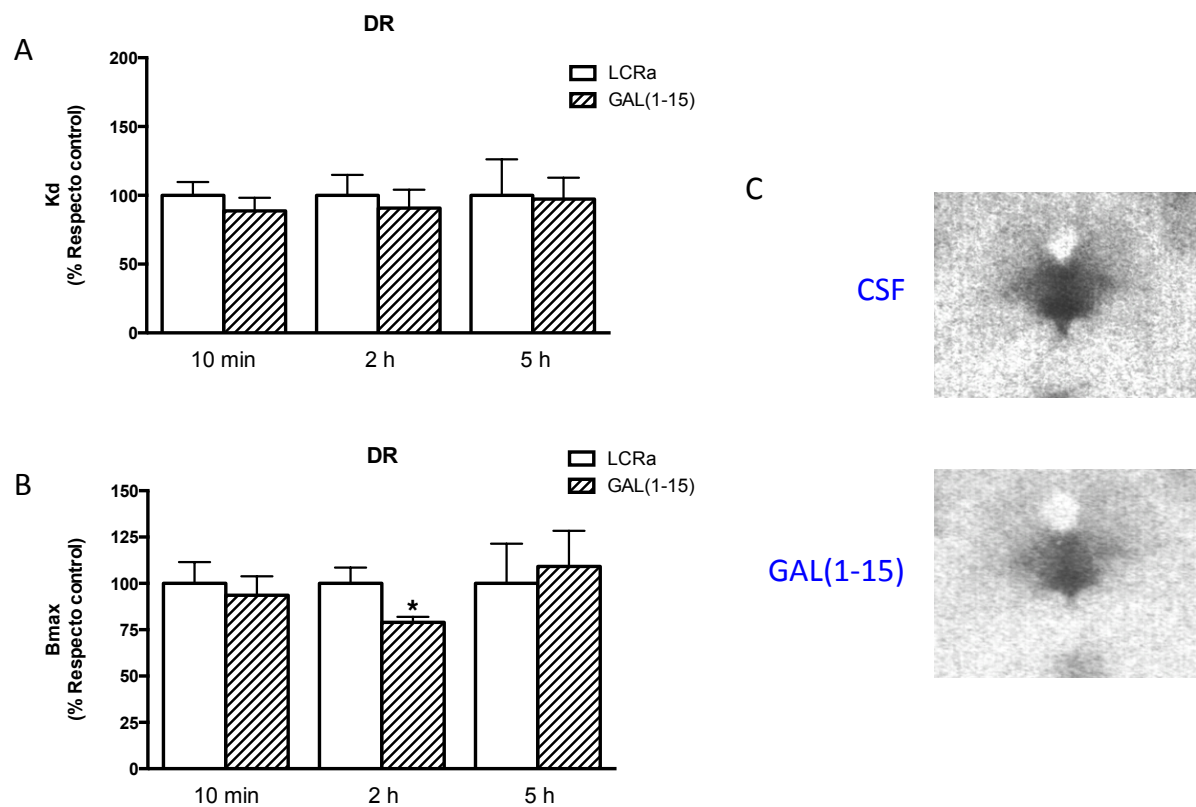


Figura 54. Afinidad (Kd) (A) y Densidad (Bmax) (B) de los receptores 5HT1A en el núcleo dorsal del Rafe 10 min, 2h y 5h después del tratamiento con GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs Control según test de T-Student. N=6 ratas por grupo. (C) Autorradiogramas representativos a nivel del Rafe dorsal donde se observa la disminución significativa de la densidad de receptores 5HT1A a las 2 horas tras la administración icv de GAL(1-15) a dosis de isótopo de 7.2 nM.

3. Estudios de la expresión del receptor 5HT1A: Hibridación *in situ*.

3.1 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal de rata.

Analizamos la capacidad del fragmento GAL(1-15) de modificar la expresión del receptor 5HT1A en el hipocampo dorsal (CA1 y GD). Para esto medimos la cantidad de mRNA de este receptor mediante la técnica de hibridación *in situ* a las dos horas y a las 5 horas de la administración icv del fragmento GAL(1-15).

Como observamos en la Figura 55, la administración de GAL(1-15) dos horas antes produce un aumento significativo del mRNA del receptor 5HT1A medido en CA1 ($p < 0.01$). De igual manera el fragmento GAL(1-15) aumenta significativamente el mRNA del 5HT1A en el GD ($p < 0.01$), por tanto aumenta la expresión del receptor 5HT1A en las áreas medidas del hipocampo dorsal.

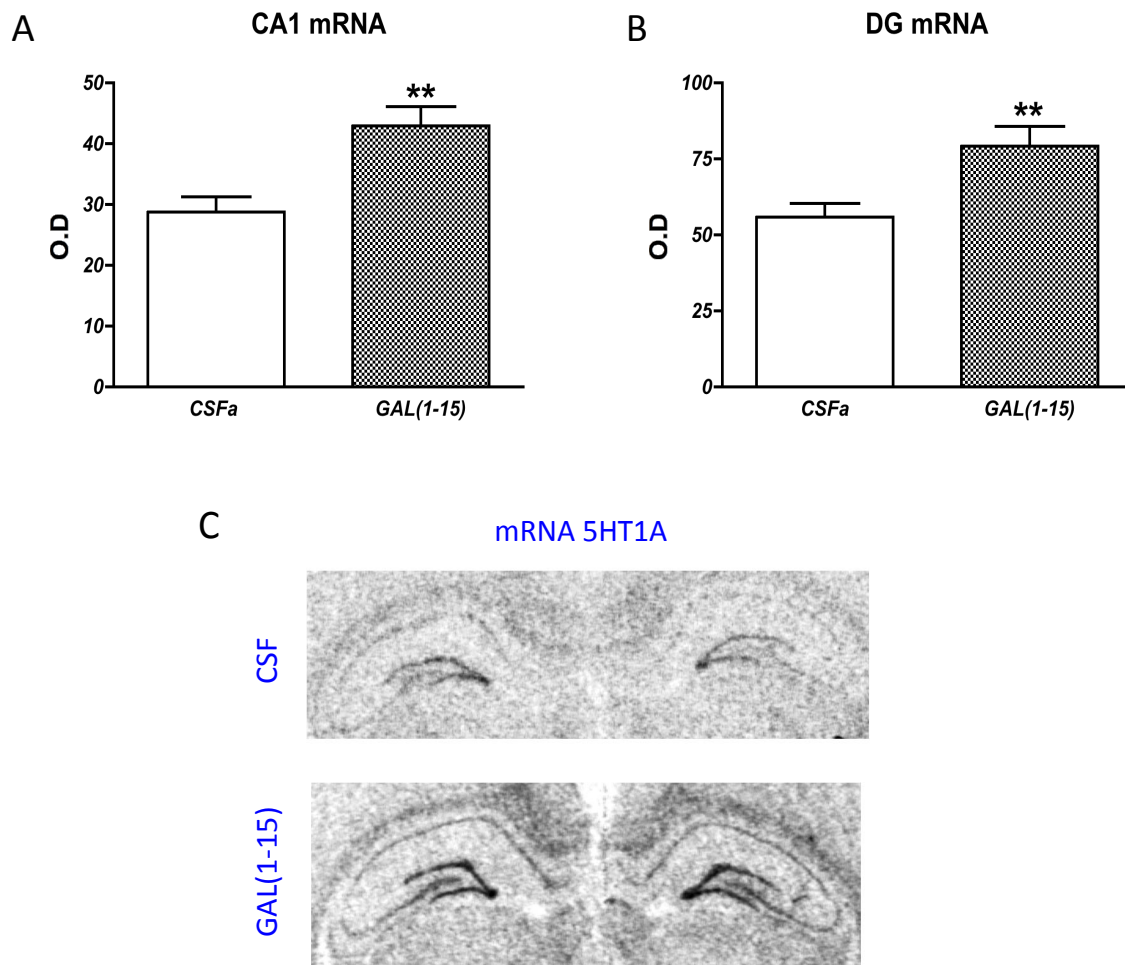


Figura 55. Niveles de mRNA del receptor 5HT1A en CA1 (A) y Giro Dentado (DG) (B) de hipocampo dorsal, medidos mediante hibridación *in situ* 2 horas tras la administración icv de GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media \pm error estándar de la media. ** $<p0.01$ vs Control según test de T-Student. N=6 ratas por grupo. (C) Autorradiogramas representativos a nivel de hipocampo dorsal donde se observa el aumento significativo de la cantidad de mRNA de receptores 5HT1A a las 2 horas tras la administración icv de GAL(1-15).

Este efecto desaparece a las 5 horas de haber administrado GAL(1-15) (Tabla 13).

Área	Tratamiento	D.O
CA1	CSFa	38120 \pm 380
	GAL(1-15)	37230 \pm 739
GD	CSFa	41100 \pm 348
	GAL(1-15)	39730 \pm 648

Tabla 13. Niveles de mRNA del receptor 5HT1A en Rafe dorsal medidos mediante hibridación *in situ* 5 horas tras la administración icv de GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media \pm error estándar de la media. N= 5-6 ratas por grupo.

3.2 Efecto de GAL(1-15) sobre la expresión de los receptores 5HT1A en el Rafe dorsal de rata.

Observamos que 2 horas tras la administración icv de GAL(1-15) se produce una disminución significativa ($p < 0.01$) del mRNA del receptor 5HT1A en el Rafe dorsal, efecto que desaparece tras las 5 horas de inyección (Tabla 14).

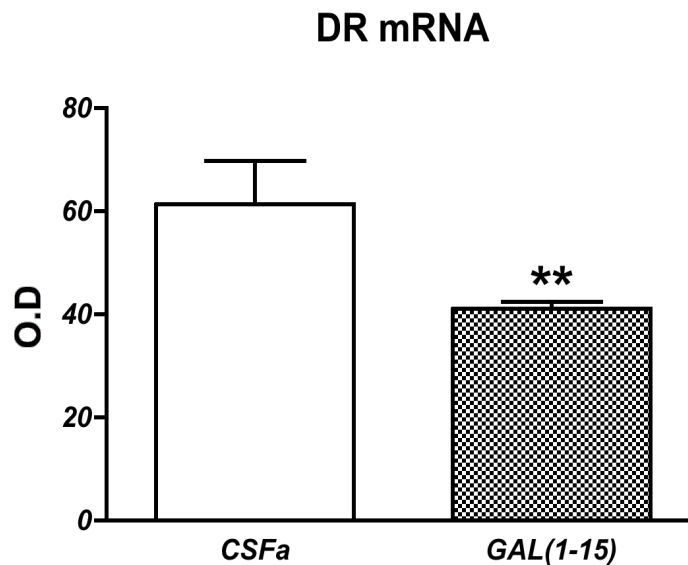


Figura 56. Niveles de mRNA del receptor 5HT1A en Rafe dorsal, medidos mediante hibridación *in situ* 2 horas tras la administración icv de GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media \pm error estándar de la media. ** $< p < 0.01$ vs Control según test de T-Student. N=6 ratas por grupo.

Área	Tratamiento	D.O
Rafe	CSFa	74,46 ±6,15
Dorsal	GAL(1-15)	64,51 ±2,94

Tabla 14. Niveles de mRNA del receptor 5HT1A en Rafe dorsal medidos mediante hibridación *in situ* 5 horas tras la administración icv de GAL(1-15). Los valores se representan en porcentajes respecto al grupo control y se expresan como la media ± error estándar de la media. N= 5-6 ratas por grupo.

4. Técnicas inmunohistoquímicas.

4.1 Inmunofluorescencia simple de 5HT1A.

Para determinar la localización del receptor 5HT1A se ha analizado mediante inmunofluorescencia la expresión del receptor en el Hipocampo dorsal y en el núcleo dorsal del Rafe. Se analiza mediante microscopía confocal el fluorocromo verde Alexa-488 para marcar los receptores 5HT1A en la inmunofluorescencia.

Mediante el control, en el cual se omite el anticuerpo primario, se comprueba que no existe reactividad cruzada del anticuerpo secundario, demostrando así la especificidad de la señal (Figura 57D).

Al analizar las distintas zonas del Hipocampo dorsal, observamos la presencia del receptor 5HT1A en las distintas porciones del cuerno de Ammog (CA1, CA2 y CA3) así como en el Giro Dentado (GD). El núcleo del rafe dorsal (RD), también observamos señal específica correspondiente con el receptor 5HT1A (Tabla 15.). En la Figura 57 se muestran fotografías representativas del marcaje correspondiente al receptor 5HT1A en distintas zonas.

Núcleo		Detección de 5HT1A
Hipocampo Dorsal	CA1	Si
	CA2	Si
	CA3	Si
	GD	Si
Rafe Dorsal	RD	Si

Tabla 15. Análisis de la distribución del receptor 5HT1A mediante inmunofluorescencia en el Hipocampo dorsal (Cuerno de Ammon 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3 respectivamente) y Giro Dentado (GD)) y el núcleo dorsal del Rafe (RD).

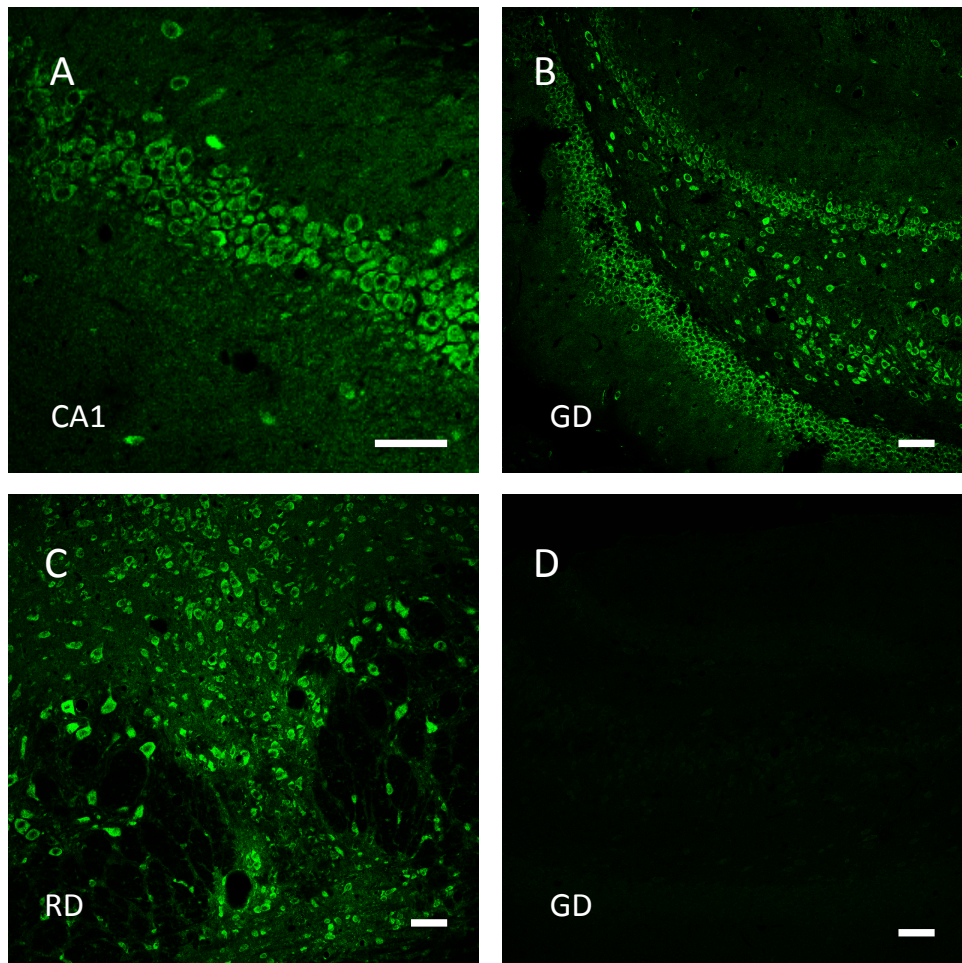


Figura 57. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la detección del receptor 5HT1A (verde) por inmunofluorescencia. Se muestra marcaje positivo de 5HT1A en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1(A) y GD(B) así como en el Rafe dorsal (RD)(C). También se muestra la imagen correspondiente al control negativo (D). Barra de escala 50 µm.

4.2 Inmunofluorescencia doble GALR2/5HT1A.

Se ha analizado mediante doble inmunofluorescencia la coexpresión y colocalización celular de los receptores 5HT1A y GALR2 en el Hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe. Para ello, mediante microscopía confocal, se detectan el fluorocromo verde Alexa-488 para marcar el receptor 5HT1A y el fluorocromo rojo Dylight 549 para la detección del receptor GALR2. Los núcleos celulares, se tiñen con DAPI apareciendo de color azul, lo cual permite diferenciar cada célula y localizar los receptores en la membrana plasmática.

Mediante controles primarios se comprueba que la señal detectada es específica, demostrando como al omitir un anticuerpo primario no se detecta la señal producida por su fluorocromo específico (Figura 58)

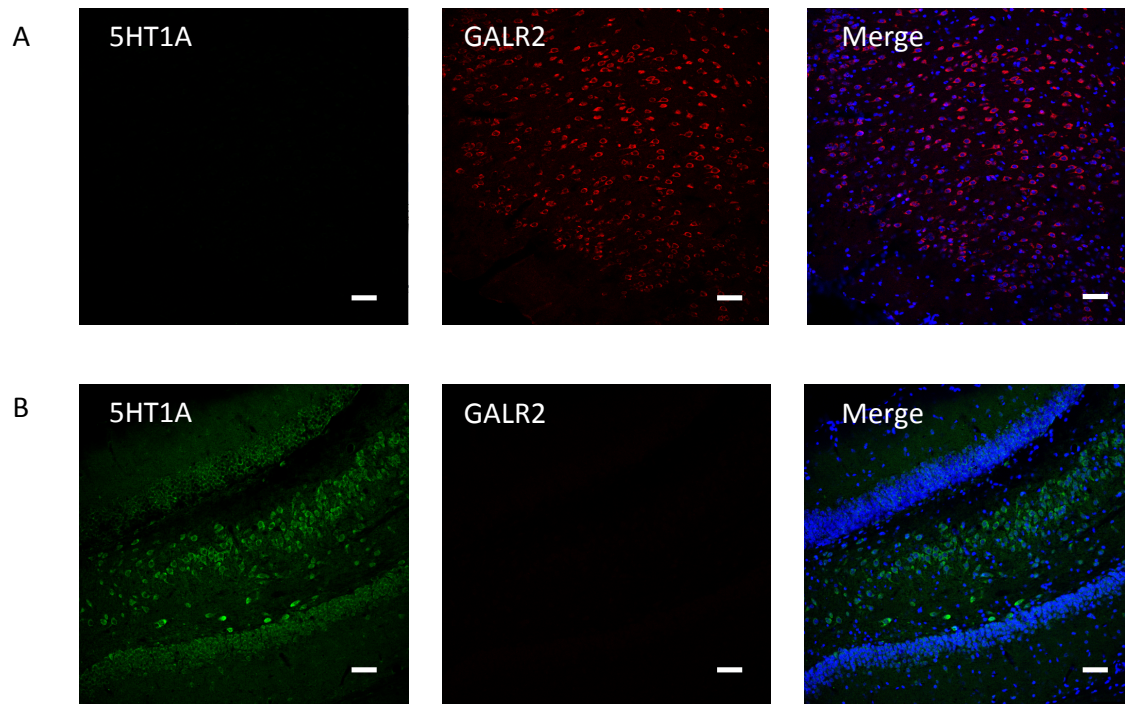


Figura 58. Control primario del anticuerpo de 5HT1A en la zona de la amígdala (A) y control primario de GALR2 en la zona del Giro Dentado (B). Se observa que al omitir el anticuerpo primario no se detecta señal del fluorocromo específico. (A) detección de 5HT1A (verde), (B) detección de GALR2 (rojo) y (C) suma de ambos canales. Barra de escala 50 μ m.

En la Figura 59 se observa la detección tanto de receptores 5HT1A (verde) como GALR2 (rojo). El marcaje amarillo-anaranjado, indica que ambos receptores se coexpresan y se colocan en la misma neurona, pudiéndose ver un alto grado de colocación de estos receptores.

Al analizar las zonas del Hipocampo dorsal, observamos que los receptores 5HT1A y GALR2 se colocan en las mismas neuronas a lo largo de CA1, CA2 y CA3 así como en el Giro Dentado (GD) (Figura 59, 60 y 61). También se observa de forma similar la colocación de ambos receptores en el núcleo dorsal del Rafe (RD) (Figura 59). En la Tabla 16 se muestra un resumen de las zonas con colocación de los receptores 5HT1A y GALR2 en el Hipocampo dorsal y el Rafe dorsal.

Núcleo		Detección de 5HT1A/GALR2
Hipocampo Dorsal	CA1	Si
	CA2	Si
	CA3	Si
	GD	Si
Rafe Dorsal	RD	Si

Tabla 16. Análisis de la colocación de los receptores 5HT1A y GALR2 mediante inmunofluorescencia doble en el Hipocampo dorsal (Cuerno de Ammon 1, 2 y 3 (CA1, CA2 y CA3 respectivamente) y Giro Dentado (GD)) y el núcleo dorsal del Rafe (RD).

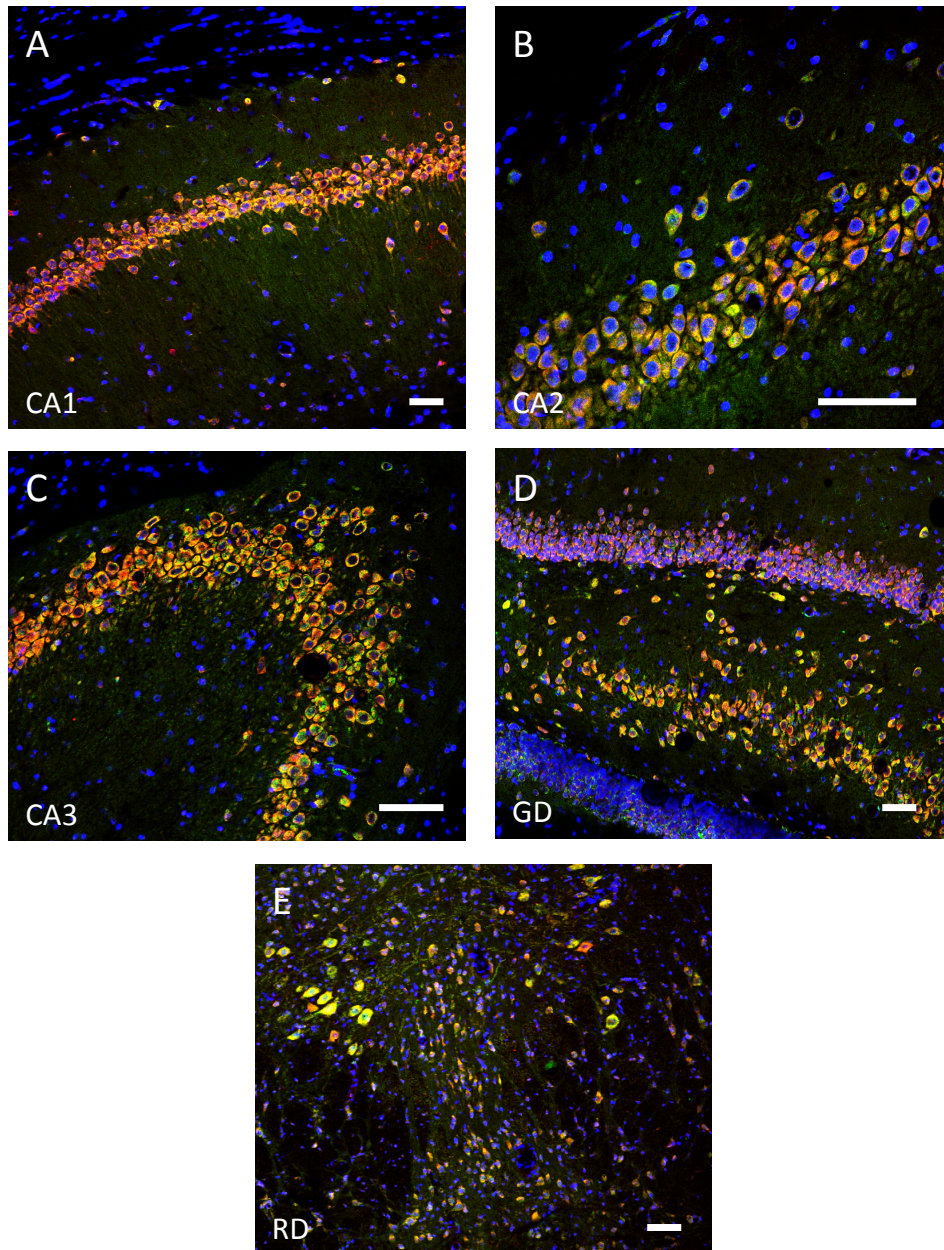


Figura 59. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores 5HT1A (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo naranja). Se observa, colocalización de 5HT1A y GALR2 en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1(A), CA2(B), CA3(C) y GD(D) así como en el Rafe dorsal (RD)(E). Barra de escala 50 μ m.

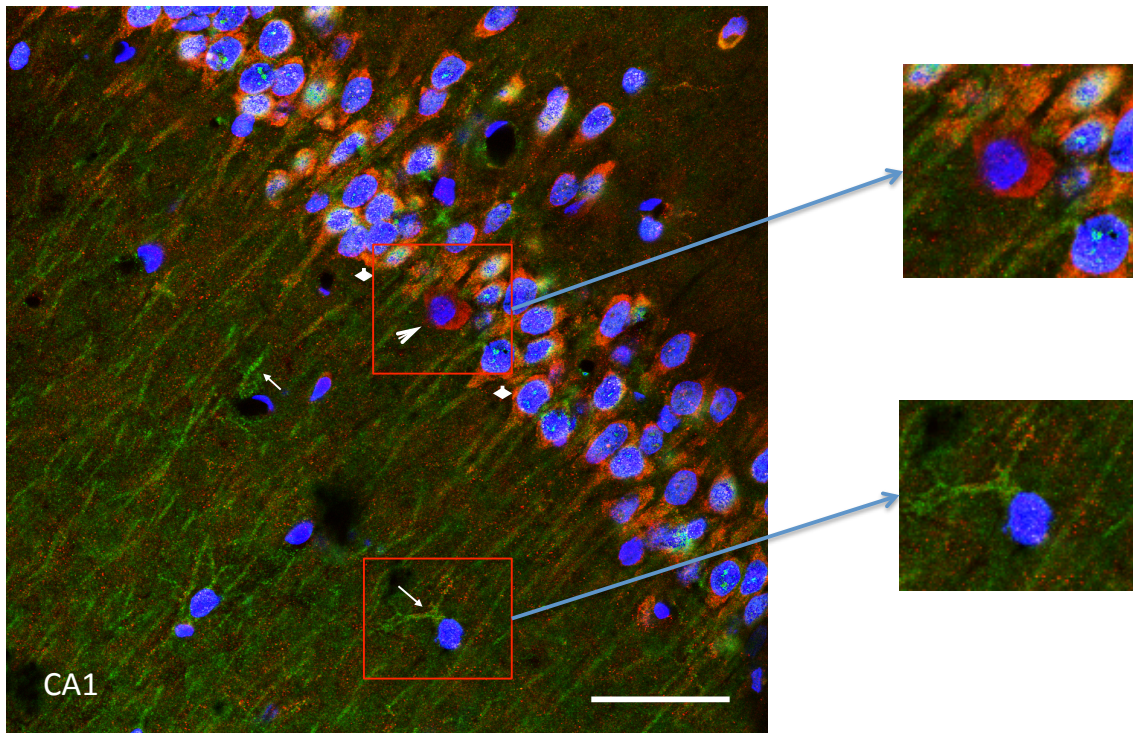


Figura 60. Fotografía representativa mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores 5HT1A (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo-naranja). Se muestra, colocalización de 5HT1A y GALR2 (Rombo) en la zona de CA1 del Hipocampo dorsal así como magnificaciones donde se observan células que presentan sólo inmunorreactividad para GALR2 (cabeza de flecha) y células con señal única de 5HT1A (flecha). Barra de escala 50 μm .

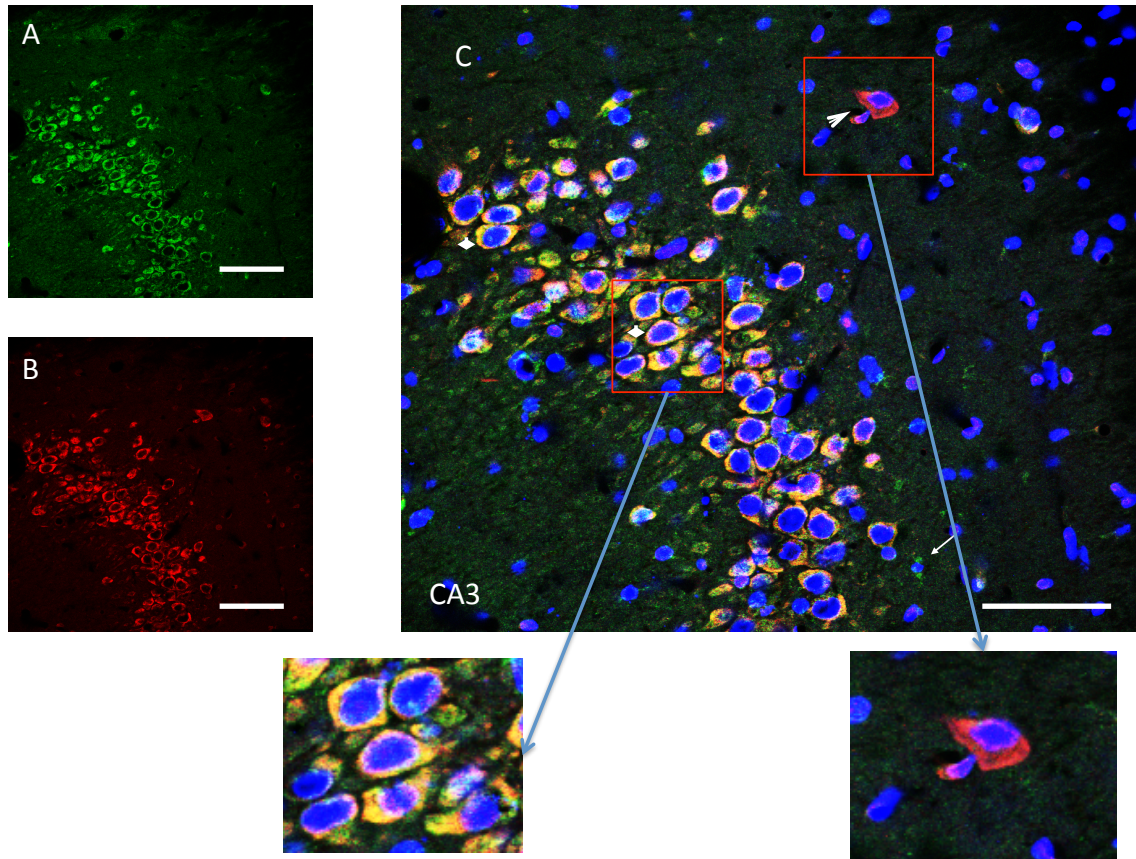


Figura 61. Fotografía representativa mediante microscopía confocal de la inmunofluorescencia doble de los receptores 5HT1A (verde) y GALR2 (rojo) donde se observa la colocalización de ambos receptores (amarillo-naranja). Se muestra, colocalización de 5HT1A y GALR2 en la zona de CA3 del Hipocampo dorsal. Las fechas indican sólo la presencia de 5HT1A, las cabezas de fecha muestran únicamente la presencia de GALR2 y la colocalización de ambos receptores esta indicado por los rombos. En las magnificaciones se observan células como donde coexisten ambos receptores y células con inmunorreactividad únicamente para el receptor GALR2. Barra de escala 50 μ m.

5. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en tejido.

Hemos analizado mediante la técnica de ligazón por proximidad (PLA), la posible formación de complejos heterodímeros formados por los receptores **GALR1-5HT1A** y por los receptores **GALR2-5HT1A** en las zonas del Hipocampo dorsal y el núcleo del Rafe dorsal. Los núcleos celulares se tiñen con DAPI, lo que les confiere un color azul, y permite distinguir las células y determinar la presencia de los complejos GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A en el citoplasma.

Para comprobar la especificidad de la señal obtenida, además de los controles primarios que se realizaron en las pruebas inmunohistoquímicas (ver apartados anteriores), se analizan zonas con ausencia de señal por la falta de algunos de los receptores, como es el caso del Cuerpo Calloso (CC). Como se muestra en la Figura 62, la ausencia de señal demuestra la especificidad de la señal.

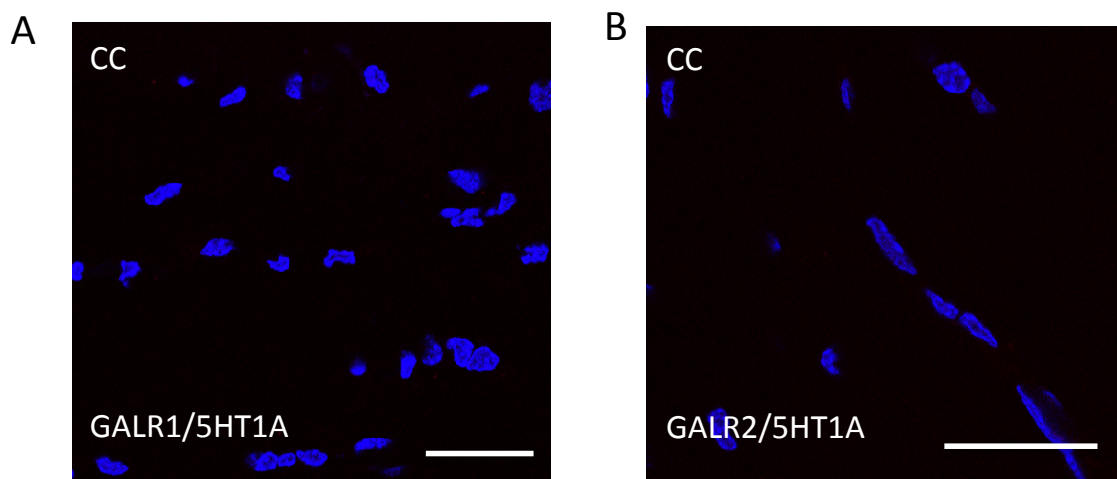


Figura 62. Fotografía representativa de zonas negativas en la prueba de ligazón por proximidad como es el Cuerpo Calloso (CC), debido a la ausencia de receptores de GAL en esta zona. La ausencia de señal positiva en estas zonas, tras el análisis, demuestra que la señal encontrada es específica del complejo GALR1-5HT1A (A) y GALR2-5HT1A (B). Barra de escala 50 μ m.

Al analizar si los receptores **GALR1-5HT1A** se encuentran en estrecha proximidad en las zonas del Hipocampo dorsal y el núcleo del Rafe dorsal (Figura 63), observamos que existe señal positiva de PLA en las zonas CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado (GD) del hipocampo así como en el núcleo del Rafe dorsal, indicando esto la posible formación de complejos heterodímeros en estos núcleos.

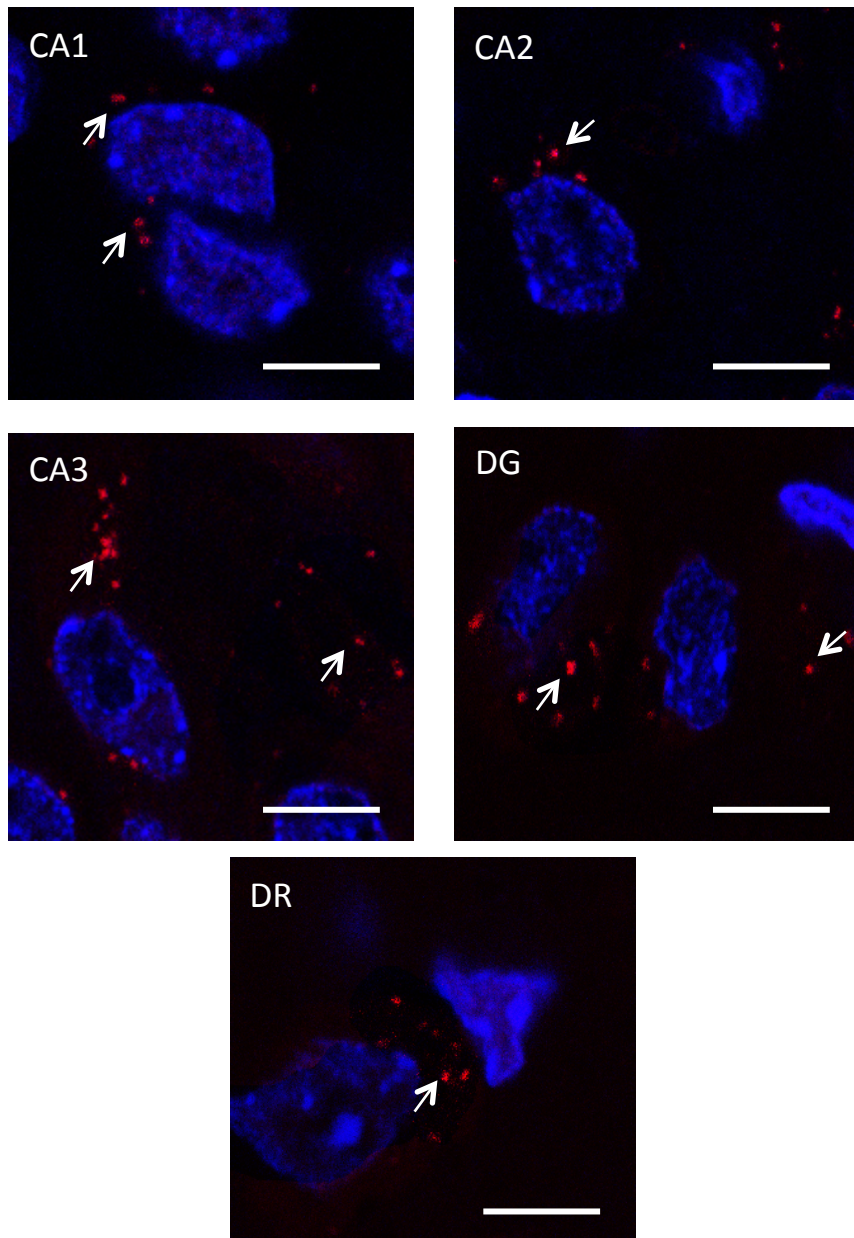


Figura 63. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la técnica del PLA de los receptores GALR1 y 5HT1A donde se observa la estrecha proximidad entre ambos receptores (puntos rojos). Se observa, proximidad entre GALR1 y 5HT1A en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD) así como en el Rafe dorsal (RD). Barra de escala 10 μm.

El estudio de la señal producida por el complejo **GALR2-5HT1A** (Figura 64), mediante la técnica de ligazón por proximidad, muestra la existencia de estrecha proximidad entre ambos receptores en las zonas de CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado del hipocampo dorsal así como en el núcleo dorsal del Rafe. Existiendo por tanto la posibilidad de formación de complejos heterodímeros en estas zonas.

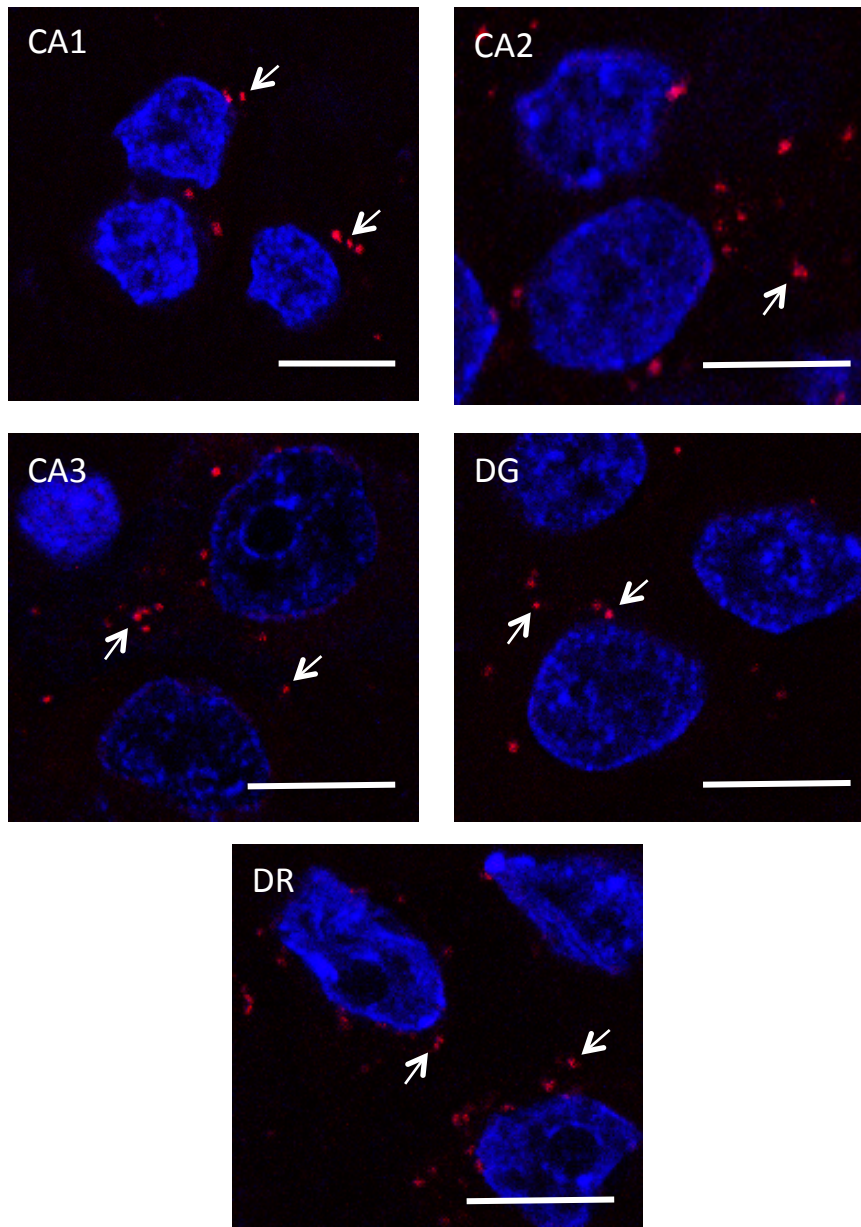


Figura 64. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la técnica del PLA de los receptores GALR2 y 5HT1A donde se observa la estrecha proximidad entre ambos receptores (puntos rojos). Se observa, proximidad entre GALR2 y 5HT1A en distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD) así como en el Rafe dorsal (RD). Barra de escala 10 μ m.

Al realizar la cuantificación y comparación de los complejos **GALR1-5HT1A** y **GALR2-5HT1A** (puntos rojos) en el citoplasma celular de las distintas zonas estudiadas (Figura 65), observamos que, la media de complejos de GALR1-5HT1A y de GALR2-5HT1A no muestra diferencias significativas en las zonas del Hipocampo dorsal CA1, CA2 y GD, siendo la cantidad de complejos similar. Sin embargo, en CA3 observamos un aumento significativo ($p < 0.001$) del número de complejos de GALR1-5HT1A comparado con el número de complejos de GALR2-5HT1A. En el núcleo del Rafe dorsal, el número de complejos formados por los receptores GALR1-5HT1A es significativamente menor ($p < 0.01$) que el número de complejos formados por los receptores GALR2-5HT1A.

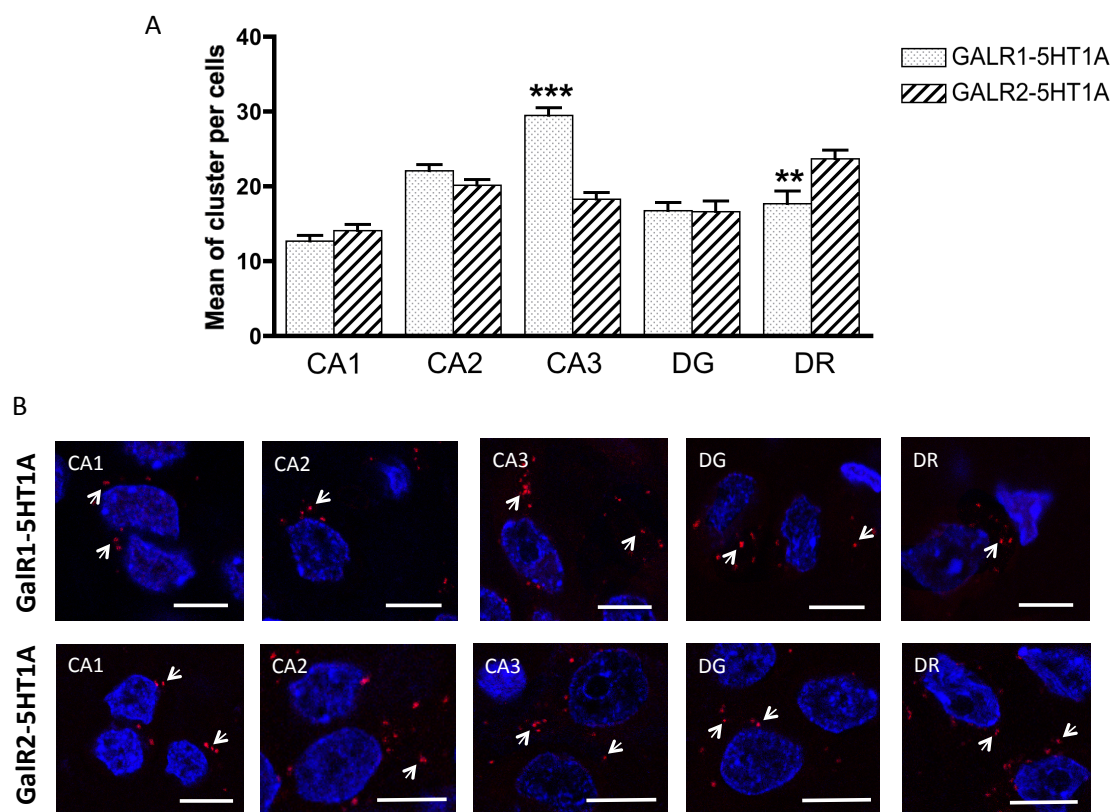


Figura 65. (A) Representación gráfica de la cuantificación y comparación de complejos GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A en la técnica de PLA. Se analizan distintas zonas del Hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD) así como núcleo dorsal del Rafe (RD). Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. Se analizaron entre 80 y 160 células por zona. $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ versus GALR2-5HT1A según test de t-Student. (B) Fotografías representativas de los complejos GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A en las zonas estudiadas. Barra de escala 10 μ m.

En la Figura 66, se muestra una fotografía representativa de la capa molecular del giro dentado, en el Hipocampo dorsal, donde se observa que aunque existen receptores GALR1 y GALR2 estos no se encuentran formando heterodímeros con el receptor 5HT1A ya que no se ve señal positiva de PLA, lo que apoya que la señal encontrada en otras zonas es específica.

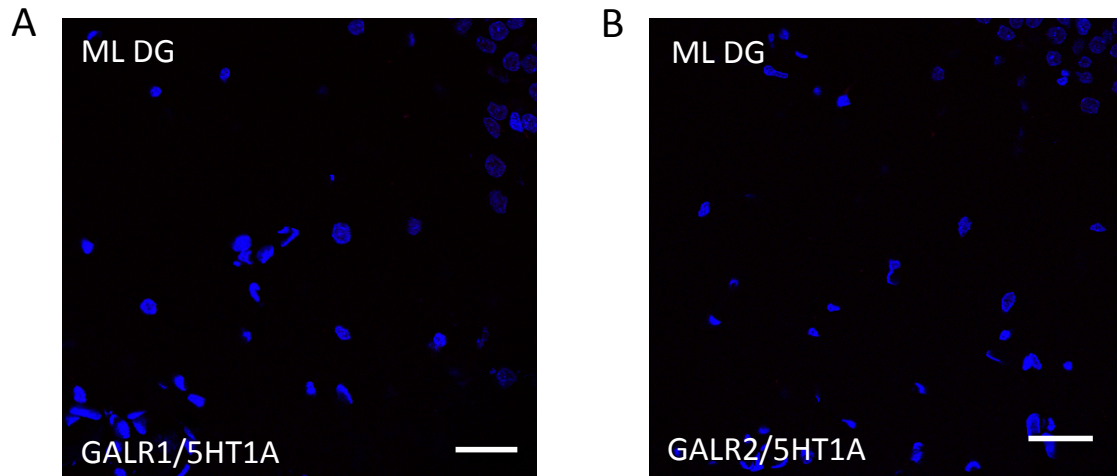


Figura 66. Fotografía representativa de zonas negativas para el complejo GALR1-5HT1A (A) y GALR2-5HT1A (B) en la prueba de ligazón por proximidad como es la capa molecular del Giro Dentado (ML DG). La ausencia de señal positiva en esta zonas demuestra que la señal encontrada en otras zonas es específica de los complejos GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A. Barra de escala 50 μ m.

***Resultados de la interacción GAL(1-15)/5HT1A
en cultivos celulares.***

Células derivadas del núcleo del Rafe: RN33B

1. Inmunofluorescencia simple contra 5HT1A en células en cultivo derivadas del núcleo del Rafe RN33B.

Se realiza en el tipo celular RN33B, células procedentes del núcleo del Rafe, la técnica de inmunofluorescencia contra los receptores 5HT1A, para comprobar la expresión del receptor en este tipo de células en cultivo.

Como se muestra en la Figura 67, aparece señal positiva para el receptor 5HT1A, lo que demuestra que las células derivadas del núcleo del Rafe RN33B expresan el receptor de forma endógena estando en cultivo.

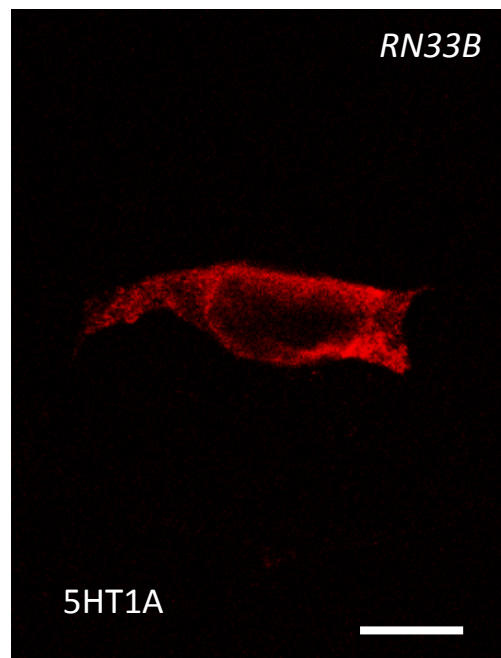


Figura 67. Fotografía representativa mediante microscopía confocal de la detección del receptor 5HT1A (rojo) mediante inmunofluorescencia, en células derivadas del núcleo de Rafe RN33B. Se muestra, marcaje positivo del receptor 5HT1A en células RN33B. Barra de escala 10 μ m.

2. Ligazón por proximidad (PLA) GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B.

Mediante la técnica de ligazón por proximidad (PLA) comprobamos si los receptores GALR1 y 5HT1A así como los receptores GALR2 y 5HT1A se encuentran en estrecha proximidad (entre 10 y 20 nm) en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B.

Al analizar la señal producida por la técnica del PLA (los complejos se observan como puntos rojos) en las células RN33B (Figura 68), podemos observar que existen en el citoplasma de este tipo celular complejos formados por los receptores GALR1-5HT1A (Figura 68A). Con respecto a los receptores GALR2 y 5HT1A, también se observan complejos GALR2-5HT1A (puntos rojos) en el citoplasma de las células RN33B formados por ambos receptores (Figura 68B). Por tanto, este tipo celular derivado del núcleo del Rafe RN33B, no sólo expresa de forma endógena los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A (ver apartados anteriores de esta tesis) sino que estos pueden estar formando complejos heterodímeros del tipo GALR1-5HT1A y GALR2-5HT1A, además como se muestra en apartados anteriores de la tesis heterodímeros GALR1-GALR2.

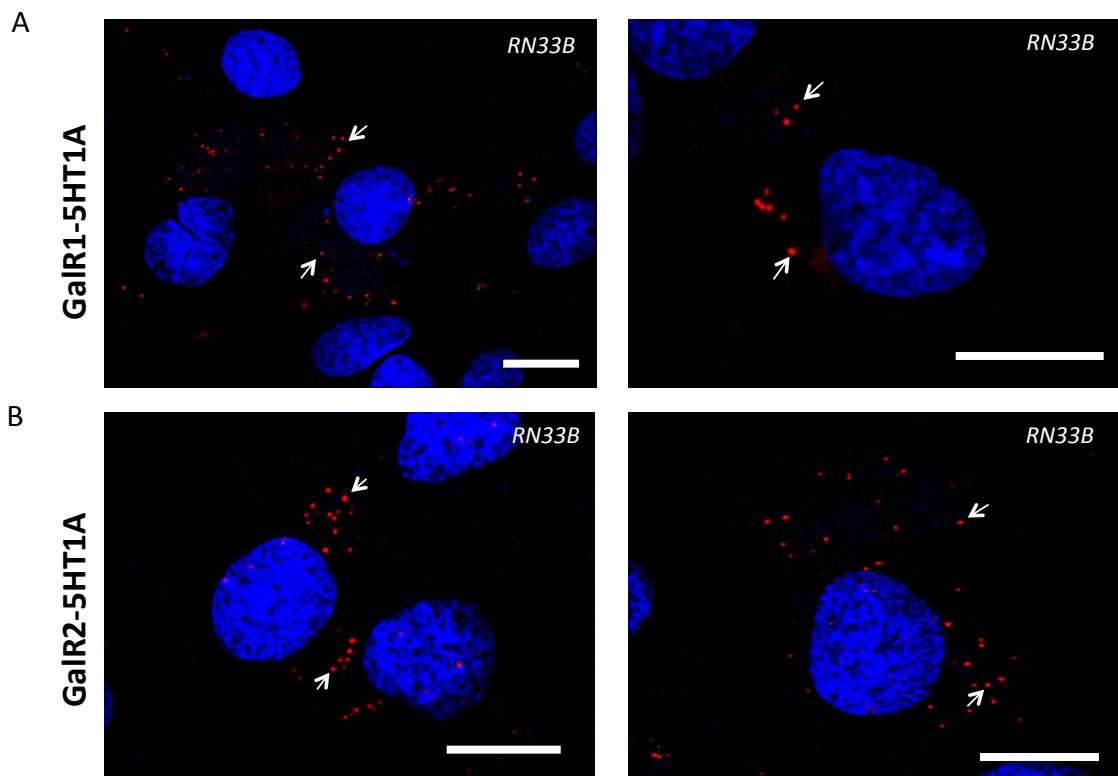


Figura 68. Fotografías representativas mediante microscopía confocal de la técnica de ligazón por proximidad de los receptores GALR1-5HT1A (A) y GALR2-5HT1A (B) en células RN33B, donde se observa la estrecha proximidad entre los receptores en el citoplasma (puntos rojos). Barra de escala 10 μ m.

3. Expresión del receptor 5HT1A en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la estimulación con GAL y GAL(1-15).

3.1 Cuantificación de la expresión de 5HT1A por inmunofluorescencia.

Para medir la expresión del receptor 5HT1A en las células derivadas del núcleo del Rafe RN33B tras la estimulación del cultivo con GAL o GAL(1-15), se cuantifica la señal obtenida mediante inmunofluorescencia contra el receptor.

La disminución observada en la inmunorreactividad de 5HT1A, provocada tras la estimulación del fragmento GAL(1-15) ($p < 0.001$) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al descenso de la inmunorreactividad producido por la molécula completa GAL ($p < 0.05$). Por tanto, GAL(1-15) produce una disminución más importante de la expresión del receptor 5HT1A que la producida por la incubación con GAL (Figura 69).

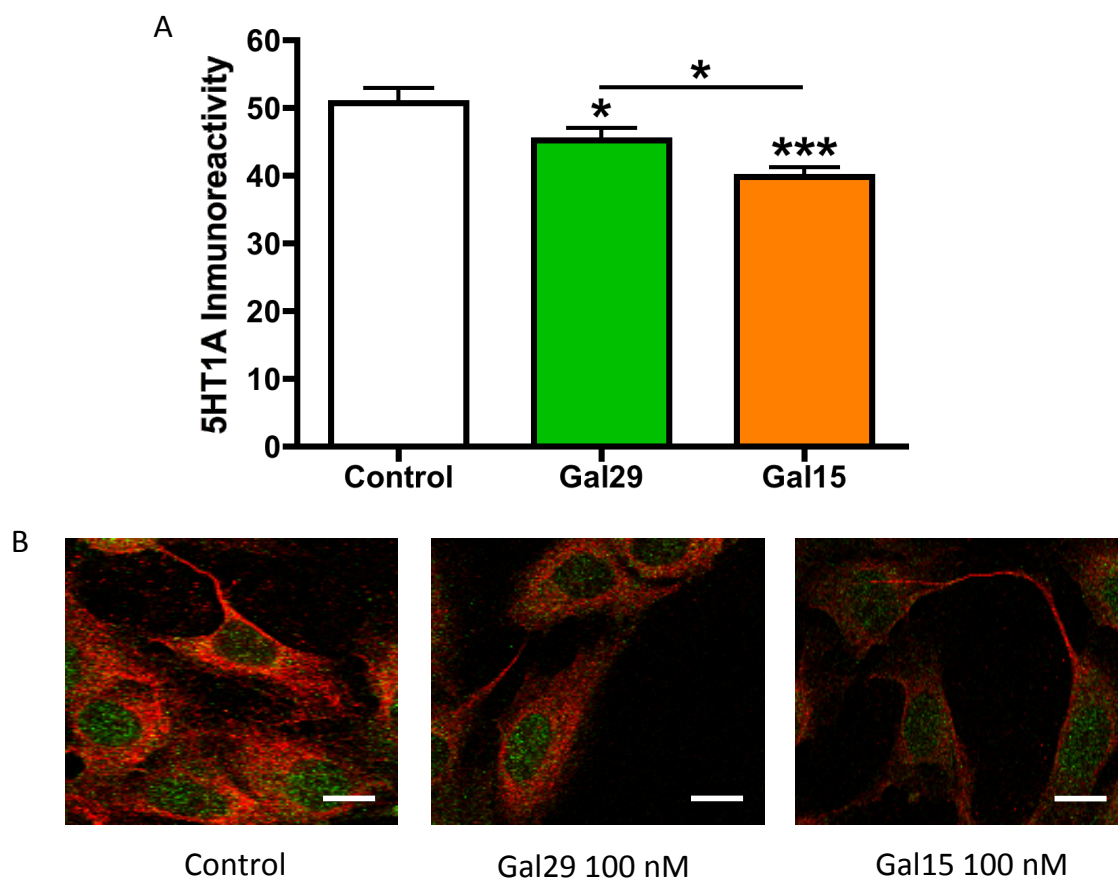


Figura 69. (A) Representación grafica de la inmunorreactividad del receptor 5HT1A (Unidades Arbitrarias), en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la incubación de GAL y GAL(1-15). El mantenimiento de las células en medio de cultivo fue utilizado como Control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ según ANOVA de una vía seguida de post-test de Newman-Keuls. (B) Fotografías representativas de la disminución de la inmunorreactividad de 5HT1A en los citoplasmas (rojo) de células RN33B, producida por la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15). El núcleo celular presenta inmunotinción contra la proteína C-Fos como se detalla en apartados anteriores de esta tesis. Barra de escala 10 μ m.

3.2 Cuantificación del receptor 5HT1A por *In cell western*.

Se cuantifica la expresión del receptor 5HT1A en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B tras la incubación del cultivo con GAL 100 nM o GAL(1-15) 100 nM. Para ello mide la inmunorreactividad del receptor 5HT1A empleando la técnica de *In cell western*.

Como se observa en la Figura 70A, hay una tendencia a la reducción de la inmunorreactividad de 5HT1A, comparado con los controles, tras la incubación con GAL. Sin embargo, tras la estimulación por GAL(1-15) si existe una reducción significativa ($p < 0.05$) respecto del grupo control de la inmunorreactividad del receptor 5HT1A. En la Figura 70B, se muestra una imagen representativa de la disminución de la inmunorreactividad de 5HT1A tras la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15).

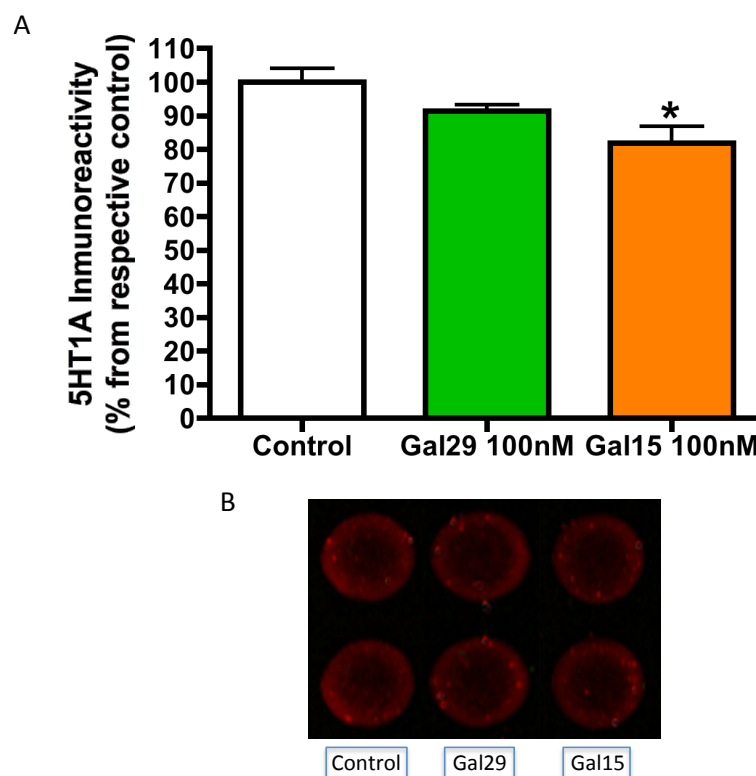


Figura 70. (A) Representación grafica de la inmunorreactividad del receptor 5HT1A (Unidades Arbitrarias), medida mediante *In cell western*, en células derivadas del núcleo del Rafe RN33B, tras la incubación de GAL y GAL(1-15). El mantenimiento de las células en medio de cultivo fue utilizado como Control. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media, del porcentaje de cambio respecto a sus respectivos controles. * $p < 0.05$ según el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de post-test de Dunn's. (B) Fotografías representativas de la disminución de la inmunorreactividad de 5HT1A en células RN33B, producida por la incubación del cultivo con GAL y GAL(1-15).

DISCUSIÓN

GAL(1-15)

1. Estudios de comportamiento animal.

Para conocer el papel del fragmento GAL(1-15) en la ansiedad y la depresión se administró icv GAL(1-15) a distintas dosis, y se comprobó su efecto en pruebas de comportamiento animal relacionadas con la ansiedad y la depresión, como son el test del campo abierto (Hall, 1934; Walsh, 1976; Karakas et al., 2011), el laberinto elevado en cruz (Pellow, 1986; Seillier et al., 2011), el test de la natación forzada (Porsolt et al., 1977; Porsolt et al., 1978; Detke y Lucki, 1996) y el test de evitación pasiva (Griebel et al., 1993; Charney, 2006).

El **test de la natación forzada** o test de Porsolt (Porsolt et al. 1977; Porsolt et al., 1978), es una de las pruebas de comportamiento más ampliamente utilizada para el ensayo de conducta depresiva y antidepresiva. Este test está basado en la conducta de desesperanza y se desarrolló como un modelo en roedores para predecir la eficacia clínica de sustancias antidepresivas (Bogdanova et al., 2013).

El test consiste básicamente en dos sesiones, en la primera el animal nada durante 15 minutos y constituye un estresor que lleva al animal a un estado de desesperanza (Porsolt et al., 1978) o a una actitud pasiva de afrontamiento del estrés (West, 1990). En la segunda sesión el animal realiza un test de 5 minutos donde se observa su comportamiento. El tiempo de inmovilidad es la principal medida de este test (Castagne et al., 2009), interpretándose como una conducta de desesperanza y por tanto de depresión. Esto se confirma farmacológicamente ya que un amplio rango de fármacos antidepresivos inyectados entre el pretest y el test decrece la duración de la conducta de inmovilidad en esta prueba (Cryan et al., 2005).

En el test de la natación forzada, la inyección icv del fragmento N-terminal GAL(1-15) a una dosis de 3 y 6 nmol, produce un aumento del tiempo de inmovilidad y una reducción del tiempo de escalada medido, lo que sugiere que la GAL(1-15) induce un efecto prodepresivo. Mientras que la administración de la dosis de 1nmol no modifica estos parámetros.

Algunos ejemplos de fármacos antidepresivos probados en el test de la natación forzada son el Citalopram, que pertenece al grupo de los SSRI y es utilizado rutinariamente en clínica (Cipriani et al., 2009, 2012) o la Fluoxetina, perteneciente al mismo grupo de antidepresivos, que administrada de forma crónica revierte la conducta depresiva en este test, decreciendo la inmovilidad e incrementando la conducta de escape (Chau et al., 2011). Ejemplos como estos apoyan la idea que la prueba de la natación forzada tiene validez farmacológica como modelo animal de depresión. El hecho que encontremos efecto con la GAL(1-15) en este test demuestra la importancia de la respuesta depresiva obtenida tras la administración del fragmento GAL(1-15).

El efecto de la *molécula completa de GAL* en el test de la natación forzada es bien conocido. En trabajos previos de otros autores donde se administraba GAL vía icv o directamente en el área tegmental ventral, se producía un aumento del tiempo de inmovilidad del animal durante el test, lo que indica un efecto prodepresivo, además este efecto fue bloqueado mediante antagonistas específicos de los receptores de GAL (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2007). Este mismo efecto ha sido reproducido en esta tesis mediante la administración icv de GAL 3nmol, lo que valida las condiciones empleadas y el modelo experimental.

Al comparar el efecto de la GAL(1-15) con la GAL en la prueba de la natación forzada, observamos que tanto la GAL como el fragmento GAL(1-15) producen un aumento del tiempo de inmovilidad y una reducción del tiempo de escalada, indicando un efecto prodepresivo de ambas, siendo el efecto producido por la GAL(1-15) significativamente más potente que el producido por la molécula completa. Mostrándose un claro efecto diferencial del fragmento GAL(1-15) con respecto a la GAL en la prueba de la natación forzada, ya que la GAL(1-15) produce un efecto más potente.

En relación con la ansiedad, se han desarrollado modelos animales para ensayar los parámetros comportamentales que indican ansiedad, uno de los más frecuentes son los modelos de ansiedad incondicionada, como es el caso del **test del campo abierto** (Hall, 1934; Walsh, 1976), donde al animal es expuesto a un nuevo ambiente representado por el aparato. El centro del aparato constituye un compartimento aversivo para el animal, ya que las ratas evitan los espacios abiertos de forma natural (Rodgers, 1997; Prut y Belzung, 2003), mostrando una preferencia innata por la periferia de la caja en comparación con la zona central, denominada tigmotaxia e interpretada como un comportamiento de ansiedad (Prut y Belzung, 2003).

La administración de GAL(1-15) a dosis de 3 nmol disminuye tanto el número de entradas como el tiempo en la zona central del campo abierto. La disminución de estos parámetros sugiere que la dosis de 3 nmol de GAL(1-15) tiene un efecto ansiogénico. Esta inyección de GAL(1-15) no produce ninguna afectación locomotora, por lo que la respuesta ansiogénica observada no se asocia a efectos locomotores.

El test del campo abierto ha demostrado ser muy útil en el estudio del comportamiento de ansiedad incondicionada y ha demostrado su correlato farmacológico, ya que fármacos clínicamente efectivos como son el Diazepan, agonista de los receptores GABA tipo A, o la Buspirona, agonista parcial de los 5HT_{1A}, muestran un aumento significativo del tiempo y número de entradas en la parte central del campo abierto (Siemiakowski et al., 2000; Prut y Belzung, 2003). La intensidad del efecto de la GAL(1-15) en este test, en este caso ansiogénico, es comparable con el de los fármacos ampliamente utilizados como ansiolíticos en la clínica.

Por el contrario, las dosis de GAL(1-15) de 1 y 6 nmol no modifican los parámetros analizados en el campo abierto. Sugiriendo que estas dosis no son efectivas en este modelo de ansiedad incondicionada. Esta respuesta en forma de U-invertida encontrada, es frecuente en la acción de algunos neuropéptidos, así se ha observado anteriormente en la GAL con las interacciones con el receptor α 2-adrenergico (Diaz-Cabiale et al., 2005) y con el Neuropéptido Y (Diaz-Cabiale et al., 2011), pudiendo explicarse mediante la posible desensibilización de los receptores de GAL a dosis más elevadas del péptido y la insuficiente concentración de ligando para estimular los receptores a dosis más bajas.

Cuando comparamos el efecto producido por la administración de la dosis efectiva de GAL(1-15) con la misma dosis de la molécula completa de GAL, se observa que mientras la GAL(1-15) disminuye los parámetros de número de entradas y tiempo en el centro del campo abierto, induciendo un efecto ansiogénico, la GAL no modifica estos parámetros (Narváez et al., 2014), careciendo de efecto en esta prueba. Por tanto existe un papel diferencial del fragmento GAL(1-15) con respecto a la molécula completa de GAL en el test del campo abierto.

Se ha visto que la GAL y sus receptores participan en la modulación de la respuesta a la ansiedad de distintas maneras (Wrenn y Holmes, 2006; Fuxe et al., 2012), dependiendo de la vía y sitio de administración, además de las condiciones de estrés previo (Holmes et al., 2003; Holmes y Picciotto, 2006). Como se muestra en estudios previos, la administración icv de GAL 3nmol no produce ningún efecto en los parámetros del test del campo abierto (Narváez et al., 2014), patrón que se reproduce en los resultados obtenidos en esta tesis. Esto además indica, la ausencia de condiciones estresantes en nuestro modelo, ya que la GAL produce efectos ansiolíticos sólo en animales testados bajo condiciones de estrés (Morilak et al., 2003; Barrera et al., 2005). Esto sugiere que la GAL(1-15) a diferencia de la molécula completa GAL, no necesita un estrés previo para ejercer su acción, lo que sugiere una acción más potente del fragmento que de la molécula completa.

En la prueba de **evitación pasiva**, la sesión de entrenamiento, presenta una gran similitud experimental con el test de la caja luz/oscuridad, prueba de conducta ampliamente utilizada como modelo animal de ansiedad (Campos et al., 2013). En esta, se permite al animal que explore entre dos compartimentos, uno oscuro y otro fuertemente iluminado, midiendo entre otros parámetros el tiempo que tarda en pasar por primera vez al compartimento oscuro, parámetro similar a lo que en esta tesis definimos como latencia de entrenamiento. Este test, se basa en la aversión innata del roedor a lugares altamente iluminados, generando un conflicto entre el instinto de exploración y su aversión a lugares iluminados (Crawley y Goodwin, 1980; Crawley et al., 1981). Tratamientos con fármacos ansiolíticos, como benzodiazepinas producen un incremento del tiempo empleado en la cámara iluminada, por lo que una disminución en el tiempo empleado en entrar en la cámara oscura reflejaría una conducta ansiogénica (Crawley y Goodwin, 1980; Crawley et al., 1981). En este test, al igual que otros donde la medida depende de la actividad exploratoria del animal, es muy importante comprobar que el efecto producido no es debido a un efecto producido por el fármaco administrado, de dicha actividad (Campos et al., 2013), cuestión que nosotros podemos descartar ya que ninguna de las dosis ensayadas de GAL(1-15) produce alteración de la actividad locomotora en el test del campo abierto.

En la sesión de entrenamiento de la prueba de evitación pasiva, la administración icv de GAL(1-15) a dosis de 3 y 6 nmol produce una disminución de la latencia de entrenamiento, parámetro que mide el tiempo que tarda el animal en entrar en la cámara oscura tras dos minutos en la cámara clara con fuerte iluminación, lo que podría sugerir un efecto ansiogénico, reforzando el papel ansiogénico mostrado por la GAL(1-15) en la prueba del campo abierto. Por el contrario la dosis de 1 nmol no resultó efectiva en este parámetro.

Existen estudios de otros autores en el que se realiza el test de evitación pasiva administrando GAL 3nmol vía icv, donde se observa que esta inyección por si misma no modifica la latencia de entrenamiento, careciendo esta dosis de GAL de efecto sobre este parámetro (Misane et al., 1998). Esto sugiere de nuevo un papel diferencial del fragmento GAL(1-15) con respecto a la molécula completa de GAL, donde la GAL(1-15) disminuiría la latencia de entrenamiento, por tanto mostraría un efecto ansiogénico, mientras que la molécula completa no presentaría ningún efecto. Además estos resultados estarían en concordancia con los resultados obtenidos en la prueba del campo abierto, donde la GAL(1-15) presenta un papel ansiogénico, mientras que la GAL no tiene efecto en esta prueba.

Respecto a los resultados obtenidos en la latencia de retención, parámetro medido durante la segunda sesión de la prueba de evitación pasiva, únicamente la dosis de GAL(1-15) 6 nmol fue capaz de modificar este parámetro, disminuyéndolo significativamente respecto a los controles. Las dosis de 1 y 3 nmol no resultaron efectivas en esta medida.

Estudios de otros autores demuestran que la administración de GAL 3 nmol no modifica significativamente la latencia de retención medida en un periodo máximo de 5 minutos, sin embargo si se observa una tendencia no significativa de la GAL a reducir esta latencia (Misane et al., 1998). Aunque los resultados obtenidos en esta tesis no son comparables con los de este autor, ya que el periodo de medida de la latencia de retención es de 10 minutos, la tendencia del fragmento GAL(1-15) coincidiría con la de molécula completa.

La administración de GAL(1-15) en el test del **laberinto elevado en cruz** no modificó los parámetros de este, así como tampoco produjo ninguna modificación en los parámetros de actividad locomotora, lo que sugiere que la GAL(1-15) en las dosis y condiciones empleadas no presenta efecto en este test.

La inesperada ausencia de efecto de la GAL(1-15) en esta prueba de comportamiento puede deberse a multitud de factores, de hecho la actividad basal de los animales en la prueba del laberinto elevado es determinada por varios factores entre los que se encuentran las condiciones de la jaula, niveles de iluminación, variaciones del ritmo circadiano, manipulación previa del animal entre otras (Campos et al., 2013), lo que demuestra la sensibilidad de la prueba ante factores ambientales. Por otro lado, algunas sustancias muestran un comportamiento diferente en distintos modelos animales de ansiedad, como es el caso del neuropéptido Relaxina-3, donde el ratón carente de este péptido muestra un robusto efecto ansiolítico en la prueba del laberinto elevado en cruz, sin embargo no muestra efecto alguno en las pruebas del campo abierto o de la caja luz/oscuridad (Watanabe et al., 2011). Otro caso ocurre con la benzodiacepina Clordiaxepoxida, la cual induce un efecto ansiolítico en ratones testados en la prueba del laberinto elevado en cruz, confirmando el efecto ansiolítico de las benzodiacepinas, sin embargo el mismo efecto no fue observado en ratones ensayados en el test de la caja luz/oscuridad, mostrando una diferencia entre ambos test (Clément et al., 2009). Estos resultados podrían sugerir que el test de la caja luz/oscuridad sería más relevante para detectar efectos ansiogénicos, mientras que la prueba del laberinto elevado en cruz sería mejor para medir efectos ansiolíticos (Clément et al., 2009). Esto podría explicar nuestros resultados, ya que la GAL(1-15) muestra un potente efecto ansiogénico en la prueba del campo abierto y en la disminución de la latencia de entrenamiento, en la evitación pasiva, que equivaldría al test de la caja luz/oscuridad, no observándose efecto de la GAL(1-15) en el laberinto elevado. Según esto y observándose diferentes resultados en la estimación de los

niveles de ansiedad en diferentes pruebas de comportamiento, algunos autores recomiendan, como se ha hecho en esta tesis, realizar una batería de test para la mejor evaluación de los niveles de ansiedad o sensibilidad al estrés emocional (Sudakov et al., 2013).

Como muestran nuestros resultados, el fragmento GAL(1-15) induce un potente efecto ansiogénico y prodepresivo, indicando por primera vez la implicación y el papel fundamental que juega el fragmento GAL(1-15) en los trastornos del estado de ánimo. Además se muestra un papel diferencial de la GAL(1-15) respecto a la molécula completa de GAL, produciendo un efecto ansiogénico y prodepresivo más potente que esta.

Este efecto diferencial del fragmento con respecto a la GAL ha sido mostrado en varios trabajos previos, donde la GAL(1-15) era capaz de modular los receptores postsinápticos 5HT1A en el hipocampo dorsal, mientras la molécula completa no producía modulación sobre estos receptores (Hedlund et al., 1994). Por otro lado, el fragmento N-terminal (1-16) de GAL reducía el reconocimiento del receptor 5HT1A postsináptico de una forma más potente que lo hacía la molécula completa de GAL en la corteza límbica ventral (Diaz-Cabiale et al., 2000).

Este papel diferencial de ambas moléculas también se pone de manifiesto a nivel de la regulación cardiovascular, donde por un lado el fragmento N-terminal GAL(1-15) antagoniza los efectos cardiovasculares producidos por la GAL y además la GAL(1-15) disminuye la sensibilidad del reflejo baroreceptor mientras que la molécula completa no tenía efecto (Diaz-Cabiale et al., 2005). La GAL(1-15) también interacciona de forma diferente que la GAL con otros receptores y neuropeptidos implicados en la función cardiovascular como son la Angiotensina o el Neuropeptido Y (Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2010). Por tanto nuestros resultados confirman que el fragmento GAL(1-15) presenta un papel específico en la comunicación en el SNC.

En relación a los receptores implicados en el efecto de la GAL(1-15), se ha comprobado que los tres subtipos de receptores de GAL clonados muestran una mayor afinidad por la GAL que por los fragmentos N-terminales como la GAL(1-15) (Branchcheck et al., 1998). Sin embargo, como se ha descrito en la introducción, existen lugares de unión específicos de alta afinidad para el fragmento GAL(1-15), como es el caso del hipocampo dorsal, el neocortex y el neocortecio, áreas donde los sitios de unión mostraron una alta selectividad por el fragmento GAL(1-15) y no por la GAL. En otros núcleos, como en el Rafe dorsal existe un solapamiento entre los sitios de unión de ambas moléculas (Hedlund et al., 1992). Basándonos en estas evidencias y ya que los receptores de GAL pueden interaccionar entre ellos o con receptores de otras familias

mediante la formación de homo y heterorreceptores (Fuxe et al., 2012), nuestra hipótesis para explicar el efecto diferencial de la GAL(1-15) con GAL es que el sitio de unión del fragmento N-terminal GAL(1-15) podía ser el heterómero formado por los receptores GALR1/GALR2, induciendo un cambio conformacional que produciría una alta especificidad para la GAL(1-15) con una marcada reducción de afinidad por la molécula completa (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012). Este posible mecanismo explicaría, como hemos descrito anteriormente, las respuestas funcionales entre ambas.

Para estudiar que subtipo de receptor de GAL está implicado en el efecto que presenta el fragmento GAL(1-15) en las pruebas de comportamiento animal, se utiliza el **antagonista de GALR2, M871**, en las pruebas del **campo abierto y la natación forzada**. Este antagonista es altamente específico para los receptores GALR2 ya que se une a este receptor 30 veces con más afinidad que a GALR1, indicando que es un ligando específico para GALR2 (Lang et al., 2007).

El antagonista M871, empleado en esta tesis, ha demostrado ser eficaz en antagonizar otras funciones en las que participa la GAL, como bloquear el dolor en un modelo nociceptivo en animales (Jimenez-Andrade et al., 2006), o bloquear el aumento, producido por la GAL a través de su receptor GALR2, en el efecto ansiolítico del receptor Y1 del NPY en pruebas de comportamiento animal (Narváez et al., 2014), en este último caso utilizado a una concentración de 3 nmol, la misma que se emplea en los experimentos de esta tesis.

En la prueba de la natación forzada, la administración del antagonista M871 sólo, no produce ninguna modificación en el tiempo de inmovilidad o escalada. Por lo que la dosis de M871 3nmol no resulta efectiva en la prueba de la natación forzada.

Sin embargo, la coadministración de la GAL(1-15) con el antagonista M871 bloqueó completamente el efecto prodepresivo producido por el fragmento GAL(1-15) tanto en el tiempo de inmovilidad como en el tiempo de escalada. Estos resultados demuestran la implicación del receptor GALR2 en el efecto de la GAL(1-15) en la prueba de la natación forzada.

El receptor GALR2 está implicado en mecanismos de efectos antidepresivos. En trabajos previos se muestra que el agonista de los receptores GALR2 AR-M1896 administrado vía icv en ratas, disminuye la inmovilidad en la prueba de la natación forzada indicando un efecto antidepresivo (Kuteeva et al., 2008b). De acuerdo con estos resultados, ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor GALR2 también disminuyen la inmovilidad en este test, mostrando una conducta antidepresiva (Le Maitre et al., 2011). Además el tratamiento crónico con el antidepresivo Fluoxetina, produce un aumento del RNAm del receptor GALR2, acompañado de un aumento en la

densidad del receptor en el núcleo dorsal del Rafe (Lu et al., 2005). Todos estos trabajos indican que el receptor GALR2 presenta una implicación en la depresión.

Nuestros resultados demuestran la importancia del receptor GALR2 en el efecto prodepresivo inducido por el fragmento GAL(1-15), dado que GAL(1-15) tiene menos afinidad por GALR2 que la GAL la acción de la GAL(1-15) no puede explicarse sólo por su efecto sobre GALR2. Nuestra hipótesis es que el bloqueo del receptor GALR2 impediría la funcionalidad del heterodímero GALR1/GALR2, lo que produciría el bloqueo del efecto producido por la GAL(1-15) observado.

Por otro lado, en el campo abierto, los resultados obtenidos muestran que la inyección del antagonista M871 sólo, a dosis de 3 nmol aumenta el número de entradas en la zona central del campo abierto, sin embargo el tiempo de permanencia en la zona central no fue modificado por este.

Aunque observamos un aumento en el número de entradas en la zona central, la inyección de M871 no afectó al tiempo de permanencia en esta zona en la misma prueba, parámetro principal en esta prueba, por lo que no podemos hablar de un efecto ansiolítico de este antagonista basándonos en sólo un parámetro. Además en otros estudios donde se utiliza este antagonista en la prueba del campo abierto, se muestra que el M871 no modifica ninguno de los dos parámetros en esta prueba (Narváez et al., 2014).

Nuevamente nos encontramos que el antagonista M871 fue capaz de bloquear el efecto ansiogénico de la GAL(1-15) en ambos parámetros de la prueba del campo abierto, demostrándose así la implicación del receptor GALR2 en el efecto del fragmento GAL(1-15) también en esta prueba.

El efecto específico del receptor GALR2 en la ansiedad aún no está bien caracterizado. De hecho, ratones carentes del receptor GALR2 muestran conducta ansiosa o no muestran ningún efecto dependiendo del fondo genético de los mutante (Bailey et al., 2007; Lu et al., 2008). Sin embargo nuestros resultados demuestran la importancia del receptor GALR2 en el efecto ansiogénico inducido por la GAL(1-15).

Estos resultados indican que el antagonista de los receptores GALR2 bloquea los efectos prodepresivos y ansiogénicos inducidos por el fragmento GAL(1-15) en las pruebas de la natación forzada y el campo abierto, lo cual puede ser explicado por nuestra hipótesis, ya que bloquearía el protómero GALR2 del heteroreceptor GALR1/GALR2 reduciendo la acción ejercida por la GAL(1-15).

Por tanto, nuestros resultados demuestran por primera vez que el fragmento N-terminal GAL(1-15) presenta un efecto ansiogénico y prodepresivo en modelos animales de comportamiento, mostrándose, además de forma más potente que la molécula completa de GAL. Esto indica un papel diferencial del fragmento respecto a la molécula completa, destacando la implicación del fragmento GAL(1-15) en los trastorno del estado de ánimo y validando además, la hipótesis de que la GAL(1-15) presenta un papel específico en la comunicación cerebral. Además hemos demostrado que los efectos ansiogénicos y prodepresivos del fragmento están mediados, al menos, por el receptor GALR2.

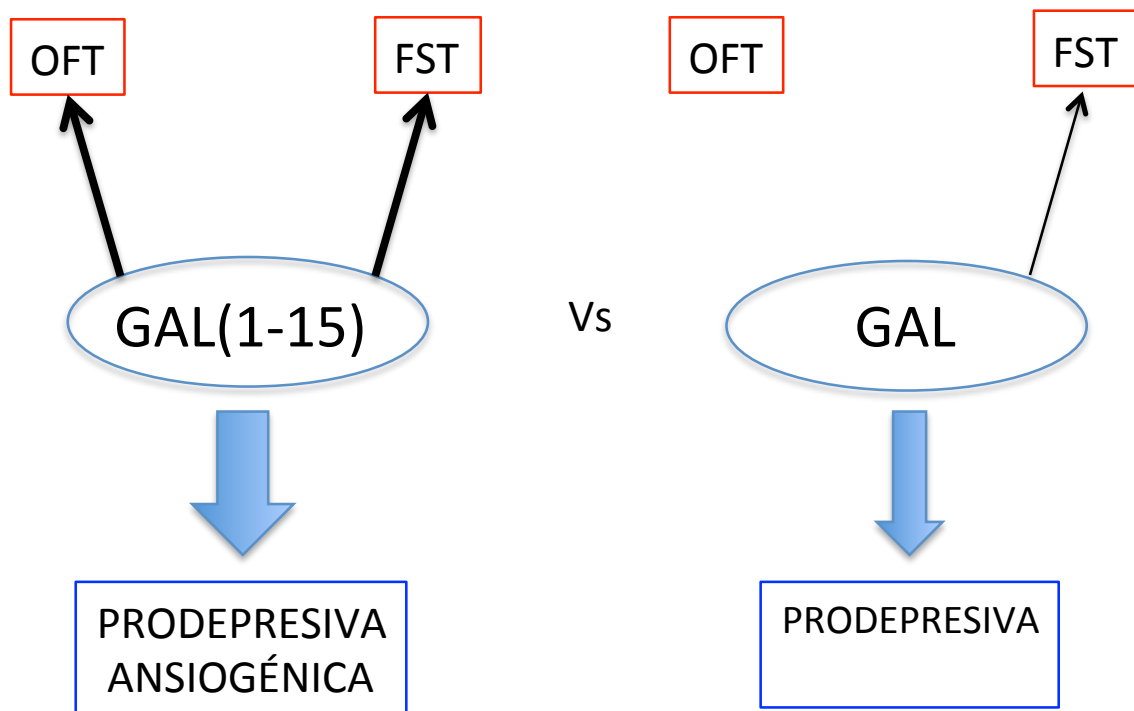


Figura 1. Esquema representativo del efecto del fragmento GAL(1-15) y la molécula completa GAL en las pruebas de comportamiento del Campo Abierto (del inglés, OFT) y la prueba de la Natación Forzada (del inglés, FST).

2. Técnicas inmunohistoquímicas y de ligazón por proximidad.

Para demostrar la existencia del heterodímero formado por los receptores GALR1/GALR2 (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012) estudiamos en secciones de cerebro de rata, si existe colocación de ambos receptores en núcleos claves en la depresión y la ansiedad como son el hipocampo dorsal (Nestler et al., 2002) y el núcleo dorsal del Rafe (Fuxe et al., 1998, 2008, 2012). Esta colocación celular de los receptores GALR1 y GALR2 es el primer paso para la demostración de la existencia del heterodímero propuesto GALR1/GALR2, ya que la colocación de los receptores en una misma neurona es fundamental para una posible interacción entre ambos (Fuxe et al., 2009; Fuxe y Kenakin, 2010; Kenakin et al., 2010).

La elección de los núcleos objeto de estudio se debe, a que tanto el hipocampo dorsal como el núcleo dorsal del Rafe están relacionados con los trastornos del estado de ánimo (Nestler et al., 2002; Fuxe et al., 1998, 2008, 2012). Además la GAL está presente tanto en el hipocampo dorsal como en el núcleo dorsal del Rafe (Skofitsch y Jacobowitz, 1985; Jacobowitz et al., 2004; Amaral y Lavanex, 2007) como se ha comprobado mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, colocándose en estos núcleos con la Serotonina, uno de los principales neurotransmisores implicados en la depresión (Carlsson et al., 1968). De hecho se ha descrito que una gran proporción de las neuronas serotoninérgicas del Rafe dorsal también contiene GAL, estando la GAL también presente en fibras serotoninérgicas en áreas diana del Rafe dorsal como es el hipocampo (Melander et al., 1986).

Otro motivo de elección de las zonas del hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe, es su relación con el fragmento N-terminal GAL(1-15), ya que uno de los lugares específicos de unión para el fragmento GAL(1-15), descritos mediante el marcaje directo del fragmento GAL(1-15) con I¹²⁵, es el hipocampo dorsal, donde además se presentaba una baja densidad de sitios de unión de la molécula completa, mientras que en el Rafe dorsal también existen lugares de unión específicos de la GAL(1-15) pero también de la GAL (Hedlund et al., 1992). Además, se observa que en el hipocampo dorsal únicamente el fragmento GAL(1-15), y no la molécula completa GAL, puede modular antagónicamente los receptores 5HT1A (Hedlund et al., 1994) lo que hace pensar que es una zona diana específica de la GAL(1-15).

Además de lo expuesto anteriormente, las pruebas de comportamiento en las que el fragmento GAL(1-15) ha demostrado tener un potente efecto, están relacionadas con las áreas del hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe. En la prueba de la natación forzada tanto el Citalopram como la Fluoxetina, ambos fármacos antidepresivos inhibidores de la recaptación de 5HT, han demostrado su eficacia (Cipriani et al., 2009, 2012; Chau et al., 2011), observándose efectos similares inyectando Fluoxetina directamente en el núcleo del Rafe (Baudry et al., 2010). En las pruebas utilizadas para medir el nivel de ansiedad, como el campo abierto y el laberinto elevado, agonistas de los receptores 5HT1A como la buspirona o el 8-OH-DPAT muestran un efecto ansiolítico (Siemiakowski et al., 2000; Prut y Belzung, 2003; Collinson et al., 1997), mientras que inyecciones directamente en el hipocampo y en la amígdala producen un efecto ansiogénico mientras que la inyección en el rafe produce el efecto contrario (Akimova et al., 2009), relacionando estos núcleos con las pruebas de conducta. Además, el test de evitación pasiva está relacionado directamente con el hipocampo (Razani et al., 2001; Makeda et al., 1984; Charney, 2006).

Mediante **técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia** simple demostramos en esta tesis la coexpresión y distribución de los receptores GALR1 y GALR2 en las zonas del hipocampo dorsal y núcleo dorsal del Rafe.

Con respecto al receptor **GALR1** observamos su expresión en células a nivel del hipocampo dorsal, incluyendo las distintas porciones del Cuerno de Ammon (CA1, CA2 y CA3) así como el Giro Dentado (DG). En el núcleo dorsal del Rafe (DR) también se observó señal específica del receptor GALR1. La localización del receptor fue generalmente citoplasmática centrándose en el soma celular, aunque también se observaba presencia del receptor en prolongaciones neuronales.

Como se describe en la literatura, el receptor GALR1 está ampliamente distribuido en el SNC, con una alta expresión entre otros núcleos en el hipocampo y en el núcleo dorsal del Rafe (Waters y Krause, 2000; Mitsukawa et al., 2010), coincidiendo con los resultados obtenidos en esta tesis y validando por tanto la especificidad del anticuerpo utilizado.

En el caso del marcaje sencillo del receptor **GALR2**, la distribución observada fue muy similar a la del receptor GALR1, pudiendo observarse señal del receptor en las zonas CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado del hipocampo dorsal, así como en el Rafe dorsal. Siendo la localización de GALR2 citoplasmática, concentrándose en los somas neuronales, observándose también la presencia en algunas fibras celulares.

Al igual que el receptor GALR1, la bibliografía indica que GALR2 está también ampliamente expresado en el SNC, encontrándose altos niveles de expresión en el hipocampo, particularmente en el Giro Dentado y en CA3, además encontrándose también presente en el núcleo del Rafe dorsal (O'Donnell et al., 1999; Waters y Krause, 2000; Mitsukawa et al., 2010), coincidiendo con la distribución encontrada en nuestros experimentos, lo que valida tanto las técnicas como el anticuerpo anti-GALR2 utilizado.

Aunque con estos experimentos demostramos la coexistencia de los receptores GALR1 y GALR2 en las áreas del hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe, es necesario demostrar la colocalización celular de ambos receptores para que fuera compatible con la hipótesis formulada del heterodímero GALR1/GALR2.

En los experimentos realizados con doble marcaje de los receptores **GALR1** y **GALR2**, se observa la colocalización celular de ambos receptores en los núcleos objeto de estudio, tanto en el hipocampo dorsal, en las zonas de CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado como en el núcleo del Rafe dorsal, coincidiendo con la coexistencia demostrada mediante los experimentos con marcajes simples.

La colocalización de los receptores GALR1 y GALR2 se observa a nivel citoplasmático con una fuerte señal de ambos en los cuerpos celulares, observándose también colocalización de ambos receptores en algunas fibras neuronales. La especificidad de la señal de estos experimentos de inmunofluorescencias dobles se demostró mediante el uso de controles primarios y mediante la observación de algunas células y fibras que sólo presentaban un único receptor, indicando que la señal obtenida de cada receptor era específica.

Estos resultados demuestran por primera vez, que existe una alta colocación celular de los receptores GALR1 y GALR2 en el hipocampo dorsal y en el núcleo dorsal del Rafe, núcleos que están implicados en los trastornos del estado de ánimo (Nestler et al., 2002; Fuxe et al., 1998, 2008, 2012) y que además presentan lugares de unión específicos para la GAL(1-15) (Hedlund et al., 1992).

Por tanto, estos resultados obtenidos serían compatibles con nuestra hipótesis, donde la GAL(1-15) se uniría preferentemente al heterodímero formado por los receptores GALR1/GALR2 (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012), ya que la colocación de los receptores en una misma neurona resulta imprescindible para una posible interacción entre ambos (Fuxe et al., 2009; Fuxe y Kenakin, 2010; Kenakin et al., 2010), y que podría explicar tanto el efecto ejercido por el fragmento GAL(1-15) como el papel diferencial con la molécula completa.

Mediante la **técnica de ligazón por proximidad (PLA)** estudiamos si los receptores GALR1 y GALR2, que colocan en las mismas neuronas, se encuentran en estrecha proximidad, entre 10 y 30nm, lo que sugeriría que ambos receptores están a una distancia que permite la formación de complejos heterodímeros (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2009; Borroto-Escuela et al., 2013).

Hasta los últimos años, los métodos que habían sido desarrollados para estudiar la interacción entre receptores en complejos heterodímeros requerían de construcciones genéticas para ser expresadas en células en cultivo, excluyendo así el estudio en tejido (Fuxe et al., 2012b; Borroto-Escuela et al., 2013). Ante este problema, el método de ligazón por proximidad se ha adaptado para el estudio de heterómeros, permitiendo la localización y el estudio de estos *ex vivo* (Borroto-Escuela et al., 2013).

Esta técnica de ligazón por proximidad ha sido utilizada por otros autores con el fin de detectar heterodimerización entre distintos tipos de receptores de membrana, como es el caso de la confirmación en el estriado del heterómero A2A-D2 (Trifilieff et al., 2011) o la interacción entre los receptores de serotonina 5HT1A y los receptores de factor de crecimiento FGFR1 (Borroto-Escuela et al., 2012b).

Nuestros resultados muestran que los receptores GALR1 y GALR2 se encuentran en estrecha proximidad en el hipocampo dorsal, en las zonas de CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado así como en el núcleo dorsal del Rafe, zonas donde observamos señal positiva de PLA, mostrada como puntos rojos. Además estas zonas coinciden con los núcleos donde existía colocación de ambos receptores, lo cual indica que no sólo colocan los receptores GALR1 y GALR2 en las mismas neuronas sino que se encuentran a una distancia muy próxima, lo que les permitiría interactuar formando un heterodímero (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2009).

La técnica de ligazón por proximidad, además de permitirnos la detección de complejos heterodímeros y hacer un análisis cualitativo mediante la localización en tejido, nos permite hacer un estudio cuantitativo de los complejos heterodímeros en los distintos núcleos (Borroto-Escuela et al., 2012b; Borroto-Escuela et al., 2013). Donde en nuestro caso, pudimos observar que la cantidad de complejos GALR1/GALR2 detectados en el hipocampo dorsal era prácticamente constante en las distintas zonas medidas, como CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado, sin embargo la cantidad de complejos GALR1/GALR2 detectados en la células del Rafe Dorsal eran significativamente superior al número detectado en el Hipocampo. Lo que indica que el heterodímero GALR1/GALR2 se forma en ambas zonas, pero en un mayor número en el Rafe dorsal.

Existen varias maneras para la comprobación de la especificidad de la señal obtenida de PLA, una sería el análisis de zonas que en las que no se expresa alguna de las proteínas detectadas o donde las proteínas hayan reducido su expresión mediante, por ejemplo, el uso de silenciamiento génico por siRNA (Borroto-Escuela et al., 2013). Para la comprobación de la especificidad de la señal de PLA de nuestros experimentos se analizó el área del Cuerpo Caloso, área que carece del receptor GALR2 (O'Donnell et al., 1999), no observándose complejo GALR1/GALR2, además tampoco se observó señal PLA en la capa molecular del Giro Dentado confirmando la especificidad de la señal.

Por tanto, nuestros resultados muestran por primera vez la existencia de complejos heterodímeros GALR1/GALR2 en tejido. Estos heterodímeros se situarían en zonas, donde anteriormente demostramos que existía colocalización entre ambos receptores, como son el hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe y que están altamente relacionadas con la depresión y la ansiedad (Nestler et al., 2002; Fuxe et al., 1998, 2008, 2012), zonas, donde además, se han descrito lugares de unión específicos para el fragmento GAL(1-15) (Hedlund et al., 1992), coincidiendo con la hipótesis inicial que la GAL(1-15) actuaría a través del heterodímero GALR1/GALR2. Además el número de complejos GALR1/GALR2 detectados sería mayor en el núcleo dorsal del Rafe que en el hipocampo dorsal, lo que sugeriría que aunque la GAL(1-15) podría actuar sobre ambas áreas, su principal diana sería el Rafe dorsal.

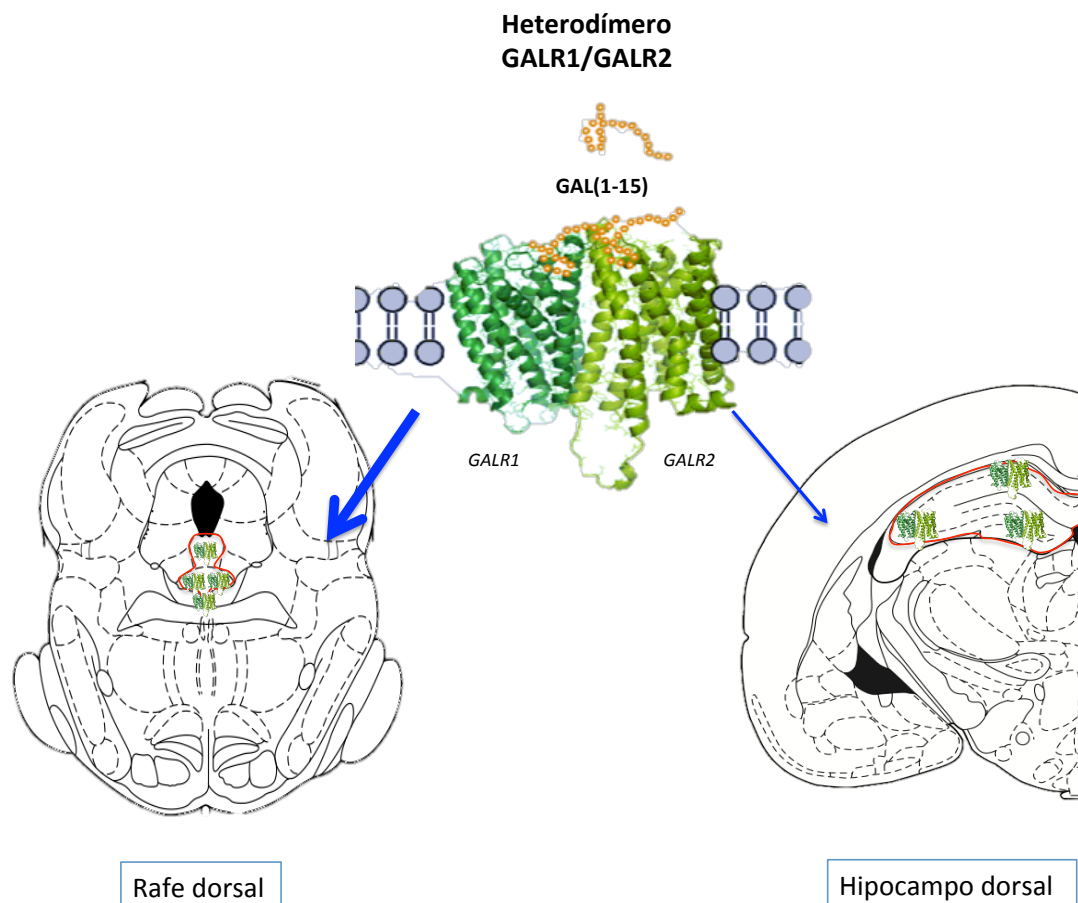


Figura 2. Esquema representativo del Heterodímero formado por los receptores GALR1 y GALR2, así como su localización en tejido en el Hipocampo dorsal y en mayor número en el núcleo del Rafe dorsal. Modificado de Fuxe et al., 2012.

3. Animales KnockDown GALR2: Bloqueo del heterodímero GALR1/GALR2.

Tras la demostración de la existencia del heterodímero GALR1/GALR2 en el hipocampo dorsal y en el núcleo del Rafe dorsal, lo cual concordaría con nuestra hipótesis de que el fragmento GAL(1-15) ejerce su acción a través de este, generamos un modelo animal con una expresión reducida del receptor GALR2 (KnockDown) con el objetivo de analizar el efecto producido por la GAL(1-15) en las pruebas de comportamiento así como analizar la cantidad de heterodímeros GALR1/GALR2 en los núcleos estudiados.

El silenciamiento génico a través de ARN pequeño de interferencia (siRNA) es un método para la inhibición de la expresión de genes diana y así inducir un descenso en la expresión de la proteína asociada tanto *in vitro* como *in vivo* (Akhtar y Benter, 2007; de Fougérolles et al., 2007; Elbashir et al., 2001; Shim y Kwon, 2010; Kole et al., 2012; Nakajima et al., 2012). Estos siRNA han sido aplicados en investigación y son considerados como una potente herramienta clínica en el tratamiento de

enfermedades, incluyendo trastornos neuropsiquiátricos (Akhtar y Benter, 2007; Chen y Zhaori, 2011). Desafortunadamente, los siRNA generalmente no son lo suficientemente estables para ejercer su acción *in vivo* ya que son rápidamente degradados por endo y exonucleasas (Shim y Kwon, 2010). Inyecciones directas de siRNA desnudos en el SNC han demostrado un silenciamiento génico eficaz, pero solamente en los alrededores de la inyección y no en lugares más alejados (Jean et al., 2007; Lingor et al., 2005; Makimura et al., 2002; Manrique et al., 2009). Por eso se han desarrollado varios sistemas de administración de estos siRNA incluyendo liposomas, virus y modificaciones químicas entre otros (Nakajima et al., 2012).

Para la **generación de los animales KnockDown GALR2** usamos el sistema Accell siRNA desarrollado por Thermo Scientific Dharmacon, el cual presenta una modificación química que le permite la entrada a la célula sin necesidad de reactivos de transfección, lo cual evita la toxicidad celular (Baskin et al., 2008), y hace al siRNA resistente durante un tiempo a las endo y exonucleasas. El sistema Accell siRNA ha sido ampliamente usado por otros autores en cultivos celulares, demostrando ser eficaz en el silenciamiento de los genes diana *in vitro* (Dolga et al., 2008; Dreses-Werringloer et al., 2008; Sebeo et al., 2009; Suzuki et al., 2010). Algunos autores han utilizado este sistema también *in vivo*, administrándolo vía intravenosa o intranasal (Bonifazi et al., 2010; Difeo et al., 2009) o la administración directa en cerebro vía icv (Nakajima et al., 2012).

La administración icv mediante una sola inyección ha demostrado ser eficaz en la liberación y silenciamiento génico mediante el sistema Accell siRNA en cerebro de rata adulta, además se ha comprobado que su distribución es amplia mostrando reducción de expresión en hipocampo, corteza, sustancia negra y cerebelo indicando que la inyección icv de Accell siRNA es un potente sistema *in vivo* capaz de inducir la incorporación en varios tipos de células en diversas regiones del cerebro (Nakajima et al., 2012). Siendo además un sistema específico de reducción de expresión de proteínas en neuronas, ya que no se incorpora en células gliales (Nakajima et al., 2012).

La administración icv es la elegida para la realización del knockdown GALR2, ya que es la misma vía de administración del fragmento GAL(1-15), además como la generación del modelo de silenciamiento de GALR2 se realizaría mediante una inyección única del siRNA en el momento de la implantación de la cánula, el modelo sería compatible con la realización de pruebas de comportamiento animal, sin influencia de la cirugía ni la inyección.

Para efectuar la comprobación del modelo KnockDown GALR2, se utilizó la **técnica de RT-PCRq** para evaluar los **niveles de mRNA** del receptor en hipocampo dorsal, tras la administración del Accell siRNA GALR2 (de la Monte et al., 2011). Estos experimentos mostraron una máxima reducción del mensajero de GALR2 en el día 4 tras la inyección, manteniéndose ese nivel mínimo hasta el día 6 donde a partir de ese punto irían volviendo progresivamente los niveles de mRNA hasta los niveles iniciales.

Esto indicaría que el sistema Accell siRNA GALR2 es eficaz en el silenciamiento génico del receptor GALR2, produciendo una reducción de su RNA mensajero, y que además esta reducción la detectamos en el hipocampo dorsal, núcleo objeto de estudio, por lo que la distribución del sistema Accell siRNA sería válido para nuestros experimentos.

Para la determinación directa de los **niveles de expresión de proteínas GALR2** tras la inyección del Accell siRNA, utilizamos la **técnica de inmunohistoquímica** (Nakajima et al., 2012) frente a otras como pueden ser el western blot o ELISA (de la Monte et al., 2011; Nakajima et al., 2012), ya que la inmunohistoquímica permite cuantificar la expresión de la proteína además de poder localizar esta expresión anatómicamente en el tejido.

Mediante la inmunohistoquímica se realiza una curva de tiempo del receptor GALR2, con el objetivo de ver el día de mínima expresión del receptor en la zona CA1 en el hipocampo dorsal, uno de los núcleos estudiados en esta tesis y en la corteza piriforme, área alejada del ventrículo donde nos permitirá comprobar si la distribución del siRNA es buena, observándose una reducción del receptor GALR2 en CA1 en torno al 35% el día 8 tras la inyección del siRNA, esta reducción se mantiene hasta el día 12 restableciéndose los niveles normales posteriormente. En la corteza piriforme la máxima reducción de la expresión de la proteína también fue el día 8 con un 50% de reducción, restableciéndose los niveles de proteína progresivamente desde este punto.

Con la disminución de la expresión de GALR2 mediante inmunohistoquímica, no sólo mostramos la validez del siRNA (Nakajima et al., 2012) sino que también demostramos la validez y especificidad del anticuerpo utilizado, ya que la comprobación de los anticuerpos en animales knockdown es uno de los métodos para demostrar su selectividad (Michel et al., 2009).

De esta manera comprobamos que el sistema Accell siRNA empleado no sólo reduce los niveles de RNA mensajero del receptor GALR2 sino que también reduce la expresión de proteínas de una manera significativa en núcleos como el hipocampo dorsal estudiado en esta tesis y en zonas alejada del lugar de inyección mostrando que presenta una amplia distribución, lo que concuerda con estudios previos (Nakajima et al., 2012). Además esta máxima reducción se produciría en torno al octavo día tras la inyección, lo que permite que el animal tenga un postoperatorio normal, lo que posibilita la realización posterior de pruebas de comportamiento. Por tanto el sistema Accell siRNA se muestra como un sistema efectivo para la generación de animales KnockDown del receptor GALR2 y que además nos posibilita la realización de estudios de comportamiento con estos animales.

Basándonos en las curvas de tiempo de expresión de GALR2 realizadas anteriormente, los animales knockdown GALR2 realizan las pruebas de comportamiento el día 7 el test del campo abierto y el día 9 el test de la natación forzada, periodo en el que el receptor se encuentra en una mínima expresión.

En estos **experimentos de conducta** se utilizó como control animales tratados con Accell siRNA Control, el cual no presenta ninguna diana génica, para descartar que el sistema Accell siRNA empleado tuviera algún efecto sobre las pruebas de comportamiento (Nakajima et al., 2012), mostrando un comportamiento similar en los test que los controles inyectados con LCRa o Vehículo.

En la prueba del campo abierto los animales knockdown GALR2 no mostraron diferencias en los parámetros analizados tras la administración del fragmento GAL(1-15) lo que muestra que la ausencia del receptor GALR2 produce un bloqueo del efecto ansiogénico mostrado por la GAL(1-15) en animales normales. De la misma forma, en la prueba de la natación forzada, donde el fragmento GAL(1-15) había mostrado un potente efecto prodepresivo, no parecía tener ningún efecto en animales con una expresión reducida del receptor GALR2, mostrando la importancia de este receptor en el efecto producido por la GAL(1-15).

Por tanto, estos resultados demuestran que la reducción del receptor GALR2 bloquea el efecto ansiogénico y prodepresivo producido por el fragmento GAL(1-15), de igual manera que lo hace el M871, antagonista específico de los receptores GALR2 (Lang et al., 2007). Mostrando que el GALR2 está directamente involucrado en el efecto producido por la GAL(1-15), siendo compatible con la hipótesis del heterodímero GALR1/GALR2.

Con el tejido obtenido de los animales KnockDown GALR2 tras la realización de la pruebas de conducta, en los que se bloquea el efecto del fragmento GAL(1-15), se realizó en primer lugar una comprobación mediante, **inmunofluorescencia doble GALR1-GALR2**, de la reducción de la presencia de GALR2. Observamos claramente una menor marca de GALR2 en el hipocampo dorsal y en el Rafe dorsal, reduciéndose por tanto la colocalización con GALR1, y mostrándose una expresión de este normal, por lo que el silenciamiento génico de GALR2 no afectaría a la expresión del receptor GALR1.

Además con secciones de estos mismos animales, se realizó una **cuantificación de los heterodímeros GALR1/GALR2, mediante ligazón por proximidad** (Borrito-Escuela et al., 2013), en áreas objetos de estudio en esta tesis como el hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe, lugares donde previamente hemos demostrado presencia de estos heterodímeros.

En el hipocampo dorsal encontramos una importante reducción del número de heterodímeros GALR1/GALR2 llegando al 40% en CA1, pero en el núcleo dorsal del Rafe, zona donde la existencia de heterodímeros había sido muy superior, la reducción llega hasta el 60%. Por lo que podemos sugerir que los efectos producidos por el fragmento GAL(1-15) pueden estar mediados por el heterodímero GALR1/GALR2, ya que al disminuir el número de receptor GALR2 mediante silenciamiento génico reducimos el número de heterodímeros GALR1/GALR2 formados y por tanto el sitio de unión del fragmento GAL(1-15), además observamos que la principal diana de este fragmento sería el núcleo del Rafe dorsal.

Por tanto, estos resultados nos ayudan a contrastar nuestra hipótesis ya que mostramos la presencia del heterodímero GALR1/GALR2 en núcleos clave para la depresión y ansiedad como son el hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe (Nestler et al., 2002; Fuxe et al., 1998, 2008, 2012), lugares donde además se ha demostrado la existencia de sitios de unión específicos para el fragmento GAL(1-15) (Hedlund et al., 1992) y bloqueamos el efecto del fragmento mediante la reducción del heterodímero GALR1/GALR2, con una mayor magnitud en el núcleo del Rafe dorsal, lo que nos hace pensar que el efecto de la GAL(1-15) se produce principalmente en ese núcleo.

4. Cultivos celulares: Mecanismo de acción del heterodímero GALR1/GALR2.

Tras relacionar, los resultados prodepresivos y ansiogénicos del fragmento GAL(1-15) obtenidos en las pruebas de comportamiento animal con la existencia del heterodímero GALR1/GALR2, determinamos en células en cultivo el mecanismo de acción celular del heterodímero GALR1/GALR2, mediante el estudio del patrón de internalización de los receptores GALR1 y GALR2 tras la estimulación con el fragmento GAL(1-15) así como la molécula completa GAL.

Además en células serotoninérgicas en cultivo, procedentes del núcleo del Rafe, analizaremos como afecta la GAL(1-15) a la activación celular así como a la liberación de 5HT.

Patrón de internalización de los receptores GALR1 y GALR2

Los Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs), tras la estimulación por un ligando, son internalizados e integrados en una serie de compartimentos endosomales que van a determinar el destino del receptor (Ferguson et al., 2001; Fichter et al., 2010). Los receptores de membrana son internalizados en vesículas endocíticas las cuales son sujeto de dos destinos diferentes, un destino es la ruta de reciclaje, donde se restauran los receptores en la membrana plasmática de nuevo, produciendo una resensibilización del receptor. La otra ruta posible es la vía de degradación, donde los receptores son transportados a lisosomas y proteolizados, produciendo una regulación por disminución de receptor (Marchese et al., 2003; Fichter et al., 2010). En general, los GPCRs pueden ser divididos en dos grupos: los receptores que rápidamente entran en ruta de reciclaje y los que entran en ruta de degradación. Hay receptores que se reciclan eficientemente como el β_2 AR o el receptor de Neurokinina-1 y otros como el PAR1 o el δ -opioide que se degradan rápidamente (Marchese et al., 2003), pero parece que la decisión de la ruta que debe tomar el receptor ocurre en los endosomas tempranos, lugar donde se segregan las vesículas que contiene los receptores para el reciclaje o para la degradación (Sachse et al., 2002). El conocimiento del tráfico vesicular de los GPCRs es crítico para la comprensión total de la regulación de la señal de los receptores (Sorkin et al., 2009; Polo et al., 2006; Murphy et al., 2009).

Existen numerosos modelos *in vitro* que usan células no nerviosas transfectadas con receptores normales o mutados, donde tras la activación mediante agonistas de los receptores, se produce la modificación de la localización subcelular del receptor, dirigiendo al receptor hacia el reciclaje o la degradación, definiendo finalmente la abundancia del receptor en la membrana (Bloch et al., 1999). Además estos eventos pueden ser directamente visualizados y analizados con una muy buena resolución celular y subcelular mediante microscopía confocal (Bloch et al., 1999), lo que hace a estos modelos muy útiles para el estudio del tráfico vesicular de receptores.

En esta tesis hemos utilizado un modelo de célula no nerviosa, HEK293, en la que se han transfectado los receptores GALR1 clonado con YFP y el receptor GALR2, realizando el seguimiento intracelular del receptor GALR1 mediante la visualización de la proteína YFP.

Los resultados muestran que en células donde únicamente se expresa el receptor **GALR1** la estimulación con la molécula completa de GAL produciría una internalización rápida del receptor hasta los 30 minutos a partir de donde empezaría a disminuir. Mientras que tras la estimulación con GAL(1-15) la internalización se produce con un retraso respecto a la molécula completa llegando al punto máximo a los 60 minutos.

Estudios previos de otros autores demuestran en células PC12 transfectadas con el receptor GALR1, que tras la estimulación con GAL, se produce una rápida internalización tras 10 minutos de la estimulación, disminuyendo esta a los 45 minutos (Xia et al., 2008), lo que concordaría con los resultados obtenidos en células HEK293 en esta tesis, validando el método utilizado. Sin embargo otros tipo de células como las CHO muestran la máxima internalización del receptor tras la estimulación con GAL a los 60 minutos, sin haber medido ningún tiempo previo, manteniéndose esta hasta los 120 minutos (Wirz et al., 2005), lo que puede sugerir una variación en el patrón de internalización dependiente del tipo celular empleado.

El retraso en la internalización, sufrido tras la estimulación con la GAL(1-15), con respecto a la GAL podría deberse a la baja afinidad que presenta este receptor por la GAL(1-15) (Branchek et al., 2000), lo cual disminuiría la estimulación de GALR1.

En células HEK293, donde se coexpresan los receptores **GALR1 y GALR2**, observamos que tras la estimulación con la molécula completa de GAL apenas se produce internalización del receptor GALR1, sin embargo tras la estimulación con la GAL(1-15) se produce una fuerte internalización que perdura durante los 120 minutos registrados.

Estos resultados respaldarían nuestra hipótesis del heterodímero GALR1/GALR2, donde el fragmento GAL(1-15) se uniría preferentemente a este dímero (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012) estimulándolo y por tanto induciendo su internalización, mientras que el heterodímero GALR1/GALR2 no sería diana de la molécula completa de GAL y por tanto esta no induciría a su internalización. La co-internalización de heterodímeros de receptores es un fenómeno observado anteriormente por otros autores, como en el caso del heterodímero formado por los receptores A_{2A}/D_2 (Borroto-Escuela et al., 2011) o del heterodímero 5HT1A/5HT7 (Renner et al., 2012), donde se muestra que la heterodimerización altera el perfil de internalización de los receptores independientes (Renner et al., 2012).

Existen distintas formas de estudiar el **tráfico vesicular** de los receptores internalizados, en esta tesis se ha realizado mediante el estudio de proteínas implicadas en este tráfico, como son la proteína GTPasa Rab5 (Borroto-Escuela et al., 2012b) o la proteína LAMP1 (Fichter et al., 2010; Trivedi et al., 2012).

Dentro de la familia de proteínas GTPasas Rab, existen distintas proteínas implicadas en la endocitosis y tráfico de GPCRs entre endosomas tempranos, tardíos y lisosomas (Zerial y McBride, 2001; Magalhaes et al., 2012). La primera indicación de que las proteínas Rab podían interactuar directamente con los GPCRs, fue con la identificación de la proteína Rab5, la cual interactuaba con el receptor AT_{1A} , jugando un papel en la formación, tráfico y fusión de vesículas recubiertas por Clatrina con endosomas tempranos (Magalhes et al., 2012). Por tanto, Rab5 es uno de los miembros más estudiados de la familia de GTPasas Rab, donde estudios funcionales indican que Rab5 es clave en la regulación de la endocitosis temprana, donde está implicada en la formación de vesículas de Clatrina y su fusión con endosomas tempranos (Bliek, 2005; Haas et al., 2005), pudiéndose utilizar como marcador de endosomas tempranos (Borroto-Escuela et al., 2012b).

El destino intracelular final de muchos receptores es la degradación en los lisosomas, en la llamada ruta de degradación (Marchese et al., 2003), por eso una forma de conocer esta ruta es mediante el estudio de la formación de lisosomas a través de la Proteína Asociada a Membrana de Lisosoma (LAMP1) (Fichter et al., 2010; Trivedi et al., 2012) que es una de las proteínas más abundantes en la superficie de los lisosomas (Eskelinen, 2006).

En esta tesis hemos realizado experimentos en los que se han estudiado las **proteínas Rab5 como marcador de endosomas tempranos** (Borroto-Escuela et al., 2012) y **LAMP1 como marcador de lisosomas** (Fichter et al., 2010), en células transfectadas con los receptores GALR1, GALR2 o ambos.

Los resultados muestran que en células transfectadas únicamente con el receptor **GALR1** y tras la estimulación con GAL, el patrón de formación de endosomas tempranos es parecido al de internalización obtenido anteriormente, donde se ve que va aumentando levemente hasta los 30 minutos disminuyendo a partir de aquí. Sin embargo el número de lisosomas formados es muy alto, permaneciendo elevado en todo el tiempo de registro. Por el contrario tras la estimulación con el fragmento GAL(1-15), la formación de endosomas tempranos sufre un retraso con respecto a la molécula completa, al igual que ocurre en la internalización, observándose un efecto similar a la GAL en la formación de lisosomas pero con un menor número de estos.

Estos resultados sugieren en primer lugar que la GAL induce la internalización del receptor GALR1 y que al generarse vesículas donde está presente la proteína Rab5, la internalización se produciría mediante la formación de vesículas recubiertas con Clatrina (Bliek, 2005; Haas et al., 2005), coincidiendo con estudios previos, donde se demuestra que la internalización del receptor GALR1 se produce mediante vesículas recubiertas por Clatrina (Xia et al., 2008). Por otro lado, la intensa aparición de lisosomas tras la internalización del receptor indica una alta degradación de GALR1 tras su estimulación, incrementándose la vía de degradación con respecto a la vía de reciclaje del receptor. Estudios anteriores de otros autores muestran la intensa colocalización de GALR1 con marcadores lisosomales como Lyso-Tracker indicando que una cantidad significativa de GALR1 internalizado es transportado a lisosomas para su degradación (Xia et al., 2008), coincidiendo con los resultados de nuestros experimentos. Además, estos resultados explicarían la desensibilización a largo plazo observada en neuronas del locus coeruleus en la hiperpolarización producida por GAL a través de GALR1 (Xu et al., 2005).

Con respecto al retraso sufrido en la formación de endosomas tempranos y en la menor cantidad de lisosomas formados tras la estimulación con la GAL(1-15) respecto a la GAL, concordaría con los resultados de internalización obtenidos previamente, pudiendo explicarse de igual forma, basándonos en la baja afinidad de la GAL(1-15) por el receptor GALR1 con respecto a la GAL (Branchek et al., 2000), lo que produciría una menor estimulación del receptor, resultando en una menor internalización y por tanto una menor cantidad de lisosomas.

En los experimentos realizados en células transfectadas con el receptor **GALR2**, podemos observar que tras la estimulación de GAL y GAL(1-15) se produce la aparición de vesículas que presenta la GTPasa Rab5, indicando, que al igual que GALR1, el receptor GALR2 se internaliza mediante vesículas recubiertas por Clatrina (Bliek, 2005; Haas et al., 2005), concordando con estudios previos (Xia et al., 2004; Xia et al., 2005). Por otro lado, observamos que la formación de endosomas tempranos tras la estimulación de GAL y también de GAL(1-15) sigue un patrón similar, teniendo un pico máximo a los diez minutos, lo que estaría de acuerdo con otros estudios realizados en células PC12, donde se observa una internalización de GALR2 dosis-dependiente muy temprana, sobre los 2-3 minutos tras la estimulación con GAL, llegando a un máximo a los 15 minutos (Xia et al., 2004; Xia et al., 2005). La similitud de efecto entre la GAL y la GAL(1-15) podría deberse a que el receptor GALR2 posee una alta internalización independiente de ligando, internalización constitutiva (Xia et al., 2004), que podría ser una parte importante de la observada en nuestros experimentos pudiendo enmascarar los resultados. Además la máxima internalización del receptor se produciría en rangos de concentración micromolar del ligando (Xia et al., 2004), habiendo usado nosotros concentraciones en el rango nanomolar, muy inferiores.

Por otro lado, en las células estimuladas con GAL, se observa una leve aparición de lisosomas, coincidiendo con el punto de máxima internalización, lo que sugiere que el receptor internalizado no es en su mayoría degradado, por lo que podríamos pensar en que el receptor una vez internalizado optaría por la vía del reciclaje volviendo de nuevo a exponerse en la membrana plasmática (Bliek, 2005; Haas et al., 2005), esto es coherente con resultados de otros autores que muestran que el receptor GALR2 presenta un alto reciclaje tras su internalización, al colocalizarse en vesículas que contienen transferrina (Xia et al., 2004), molécula que selectivamente se dirige a vesículas de reciclaje, representando un marcador estable de este tipo de vesículas y que ha sido ampliamente utilizado en estudios de la ruta de reciclaje de receptores (Xia et al., 2004). Sin embargo, tras la estimulación con GAL(1-15) aparece una cantidad mayor de lisosomas, lo cual sugiere que los receptores GALR2 estimulados con el fragmento GAL(1-15) se dirigen a la degradación en lisosomas y no a reciclaje como se ha establecido que lo hacen habitualmente.

Finalmente, estudiamos el tráfico vesicular en células que coexpresan los receptores **GALR1 y GALR2**, observándose que tras la estimulación con el fragmento GAL(1-15) se produce un aumento significativo del número de vesículas que presentan la proteína Rab5, mientras que la molécula completa GAL, no induce este tipo de vesículas. Estos resultados sugieren que es el fragmento GAL(1-15) y no la molécula completa la que induce la internalización del heterodímero GALR1/GALR2, coincidiendo con los resultados previos obtenidos en los experimentos de internalización, respaldando así la hipótesis de que el fragmento GAL(1-15) actuaría a través de este heterodímero (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012). Además, ya que la internalización del heterodímero GALR1/GALR2 inducida por la GAL(1-15) formaría vesículas que presentan Rab5, podríamos pensar que al igual que los receptores GALR1 y GALR2 por separado, se internalizaría mediante vesículas recubiertas por Clatrina (Bliet, 2005; Haas et al., 2005).

Por otro lado, al analizar el número de lisosomas, podemos ver que el fragmento GAL(1-15) induce relativamente pocos de estos orgánulos, por lo que el dímero no está siendo degradado en los lisosomas, indicando que los heterodímeros internalizados tras la estimulación por la GAL(1-15) están, en su mayor parte, siguiendo la ruta de reciclaje produciendo una reexposición del heterodímero en la membrana (Bliet, 2005; Haas et al., 2005) y por tanto pudiendo ser estimulados de nuevo por la GAL(1-15) lo que produciría un efecto más intenso de esta.

Por tanto estos experimentos no sólo validan nuestra hipótesis inicial de que el fragmento GAL(1-15) tendría preferencia por el heterodímero GALR1/GALR2, ya que es el fragmento y no la molécula completa, quien induce la internalización del heterodímero, sino que nos sugieren un posible mecanismo por el cual el fragmento GAL(1-15) tendría un efecto prodepresivo y ansiogénico más potente que la GAL. El heterodímero GALR1/GALR2, tras su estimulación por la GAL(1-15), se reexprondría en la membrana de nuevo, pudiendo ser reestimulado, ya que el papel del reciclaje es el mantenimiento de los niveles de receptores en la superficie de la membrana (Xia et al., 2004), produciendo una potente acción. Por otro lado, como muestran estudios previos de otros autores, el efecto prodepresivo producido por la GAL, que parece que es principalmente a través de GALR1 (Kuteeva et al., 2008b), podría ser menos potente debido a que GALR1 tras la internalización producida por GAL, se degrada en su mayoría (Xia et al., 2008) por lo que se produciría una regulación por disminución del receptor (Marchese et al., 2003; Fichter et al., 2010).

Por otro lado, trabajos recientes de nuestro grupo de investigación demuestran que el fragmento GAL(1-15) produce una reducción más potente de los niveles de CREB que la molécula completa GAL en células cotransfectadas con GALR1 y GALR2, lo que sugiere que el heterodímero GALR1/GALR2 se une preferencialmente a la GAL(1-15) activando la proteína $G_{i/o}$, aumentando la reducción de la actividad Adenilato Ciclasa y CREB de forma más potente que la GAL (Borrito-Escuela et al., 2014). Además, el heterodímero GALR1/GALR2, tras la estimulación con el fragmento GAL(1-15) no modifica los niveles de NFAT, el cual sirve como indicador de la actividad PLC-PKC/ Ca^{++} mediada por la proteína $G_{q/11}$, mientras que la molécula completa si activa esta vía de señalización (Borrito-Escuela et al., 2014). Por lo que podemos concluir que la unión de la GAL(1-15) al heterodímero GALR1/GALR2 activaría al protómero GALR1 fomentando la activación de la proteína $G_{i/o}$ e inhibiría la activación de la proteína $G_{q/11}$ por el protómero GALR2 (Borrito-Escuela et al., 2014), lo cual constituiría otro mecanismo, que sería compatible con el expuesto anteriormente de la modificación en la cinética de internalización, que explicarían los efectos encontrados del fragmento GAL(1-15).

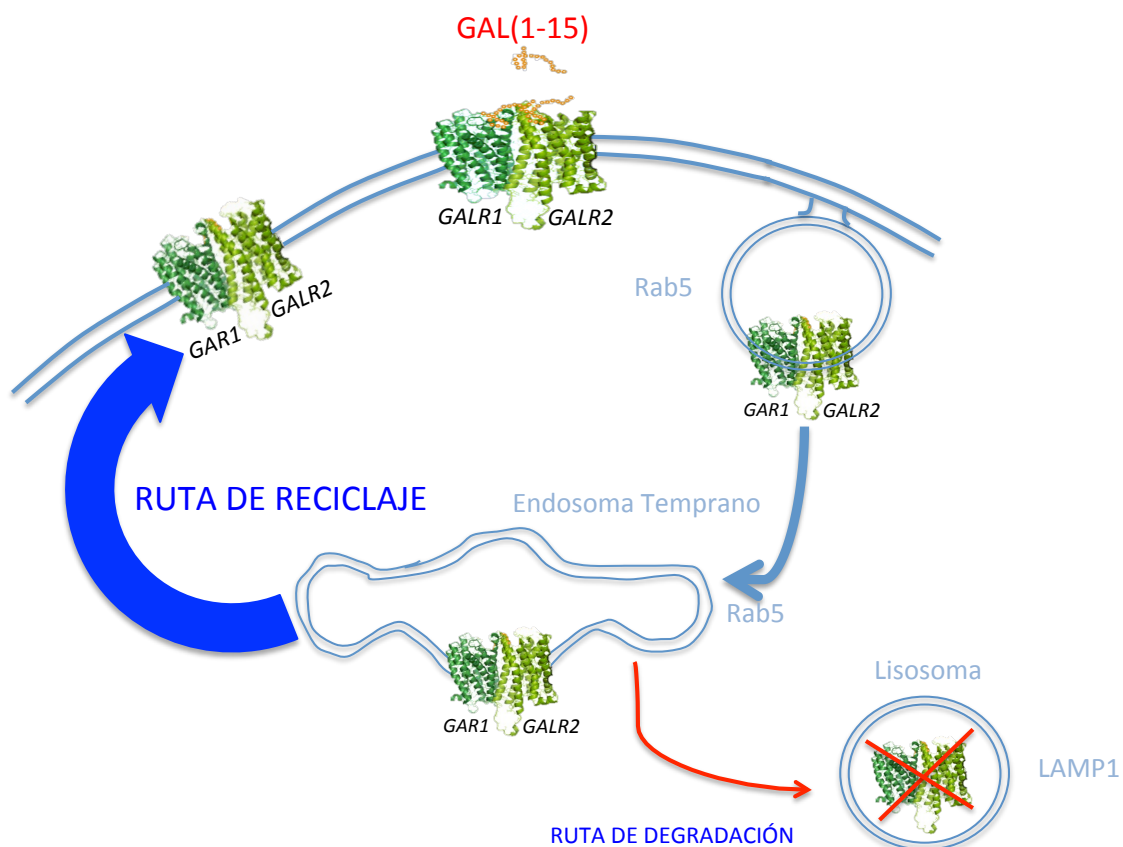


Figura 3. Esquema del patrón de internalización del heterodímero GALR1/GALR2 tras su estimulación por el fragmento GAL(1-15), donde se muestra como el heterodímero es en su mayor parte es reciclado a membrana estando disponible de nuevo para su reestimulación.

Efecto de la GAL(1-15) en la actividad celular y en la liberación de 5HT

Dado que los resultados de los experimentos de ligazón por proximidad en tejido mostraron una mayor cantidad de heterodímero GALR1/GALR2 en el núcleo dorsal del Rafe que en el resto de zonas estudiadas y además, en animales KnockDown GALR2, se mostraba una reducción del heterodímero en ese mismo núcleo, se utilizó el tipo celular RN33B, un modelo celular procedente del núcleo de Rafe, para estudiar el efecto del fragmento GAL(1-15) en la actividad celular y en la liberación del neurotransmisor 5HT.

El modelo celular RN33B, es una línea celular neuronal estable generada de las células embriogénicas medulares del Rafe en el día 12,5 de ratas de la cepa Sprague-Dawley mediante la infección con retrovirus que codifica el antígeno T mutante termo sensible del virus SV40 (Whittemore y White, 1993; Wojciechowski et al., 2002; Lundberg et al., 2002). Esta línea celular prolifera a temperatura permisiva de 33°C, mientras que entre 37°C y 39°C se diferencia en neuronas (Wojciechowski et al., 2002), además, se ha comprobado que producen 5HT además de presentar receptores propios de células de serotonérgicas de Rafe como el 5HT1A (Borrito-Escuela et al., 2012a).

Para poder usar como modelo este tipo celular, en primer lugar comprobamos la **existencia de receptores de GAL** en estas células, mediante inmunofluorescencia, comprobando que existe inmunorreactividad contra los receptores GALR1 y GALR2 en las células RN33B, lo cual nos valida este tipo celular como modelo para el estudio del efecto del fragmento GAL(1-15).

Tras la comprobación de que las células RN33B poseen los receptores GALR1 y GALR2, estudiamos si estos se encuentran en estrecha proximidad mediante la **técnica de ligazón por proximidad**, observando señal positiva de formación de heterodímeros GALR1/GALR2, lo que concuerda con los resultados obtenidos en tejido, donde los receptores GALR1 y GALR2 formaban heterodímeros en el núcleo del rafe, además en una mayor cantidad que en las otras zonas estudiadas. Lo que de nuevo haría válido este tipo celular para el estudio del efecto celular que produce la GAL(1-15).

Por tanto analizamos en células RN33B, el efecto que presenta la **GAL(1-15) en la actividad celular**, mediante el **estudio de la proteína C-Fos** (Hughes y Dragunow, 1995; Narváz et al., 2014), y en la **síntesis y almacenamiento de 5HT**, analizando la inmunorreactividad de esta (Czesak et al., 2007; Borrito-Escuela et al., 2012a).

El gen *c-Fos* es un gen de expresión rápida que codifica la proteína intracelular c-Fos, que junto con otras proteínas forma parte de la familia Fos. La mayoría de proteínas de esta familia heterodimerizan con las proteínas de la familia Jun (c-Jun, JunB o JunD), de modo que los dímeros de proteínas Fos/Jun forman los factores de transcripción AP-1 o Proteína Activadora 1 que regula la expresión génica neuronal, incluida la expresión de neurotransmisores y neuropeptidos (Nestler et al., 2008).

Tanto el gen como la proteína c-Fos se han utilizado frecuentemente como un marcador de poblaciones neuronales activadas *in vivo* tras tratamientos farmacológicos o estímulos ambientales, ya que su expresión basal es baja y su inducción es rápida y directa al no requerir síntesis de nuevas proteínas (Hughes y Dragunow, 1995; Chowdhury et al., 2000; Nestler et al., 2008).

Nuestros resultados muestran que tras la estimulación del cultivo de células RN33B con GAL(1-15) se produce un descenso significativo de la inmunorreactividad de la proteína c-Fos, que era más potente al descenso observado tras la estimulación con la molécula completa GAL, por lo que la GAL(1-15) produciría una disminución de la actividad celular que sería mayor que la GAL. Además en el análisis directo de la síntesis y almacenamiento de 5HT, observamos nuevamente que el fragmento GAL(1-15) produce un descenso de la cantidad de neurotransmisor en la célula que resulta ser más potente que el producido por la GAL.

Existen evidencia de que la GAL puede modular la neurotransmisión de 5HT en el cerebro (Fuxe et al., 1998). Así, estudios bioquímicos previos, basados en la medida de la concentración de 5HT en tejido de rata, indican que 20 minutos tras la administración de GAL intraventricular se produce un descenso en el metabolismo de la 5HT en la corteza ventral límbica y en la formación hipocampal (Fuxe et al., 1988).

Por otro lado, en estudios realizados *in vivo*, mediante microdialisis, se observa que la GAL es un potente inhibidor de la neurotransmisión de 5HT, ya que la administración de GAL icv causa una inhibición de la liberación de 5HT en el hipocampo, centrando el efecto en el núcleo del Rafe dorsal ya que la administración de GAL en este núcleo produjo el mismo efecto, confirmándose que el Rafe es el sitio de acción de la GAL en la disminución de la liberación hipocampal de 5HT (Kehr et al., 2002). Además, la GAL administrada icv produce un descenso en el enzima Triptófano Hidroxilasa, indicando que el efecto de la GAL se centra en el núcleo del Rafe dorsal y mostrando que la GAL inhibe directamente la síntesis de serotonina, probablemente de una forma indirecta a través de la inhibición de los disparos celulares de las neuronas del Rafe (Kehr et al., 2002), de una forma similar que los agonistas de 5HT_{1A} (Invernizzi et al., 1991). Así se ha demostrado que la GAL puede inducir hiperpolarización en neuronas 5HT del Rafe dorsal (Xu et al., 1998). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta tesis, ya que la GAL reduce la actividad de las

células RN33B y disminuyen la cantidad de 5HT celular, lo que validaría nuestros experimentos y el uso de las células RN33B como modelo.

Ya que el fragmento GAL(1-15) produce una notable reducción de la cantidad de 5HT, podemos pensar que esta reducción de la liberación de serotonina en las células del Rafe dorsal, lo cual reduciría la liberación de este neurotransmisor en las áreas diana del Rafe, incluyendo áreas límbicas, podría producir el efecto prodepresivo y ansiogénico observado en las pruebas de comportamiento, ya que la 5HT es uno de los principales neurotransmisores implicados en la depresión (Carlsson et al., 1968). Además, demostramos la estrecha relación que existe entre el fragmento GAL(1-15) y la 5HT que estudiamos en la segunda parte de esta tesis doctoral.

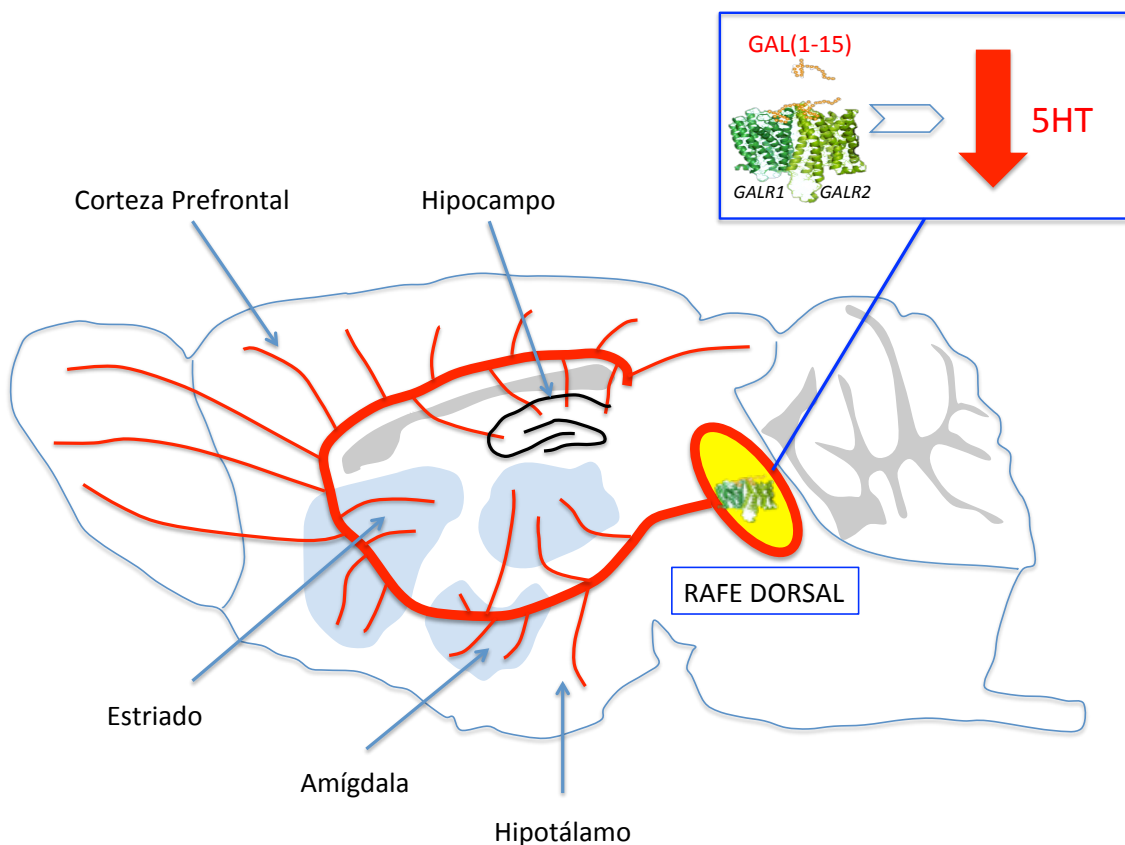


Figura 4. Esquema representativo de la disminución de la producción de 5HT en el Rafe dorsal producido por la acción del fragmento GAL(1-15). En rojo se representa el Haz medial frontal, que conecta el Rafe dorsal con áreas cortico-límbicas. Modificado de Lesch y Waider, 2012.

INTERACCIÓN GAL(1-15)/5HT1A

1. Estudio de la interacción GAL(1-15)/5HT1A en pruebas de comportamiento animal.

Para estudiar la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A en pruebas de conducta animal, se coadministra GAL(1-15) a una dosis no efectiva junto con 8-OH-DPAT, agonista selectivo de los receptores 5HT1A (Hoyer et al., 2002), a dosis efectivas y no efectivas, y se comprueba su efecto en el test de la natación forzada, modelo animal relacionado con la depresión (Porsolt et al., 1977; Porsolt et al., 1978; Detke y Lucki, 1996). Para estudiar los parámetros locomotores de los animales, se realiza también la prueba del campo abierto (Hall, 1934; Walsh, 1976; Karakas et al., 2011).

El receptor 5HT1A se ha relacionado ampliamente con la depresión (Carr y Lucki, 2011), y existen una gran cantidad de evidencias del efecto antidepressivo que producen los agonistas del 5HT1A en diferentes pruebas de comportamiento animal (Blier y Ward, 2003; Carr y Lucki, 2011). Así, el agonista específico de los receptores 5HT1A, 8-OH-DPAT, usado en los experimentos de esta tesis, produce una disminución de la inmovilidad en la prueba de la natación forzada, indicando un comportamiento antidepressivo del animal (Cervo y Samanin, 1987; Lucki et al., 1994; Cryan et al., 2005; Carr y Lucki, 2011). Además se produce un incremento de la conducta activa de natación (Estrada-Camarena et al., 2006), característica que indica la implicación del sistema de neurotransmisión serotoninérgico (Detke et al., 1995; Lucki et al., 1997; Estrada-Camarena et al., 2006).

En primer lugar, se comprueba el **efecto, bajo nuestras condiciones experimentales, del agonista 8-OH-DPAT en la prueba de la natación forzada** con distintas dosis y tiempos de administración. Los resultados muestran que la inyección subcutánea de 8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg, **20 minutos** antes de la prueba de conducta, produce una disminución significativa con respecto a los animales controles del tiempo de inmovilidad y de escalada, así como un aumento de la natación de los animales, por lo que esta dosis la consideramos dosis efectiva bajo estas condiciones. La dosis de 0.0625 mg/Kg por el contrario no produjo ningún efecto, y la hemos utilizado como dosis subumbral. Además, nuestros resultados muestran que la administración del agonista 8-OH-DPAT, 20 minutos antes de la prueba, presenta una afectación de la actividad locomotora, disminuyendo la distancia recorrida y la velocidad media del animal en el campo abierto en todas las dosis empleadas.

Estudios previos de otros autores han señalado la capacidad de alterar la actividad locomotora del agonista 5HT1A 8-OH-DPAT, aunque existe cierta controversia en los efectos, posiblemente debida a la metodología utilizada. Algunos estudios indican que la administración del 8-OH-DPAT en ratas produce una supresión de la actividad locomotora espontánea dosis- dependiente en el campo abierto, además de disminuir la actividad vertical de estos animales, generalmente tomada como un índice de la actividad exploratoria (Hillegaart et al., 1989). Otros estudios

muestran que tras la administración de 8-OH-DPAT se produce una supresión de la actividad locomotora en el periodo inmediatamente después de la inyección, pero que tras este periodo se produce un cambio comenzando un periodo de hiperlocomoción (Evenden y Angeby-Moller, 1990). Algunos autores sugieren que los efectos locomotores del 8-OH-DPAT podrían estar relacionados con la capacidad de este agonista de producir varios síntomas del conocido Síndrome Serotoninérgico (Tricklebank et al., 1984; Hillegaart et al., 1989; Evenden y Angeby-Moller, 1990).

Los resultados encontrados en nuestros experimentos muestran, que aunque los animales tras la administración del agonista 5HT1A disminuyan su actividad exploratoria en el campo abierto, aumentan sin embargo la conducta activa de natación en la natación forzada, lo que sugiere que los animales pueden moverse con normalidad en situaciones donde el animal es forzado al movimiento. Esto concuerda con otros estudios donde la administración de 8-OH-DPAT no afecta la actividad locomotora de los animales donde se les fuerza a moverse mediante un tapiz rodante (Hillegaart et al., 1989), lo cual validaría los experimentos realizados donde la actividad locomotora esta disminuida, ya que en la natación forzada los animales pueden moverse normalmente como indica el aumento del parámetro de natación.

Algunos autores indican que entre 30 y 50 minutos tras la administración del 8-OH-DPAT desaparecen algunos síntomas del Síndrome Serotoninérgico como la alteración locomotora con postura corporal aplanada y movimientos de la cabeza, y se ha sugerido que para evitar los efectos locomotores en la realización de experimentos de conducta el tiempo optimo seria de 60 minutos tras la administración del agonista 5HT1A (Bendotti y Samanin, 1986; Cervo y Samanin, 1987).

Por tanto, para intentar evitar esta afectación locomotora administramos 8-OH-DPAT **60 minutos** antes de la realización de la prueba de la natación forzada, observándose efectos antidepressivos mediante una disminución de la inmovilidad y de la escalada y un aumento del tiempo de natación con la dosis de 0.25 mg/Kg, mientras que la dosis de 0.125 mg/Kg no modificó estos parámetros. La administración del 8-OH-DPAT 60 minutos antes del test, disminuye la actividad locomotora de los animales inyectados con la dosis efectiva del agonista pero no modifica esta actividad con dosis subumbrales.

Por tanto, la dosis subumbral de 8-OH-DPAT inyectada 60 minutos antes de la prueba no modifica la actividad locomotora de las ratas, mientras esas mismas dosis inyectadas 20 minutos antes de la prueba producía una disminución de los parámetros locomotores. Los resultados obtenidos de la administración del 8-OH-DPAT coinciden con el patrón antidepressivo descrito por otros autores, y que hemos mencionado anteriormente (Cervo y Samanin, 1987; Lucki et al., 1994; Cryan et al., 2005; Carr y Lucki, 2011; Estrada-Camarena et al., 2006), lo cual validaría las condiciones y el procedimiento utilizado en nuestros experimentos.

Como hemos mencionado anteriormente, para estudiar la **interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A**, realizamos dos sets de experimentos, en el primero administramos dosis no efectivas de GAL(1-15) y agonista 8-OH-DPAT. Los resultados muestran que tras la coadministración de GAL(1-15) y de 8-OH-DPAT, este inyectado 60 minutos antes de la prueba, se observa una disminución del tiempo de inmovilidad, así como una disminución del tiempo de escalada y un aumento del tiempo que emplean los animales en nadar, patrón de conducta similar al que se produce tras la administración de dosis efectivas del 8-OH-DPAT. Por tanto podemos pensar que existe una interacción entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, donde la GAL(1-15) facilita los efectos conductuales mediados por el receptor 5HT1A.

Además, estos resultados se confirman en los experimentos donde se coadministra GAL(1-15) y 8-OH-DAPT, esta vez 20 minutos antes de la prueba, confirmando la interacción de la GAL(1-15) sobre el 5HT1A y la dirección de esta.

En el segundo set de experimentos y una vez definida la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A en la prueba de la natación forzada, comprobamos si una dosis no efectiva de GAL(1-15) es capaz de potenciar también el efecto en la natación forzada producido por la administración de una dosis efectiva de 8-OH-DPAT. Los resultados muestran que la coadministración de GAL(1-15) junto con 8-OH-DPAT, inyectado 60 minutos antes de la prueba, produce una disminución significativa en el tiempo de inmovilidad, así como en el tiempo de escala y un aumento significativo del tiempo de natación respecto al grupo inyectado con el agonista 5HT1A sólo.

Además podemos ver que la coadministración de GAL(1-15) junto con la inyección de 8-OH-DPAT 20 minutos antes de la natación forzada también produce una tendencia a reducir el tiempo de inmovilidad, aunque no llega a ser significativo. Observamos, por tanto, una potenciación del efecto conductual del agonista 8-OH-DPAT producido por el fragmento GAL(1-15) en ambos casos. De esta manera no sólo se confirma la interacción observada previamente entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, donde la GAL(1-15) facilita los efectos conductuales producidos por el receptor 5HT1A, sino que se demuestra que esta interacción es muy potente, incluso como para potenciar efectos producidos por dosis efectivas del agonista 5HT1A.

Los resultados descritos anteriormente, muestran por primera vez la capacidad del fragmento GAL(1-15) de interactuar con los receptores 5HT1A y producir un aumento de los efectos antidepresivos de este, lo cual podría ser muy beneficioso en el tratamiento de la depresión. La función de los receptores 5HT1A es bien conocida ya que estos juegan una importante función en la regulación del sistema serotoninérgico y por tanto tienen un papel importante en la depresión (Artigas, 2013).

Los receptores 5HT1A se encuentran en dos poblaciones principales, una en neuronas serotoninérgicas en el núcleo del Rafe donde actúa como autorreceptor somatodendrítico (presináptico) y otra en áreas donde llegan las proyecciones serotoninérgicas, principalmente en el hipocampo y otras áreas corticolímbicas, donde actúan como receptores postsinápticos (Lanfume y Hamon, 2000; Artigas, 2013). La activación de los autorreceptores 5HT1A en el Rafe produce una apertura de canales de K⁺ en la membrana plasmática y por tanto una hiperpolarización en la célula, la cual produce una disminución de la tasa de descargas de la célula (Artigas, 2013), esto se traduce en una reducción de la liberación de 5HT en muchas regiones del cerebro, con un efecto principal en las áreas de inervación del Rafe (Hjorth y Sharp, 1991; Adell et al., 1993; Casanovas y Artigas, 1996; Artigas, 2013). El receptor 5HT1A presináptico ha sido relacionado con efectos depresivos, ya que entre otras evidencias, en estudios postmortem de pacientes con depresión mayor se ha observado un aumento en la densidad de estos receptores (Boldrini et al., 2008), o estudios genéticos muestran que individuos con alta densidad de receptores 5HT1A presinápticos son más susceptibles a sufrir depresión (Lemondé et al., 2003; Neff et al., 2009). Por el contrario los receptores 5HT1A postsinápticos, que existen en áreas corticolímbicas, parecen estar relacionados con efectos antidepresivos, ya que el tratamiento crónico con antidepresivos SSRIs activa de forma tónica los receptores 5HT1A en el hipocampo (Haddjeri et al., 1998) y se ha demostrado en estudios genéticos que los receptores postsinápticos 5HT1A son suficientes para producir los efectos antidepresivos de los SSRIs en roedores (Richarson-Jones et al., 2011).

Por tanto una posible explicación de los resultados obtenidos sería que la GAL(1-15) produzca una inhibición de los receptores 5HT1A presinápticos en el Rafe dorsal y por otro lado facilite los 5HT1A postsinápticos del hipocampo, produciéndose así un gran aumento en los efectos antidepresivos, como observamos en el test de la natación forzada. Dado que, como mostramos en la primera parte de esta tesis, el fragmento GAL(1-15) actúa a través del heterodímero GALR1/GALR2, y estos complejos de receptores están presentes de una forma importante tanto en células serotoninérgicas del núcleo del Rafe dorsal así como en áreas dianas de estas células como el hipocampo, estas dos zonas podrían estar involucradas en los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento.

Para estudiar la **implicación del receptor GALR2 en la interacción observada entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A** en la prueba de la natación forzada, utilizamos el antagonista específico de los receptores GALR2 M871 (Narváez et al., 2014), utilizado y descrito en la primera parte de esta tesis. Los resultados muestran que el antagonista M871 bloquea completamente el efecto producido por la coadministración de GAL(1-15) y el 8-OH-DPAT, tanto en la disminución del tiempo de inmovilidad como en el de escala y en el aumento de la natación, demostrando la implicación del receptor GALR2 en la interacción entre la GAL(1-15) y el 5HT1A.

La interacción entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, se podría explicar mediante la interacción entre los receptores GALR1-GALR2/5HT1A, que formarían un mosaico de receptores, lo que permitiría la modulación del receptor 5HT1A por parte del fragmento GAL(1-15) (Fuxe et al., 2012). Además, el hecho de que se bloquee el efecto de esta interacción tras la coadministración con un antagonista GALR2 respalda esta hipótesis.

Como hemos demostrado, el heterodímero GALR1/GALR2, se encuentra presente en el hipocampo dorsal y en un mayor número en el núcleo del Rafe dorsal, por tanto podemos pensar que la forma de interaccionar entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A podría ser a través de este trímero, que se formaría en estas zonas cerebrales. Existen algunas evidencias de la existencia de este mosaico de receptores, ya que en experimentos realizados en células cotransfectadas con los receptores GALR1 y 5HT1A, se producía un aumento de la señal de FRET si además se añadía el receptor GALR2, lo que indicaría una posible interacción física entre los tres receptores, además en estas células la presencia de los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A, modificaba el patrón de distribución subcelular en comparación con células que sólo contenían los receptores GALR1 y 5HT1A (Borroto-Escuela et al., 2010).

Además de estudiar la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, hemos comparado este efecto con el producido en la **interacción entre la molécula completa de GAL y el 5HT1A en la prueba de la natación forzada**, relacionada con la depresión.

Los resultados de la coadministración de dosis subumbrales de GAL y el agonista 8-OH-DPAT, este último inyectado 60 minutos antes de la prueba, muestran una disminución no significativa del tiempo de inmovilidad, aunque si produce una disminución significativa del tiempo de escalada así como un aumento en el tiempo de natación. Este patrón antidepressivo similar al que produce la administración de dosis efectivas del agonista 8-OH-DPAT demuestra que la GAL también es capaz de interactuar con el receptor 5HT1A, en la misma dirección que lo hace la GAL(1-5), produciendo una facilitación del 5HT1A, sin embargo de una forma menos potente. Lo que concuerda con los trabajos previos de esta tesis donde la GAL(1-15) presentaba una acción a nivel de comportamiento más eficaz que la molécula completa.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, han demostrado que la administración de GAL icv produce una disminución de la afinidad del receptor 5HT1A en el Rafe dorsal 10 minutos después de la inyección (Razani et al., 2000), este hecho podría explicar la potenciación por parte de la GAL de los efectos antidepressivos producidos por el agonista 8-OH-DPAT en la natación forzada, ya que al disminuir la afinidad de los receptores presinápticos 5HT1A, los cuales actúan como autorreceptores, se vería aumentada la cantidad de 5HT liberada por estas células en áreas cortico límbicas, por tanto se aumentaría la estimulación de los receptores 5HT1A postsinápticos responsables de los efectos antidepressivos de este receptor (Haddjeri et al., 1998; Richarson-Jones et al., 2011). Este efecto de la GAL sobre los 5HT1A podría estar mediado por el heterodímero, descrito en cultivos celulares por nuestro grupo de investigación, GALR1/5HT1A (Borroto-Escuela et al., 2010), aunque no podemos descartar la implicación de otros mecanismos como posibles heterodímeros GALR2/5HT1A.

La interacción a nivel conductual entre la GAL y el receptor 5HT1A ha sido descrita anteriormente en el test de la evitación pasiva. Así la GAL 3nmol administrada junto con una dosis efectiva del agonista 8-OH-DPAT ejercía una disminución del efecto producido por el 8-OH-DPAT sólo, definiendo que la GAL ejerce un efecto antagónico sobre el 5HT1A en la prueba de la evitación pasiva (Misane et al., 1998). Sin embargo, la administración de dosis subumbrales de GAL y 8-OH-DPAT no produjo ningún efecto en esta prueba (Misane et al., 1998). Así, la GAL 3nmol administrada junto con el agonista 8-OH-DPAT disminuyó la latencia de retención del 8-OH-DPAT en esta prueba, aunque este efecto no se reprodujo con dosis subumbrales del agonista 5HT1A, lo que parece sugerir que el efecto observado en esta tesis en la natación forzada es más potente, ya que en nuestros experimentos lo observamos tanto con dosis efectivas como con dosis subumbrales. Además, dado que en otros trabajos la GAL reduce la latencia de retención (Hiramatsu et al., 1996), y que estudios autorradiográficos in vitro demuestran que la interacción entre los receptores de GAL y el receptor 5HT1A puede ser recíproca en áreas límbicas (Hedlund et al., 1991), el efecto descrito por Misane y colaboradores podría explicarse por una interacción recíproca entre los receptores de GAL y el receptor 5HT1A.

Todos estos resultados indican la existencia de una interacción entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, donde la GAL(1-15) facilitaría la acción del 5HT1A en la prueba de la natación forzada. Además, se describe la interacción entre la GAL y el receptor 5HT1A, interacción que iría en la misma dirección apuntada anteriormente, donde la GAL facilitaría la acción del 5HT1A. Por tanto, podemos observar que el fragmento GAL(1-15) produce una facilitación de los receptores 5HT1A que resulta más potente que la realizada por la molécula completa.

Además, la capacidad de modular los receptores 5HT1A postsinápticos del hipocampo dorsal por parte del fragmento GAL(1-15) y no por la molécula completa (Hedlund et al., 1994) podría explicar el efecto antidepresivo más potente observado en la interacción entre la GAL(1-15) y el 5HT1A que en la interacción entre la molécula completa GAL y el 5HT1A, ya que el GAL(1-15) podría facilitar los receptores 5HT1A postsinápticos mientras que la molécula completa no.

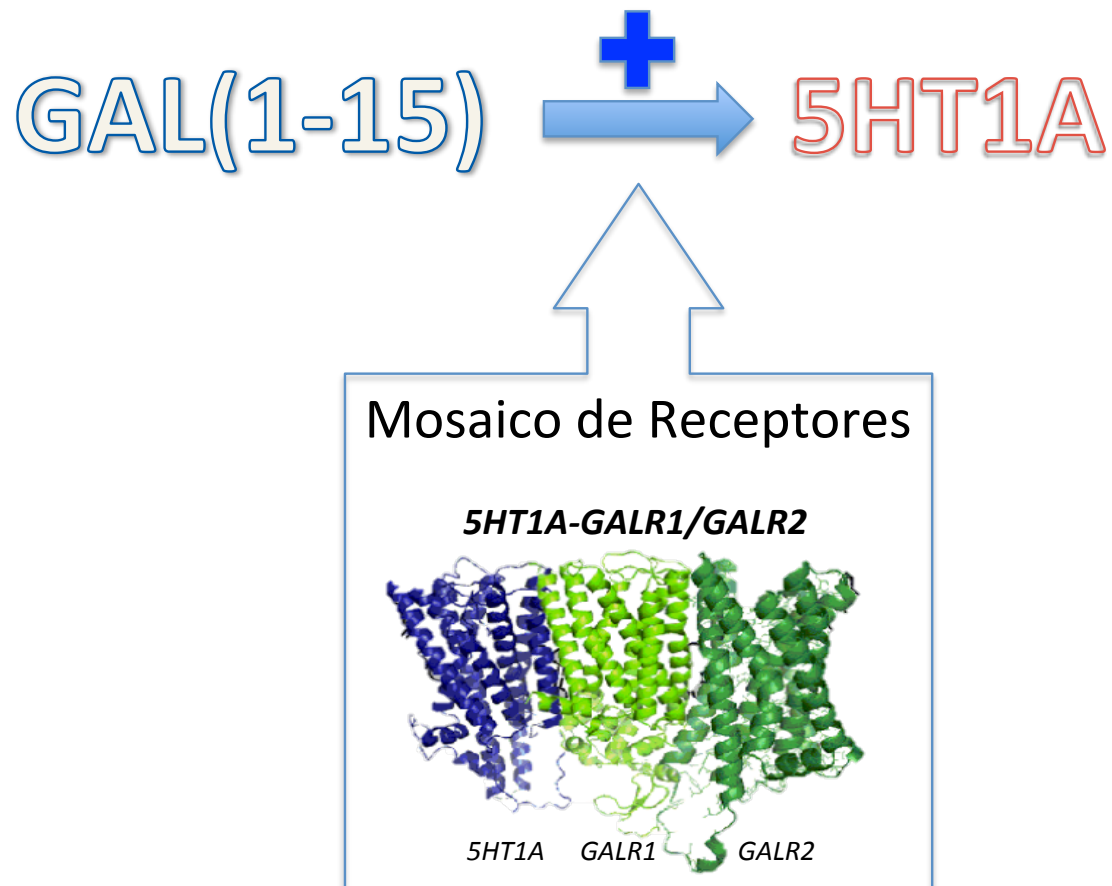


Figura 5. Diagrama donde se simboliza la potenciación del efecto del receptor 5HT1A producida por el fragmento GAL(1-15) así como la propuesta de formación del mosaico de receptores 5HT1A-GALR1/GALR2 como posible mecanismo que podría explicar esta interacción. Modificado de Fuxe et al., 2012.

2. Estudio de la interacción GAL(1-15)/5HT1A a nivel de receptor.

Para estudiar la interacción descrita funcionalmente entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A a nivel de receptor se realizan experimentos tanto para conocer si la GAL(1-15) produce modificaciones en las características del receptor 5HT1A en los núcleos objeto de estudio de esta tesis, como para conocer si el fragmento GAL(1-15) altera los niveles de expresión del 5HT1A en estos mismo núcleos.

Los resultados de los experimentos de autorradiografía muestran que en la zona de **CA1** del hipocampo dorsal la administración de GAL(1-15) produce una disminución de la afinidad y un aumento de la densidad de los receptores 5HT1A tanto a los 10 minutos como a las 2 horas tras la inyección, desapareciendo estas modificaciones a las 5 horas. De la misma manera en la zona del **Giro Dentado** del hipocampo dorsal la GAL(1-15) también produce una disminución significativa de la afinidad del 5HT1A a los 10 minutos y a las 2 horas de su administración, además de un aumento de los sitios de unión del agonista 5HT1A tanto a los 10 minutos como a las 2 horas y 5 horas.

Los experimentos realizados *in vivo* muestran, que el fragmento GAL(1-15) tiene la capacidad de modular los receptores 5HT1A postsinápticos del hipocampo dorsal, produciendo una disminución de la afinidad de estos, pero además mostrando un aumento de la densidad de los 5HT1A, modificación que no se observaba en los trabajos previos, pudiendo deberse a la realización de los experimentos *in vitro* (Hedlund et al., 1994).

Estos estudios realizados *in vitro* muestran como el fragmento GAL(1-15) es capaz de modular los receptores postsinápticos 5HT1A del hipocampo dorsal en rata, de forma que produce un aumento de la K_d , y por tanto una disminución de la afinidad de estos receptores, sin embargo la GAL(1-15) no modifica el parámetro B_{max} , indicativo de la densidad de receptores 5HT1A (Hedlund et al., 1994). En la misma línea, estudios, también realizados *in vitro*, muestran que el fragmento N-terminal de GAL GAL(1-16), modula los receptores postsinápticos 5HT1A de la corteza ventral límbica disminuyendo la afinidad de estos sin modificar la densidad de los 5HT1A en esta zona cerebral (Diaz-Cabiale et al., 2000).

Estos resultados obtenidos en el hipocampo dorsal a nivel de receptor pueden explicar en parte los resultados funcionales previos, donde vemos la existencia de una interacción entre el fragmento GAL(1-15) y los receptores 5HT1A, potenciando la GAL(1-15) el efecto producido por el receptor 5HT1A a nivel conductual. La existencia de un aumento de la Bmax, y por tanto de la densidad de los 5HT1A producida 10 minutos tras la administración de GAL(1-15) a nivel del hipocampo dorsal, podría explicar el aumento de la conducta antidepresiva encontrada, ya que como hemos descrito anteriormente en esta tesis la estimulación de los receptores 5HT1A postsinápticos son los responsables de los efectos antidepresivos de este receptor (Haddjeri et al., 1998; Richarson-Jones et al., 2011).

Para estudiar el papel del receptor GALR2 en la acción de la GAL(1-15) sobre la modulación de las características del receptor 5HT1A en el hipocampo dorsal, se realizan experimentos donde se coadministra el antagonista específico GALR2 (Narváez et al., 2014), utilizado anteriormente en esta tesis, junto con el fragmento GAL(1-15). Los resultados de estos experimentos muestran que el antagonista M871 bloquea tanto el aumento de la Kd como el de la Bmax de los receptores 5HT1A producido tras 10 minutos de la inyección de GAL(1-15) tanto en CA1 como en GD. Indicando, una implicación del receptor GALR2 en el efecto que produce el fragmento GAL(1-15) en las características farmacológicas de los 5HT1A.

Por tanto, la implicación del receptor GALR2 en la interacción entre la GAL(1-15) y el 5HT1A a este nivel apoyaría la hipótesis de que esta interacción podría estar mediada por el mosaico de receptores formada por GALR1-GALR2/5HT1A (Fuxe et al., 2012) anteriormente descrito y del que existen algunas evidencias en cultivos celulares (Borroto-Escuela et al., 2010). Así el trímero potenciaría la expresión de este receptor en el hipocampo dorsal, y por tanto se potenciaría el efecto de este receptor postsináptico, responsable de los efectos antidepresivos (Haddjeri et al., 1998; Richarson-Jones et al., 2011), observándose un mayor comportamiento antidepresivo de los animales.

No podemos descartar otros posibles mecanismos que expliquen la interacción encontrada tanto a nivel funcional como a nivel de receptor entre la GAL(1-15) y los receptores 5HT1A, como que el dímero GALR1/GALR2 potencie la permanencia en membrana y la síntesis del 5HT1A mediante una interacción a nivel de cascada intracelular o modificando el patrón de internalización de este receptor.

Mediante el estudio con hibridación *in situ* observamos un aumento del mRNA de los receptores 5HT1A en las zonas de CA1 y GD del hipocampo dorsal medido a las 2 horas de la inyección del fragmento GAL(1-15), lo que implica un aumento en la expresión del receptor 5HT1A en estas zonas, por tanto el aumento en la densidad de 5HT1A observados mediante autorradiografía se pueden observar también a nivel de expresión del receptor. Este aumento de la expresión del receptor deja de observarse a las 5 horas de la administración de GAL(1-15).

En relación al otro núcleo objeto de estudio, el **núcleo dorsal de Rafe**, observamos que la administración de la GAL(1-15) no produce ninguna modificación en la afinidad de los receptores 5HT1A en los tres tiempos estudiados, sin embargo se observa una disminución de la densidad de receptores 5HT1A que ocurre a las dos horas de la administración de la GAL(1-15). Al mismo tiempo los resultados muestran una disminución del mRNA de 5HT1A, lo que implica una disminución de la expresión del receptor, tras 2 horas de la inyección icv de GAL(1-15).

Los resultados de la interacción a nivel de receptor entre la GAL(1-15) y los 5HT1A en el Rafe dorsal, también apoyaría los efectos funcionales descritos anteriormente en esta tesis donde la GAL(1-15) potencia los efectos antidepresivos producidos por el receptor 5HT1A. La activación de los autorreceptores 5HT1A en el Rafe produce una apertura de canales de K^+ en la membrana plasmática y por tanto una hiperpolarización en la célula, la cual produce una disminución de la tasa de descargas de la célula (Artigas, 2013), lo que se traduce en una reducción de la liberación de 5HT en muchas regiones del cerebro (Hjorth y Sharp, 1991; Adell et al., 1993; Casanovas y Artigas, 1996; Artigas, 2013). Por lo que este receptor estaría relacionado con efectos depresivos (Boldrini et al., 2008; Lemonde et al., 2003; Neff et al., 2009). Por tanto la disminución del receptor 5HT1A presináptico inducida por la GAL(1-15) apoyaría un aumento de la conducta antidepresiva.

Por tanto, nuestros experimentos muestran que también existe una interacción a nivel de receptor entre el fragmento GAL(1-15) y el 5HT1A presináptico en el Rafe dorsal. Observándose que la GAL(1-15) no modifica la afinidad de los 5HT1A, sin embargo si que produce una disminución de la densidad de receptores a las dos horas, además de una reducción de la expresión del receptor.

La interacción a nivel de receptor entre la molécula completa GAL y el receptor 5HT1A en el Rafe dorsal ha sido descrita previamente por nuestro grupo de investigación. Así, estudios muestran que la administración de GAL aumenta el valor de la K_d del receptor 5HT1A a los 10 minutos, además la GAL produce un aumento de la B_{max} de este receptor a las 2 horas. Sin embargo, los niveles de mRNA de 5HT1A disminuyeron significativamente a este mismo tiempo (Razani et al., 2000; Ogren et al., 2007). Estos resultados mostrarían un efecto antagónico de la GAL sobre los receptores presinápticos 5HT1A, que se produciría mediante la interacción de los

receptores de GAL y el receptor 5HT1A formando un complejo heterodímero, y que produciría un descenso en la internalización, el cual desencadenaría un mecanismo celular compensatorio produciendo una reducción de la expresión del 5HT1A (Razani et al., 2000). Este efecto descrito podría estar causado por el heterodímero, descrito por nuestro grupo en células en cultivo GALR1/5HT1A (Borroto-Escuela et al., 2010), aunque no se puede descartar un posible dímero GALR2/5HT1A.

Por tanto observamos un efecto diferencial con la molécula completa, aunque el resultado final de la interacción tanto de la GAL como de GAL(1-15) con el 5HT1A sea la reducción de la expresión de receptores 5HT1A presinápticos en el Rafe dorsal. Una posible explicación de la diferencia entre la molécula completa de GAL y el fragmento GAL(1-15) puede ser que este interaccione con el 5HT1A a través de un heterotrímero formado por GALR1-GALR2/5HT1A.

En base al análisis de la interacción a nivel de receptor entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A postsináptico en el hipocampo dorsal y el 5HT1A presináptico en el rafe dorsal, podemos explicar el efecto conductual observado, donde la GAL(1-15) aumentaba el efecto antidepressivo producido por el receptor 5HT1A. La interacción a nivel de receptor entre la GAL(1-15) y los 5HT1A en el hipocampo, produce un aumento de la densidad de estos receptores a los 10 minutos, lo que podría explicar la potenciación del efecto antidepressivo observado en la natación forzada, además este aumento de los receptores 5HT1A postsinápticos, responsables de los efectos antidepressivos de este receptor (Haddjeri et al., 1998; Richardson-Jones et al., 2011), se mantiene hasta las 2 horas además de desencadenarse un aumento en la expresión del receptor. Por otro lado, en el núcleo dorsal del Rafe, la GAL(1-15) produce una disminución de la densidad de los receptores 5HT1A presinápticos, relacionados con efectos depresivos (Boldrini et al., 2008; Lemonde et al., 2003; Neff et al., 2009), a las 2 horas, seguido de una disminución de la expresión del receptor. Esta acción de la GAL(1-15) sobre los 5HT1A en el Rafe apoyaría el aumento de la conducta antidepressiva generada por la interacción de la GAL(1-15) sobre los 5HT1A postsinápticos en el hipocampo dorsal. Por tanto, la interacción producida entre la GAL(1-15) y los receptores 5HT1A podría ser el mecanismo para posibles tratamientos antidepressivos.

Además, los experimentos realizados, indican la implicación del receptor GALR2 en la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y los receptores 5HT1A, y que sería compatible con la existencia del mosaico de receptores GALR1-GALR2/5HT1A (Fuxe et al., 2012).

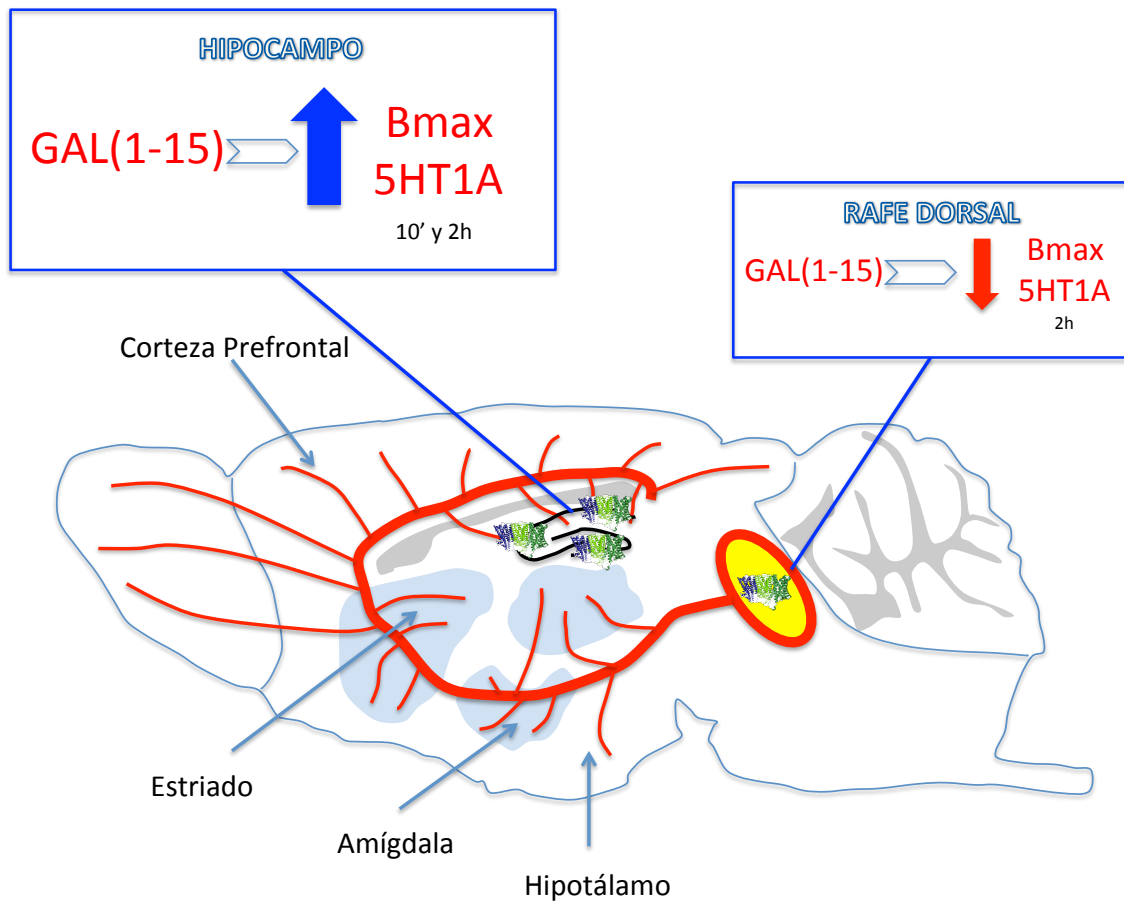


Figura 6. Esquema representativo de la interacción a nivel de receptor entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, donde se muestra como la GAL(1-15) produce en el hipocampo dorsal un aumento en la densidad de receptores 5HT1A postsinápticos a los 10 minutos manteniéndose a las 2 horas, mientras que en el Rafe dorsal la GAL(1-15) produce una disminución de la densidad del 5HT1A presináptico a las 2 horas. Esta interacción a nivel de receptor podrían explicar la facilitación del efecto antidepressivo del receptor 5HT1A por parte del fragmento GAL(1-15) observado en las pruebas de comportamiento animal. Modificado de Lesch y Waider, 2012.

3. Técnicas inmunohistoquímicas y de ligazón por proximidad.

Estudiamos en secciones de cerebro de rata si existe coexistencia y/o colocalización de los receptores implicados en el trímero propuesto, fundamental para una posible interacción entre ellos (Fuxe et al., 2009; Fuxe y Kenakin, 2010; Kenakin et al., 2010).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia simple comprobamos la **expresión y distribución del receptor 5HT1A** en las zonas del hipocampo dorsal y del núcleo dorsal del Rafe.

Los resultados muestran la expresión del receptor 5HT1A en células del hipocampo dorsal, incluyendo las zonas de CA1, CA2 y CA3 así como el Giro Dentado. También se obtuvo señal del receptor 5HT1A en células del otro núcleo estudiado, el Rafe dorsal. La localización del receptor fue generalmente en el citoplasma, centrándose en el cuerpo celular aunque también se observa señal en las prolongaciones neuronales.

Estudios previos de otros autores coinciden con los resultados de distribución del 5HT1A obtenidos en esta tesis, validando por tanto nuestras condiciones experimentales así como la especificidad del anticuerpo utilizado. Existen diversos estudios donde se muestra la distribución del receptor 5HT1A en el SNC. Estudios de mapeo del receptor 5HT1A utilizando técnicas de autorradiografía muestran que el 5HT1A presenta sitios de unión especialmente abundantes en el hipocampo, sobre todo en CA1 y Giro dentado, así como el Rafe dorsal entre otros núcleos (Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000). Esto se corroboró mediante estudios de hibridación *in situ*, donde se localizaba mRNA del receptor en los mismos núcleos (Barnes y Sharp, 1999; Lanfumey y Hamon, 2000). También otros trabajos han estudiado la localización del receptor 5HT1A, mediante el uso de anticuerpos específicos, permitiendo además la localización subcelular del receptor, así se ha encontrado alta densidad de inmunotinción del 5HT1A en áreas límbicas, sobre todo en hipocampo en las zonas de CA1 y GD así como en el Rafe dorsal entre otras zonas (Kia et al., 1996a; Lanfumey y Hamon, 2000), además mediante inmunohistoquímicas dobles contra el receptor 5HT1A y contra 5HT se muestra que todas las células que presentan el receptor 5HT1A en el Rafe dorsal son serotoninérgicas (Sotelo et al., 1990). Con respecto a la distribución subcelular del 5HT1A se muestra que en las células del Rafe el receptor se encuentra exclusivamente en el soma neuronal y en dendritas y en el hipocampo se mostraba en somas y dendritas de células piramidales y granulares (Kia et al., 1996b; Kia et al., 1996a; Riad et al., 2000; Lanfumey y Hamon, 2000).

Como mostramos mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica simple, en la primera parte de esta tesis, los receptores GALR1 y GALR2 se expresan también, en células del hipocampo dorsal, incluyendo las zonas CA1, CA2 y CA3 así como el Giro Dentado. De la misma forma se encontraba expresión de ambos receptores en las células del núcleo del Rafe dorsal. Distribución que coincidía con estudios realizados por otros autores (O'Donnell et al., 1999; Waters y Krause, 2000; Mitsukawa et al., 2010). Además como también mostramos en la primera parte de esta tesis, utilizando inmunofluorescencia doble, los receptores GALR1 y GALR2 no solo coexistían sino que colocalizaban en la mayoría de las células en las distintas zonas observadas del hipocampo dorsal así como en el núcleo del Rafe dorsal.

Por tanto, estos resultados indican que existe una coexistencia de los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A en las mismas zonas del hipocampo dorsal y del núcleo del Rafe, donde además hemos demostrado que los receptores GALR1 y GALR2 colocalizan en las mismas neuronas. Lo cual apoyaría la hipótesis planteada de la existencia en estos núcleos cerebrales de un mosaico de receptores formados por GALR1-GALR2/5HT1A (Fuxe et al., 2012).

Además, mediante inmunofluorescencia doble, se ha estudiado la **colocalización celular entre los receptores GALR2 y 5HT1A** en los núcleos objeto de estudio. Como resultados de estos experimentos podemos observar que los receptores GALR2 y 5HT1A presenta una colocalización celular tanto en el hipocampo dorsal (CA1, CA2, CA3 y GD) como en el núcleo del Rafe dorsal, coincidiendo con la coexistencia demostrada en los experimentos con marcajes simples.

La colocalización de los receptores GALR2 y 5HT1A se observa generalmente a nivel citoplasmático, aunque también se observan en algunas prolongaciones celulares. La especificidad de estos dobles marcajes se comprobó mediante controles primarios y con la observación de algunas células y fibras neuronales que solo presentaban señal procedente de un único receptor. Por tanto, el hallazgo de la colocalización entre los receptores GALR2 y el 5HT1A iría a favor de la hipótesis planteada de la formación de un heterotrímero GALR1-GALR2/5HT1A, ya que la colocalización de los receptores en una misma neurona resulta imprescindible para la interacción entre ambos (Fuxe et al., 2009; Fuxe y Kenakin, 2010; Kenakin et al., 2010).

Para estudiar si los receptores **GALR1, GALR2 y 5HT1A**, no sólo coexisten y colocalizan en las mismas zonas cerebrales sino que se encuentran en estrecha proximidad, se realizan, mediante la técnica de **ligazón por proximidad (PLA)**, experimentos para estudiar la proximidad entre ellos, que posibilitaría la formación de complejos heterodímeros (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2009; Borroto-Escuela et al., 2013). Para ello se realizaron experimentos entre los receptores GALR1 y 5HT1A y entre GALR2 y 5HT1A, para estudiar si existe estrecha proximidad entre estos receptores y poder establecer de forma indirecta, en los distintos núcleos estudiados, una relación de proximidad entre los tres receptores.

Nuestros resultados muestran que los receptores GALR1 y 5HT1A se encuentran en estrecha proximidad en el hipocampo dorsal, en las zonas de CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado así como en el Rafe dorsal, zonas donde se observa señal positiva de PLA. Por otro lado, los experimentos para estudiar proximidad entre los receptores GALR2 y 5HT1A muestran, que al igual que en el caso anterior, existe estrecha proximidad entre los receptores GALR2 y 5HT1A tanto en las zonas CA1, CA2, CA3 y Giro Dentado del hipocampo dorsal como en el núcleo dorsal del Rafe. Además estas zonas coinciden con las descritas anteriormente donde se veía colocación o coexistencia entre los receptores GALR1, GALR2 y 5HT1A, lo cual indica que los receptores no solo se encuentran en los mismo núcleos, sino que se encuentran a una distancia muy próxima, lo que les permitiría interactuar formando un heterodímero (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2009). Basándonos en estos resultados, podemos sugerir la existencia de complejos heterodímeros formados por los receptores GALR1/5HT1A y por los receptores GALR2/5HT1A en el hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe. Además, vemos en los núcleos estudiados, como el receptor GALR1 esta en estrecha proximidad con el 5HT1A al igual que el GALR2 con el 5HT1A y como mostramos en la primer parte de la tesis también se encuentran en proximidad los receptores GALR1 y GALR2, por lo que de forma indirecta podemos sugerir la existencia de un mosaico de receptores formado por GALR1-GALR2/5HT1A, el cual podría explicar la interacción observada entre el fragmento GAL(1-15) y los receptores 5HT1A, tanto a nivel conductual, como a nivel de receptor.

Al cuantificar los complejos en los distintos núcleos (Borroto-Escuela et al., 2012b; Borroto-Escuela et al., 2013), se observa que la cantidad de complejos entre GALR1/5HT1A y entre GALR2/5HT1A no mostraban diferencia en las zonas de CA1, CA2 y DG del hipocampo dorsal. Sin embargo, en CA3 se encontraban más cantidad de complejos GALR1/5HT1A mientras que en el Rafe dorsal el número de complejos GALR2/5HT1A era mayor que de GALR1/5HT1A.

Estos datos pueden sugerir que en las áreas estudiadas podemos encontrar tanto complejos GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A como posiblemente el mosaico GALR1-GALR2/5HT1A.

Para la comprobación de la especificidad de la señal de PLA de nuestros experimentos se analizó el área del Cuerpo Caloso, área que carece de receptores de GAL (O'Donnell et al., 1999), no observándose complejo GALR1/5HT1A ni GALR2/5HT1A, además tampoco se observó señal PLA en la capa molecular del Giro Dentado confirmando la especificidad de la señal.

Por tanto, los resultados obtenidos en esta tesis, muestran la existencia de complejos heterodímeros GALR1/5HT1A en tejido, previamente descrito por nuestro grupo de investigación en cultivo celular (Borroto-Escuela et al., 2010), además del heterodímero GALR2/5HT1A en tejido y sugieren la existencia de un posible mosaico de receptores formado por GALR1-GALR2/5HT1A, lo que permitiría explicar la interacción encontrada entre el fragmento GAL(1-15) y el receptor 5HT1A en pruebas de conducta animal, además de a nivel de receptor en el hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe.

4. Interacción GAL(1-15)/5HT1A en cultivos celulares.

Debido a que encontramos una interacción a nivel de receptor entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A, que se da además del hipocampo dorsal en el núcleo dorsal del Rafe, estudiamos esta interacción en la línea celular RN33B, procedente del núcleo del Rafe.

El modelo celular RN33B, es una línea celular neuronal estable generada de las células embriogénicas medulares del Rafe (Whittemore y White, 1993; Wojciechowski et al., 2002; Lundberg et al., 2002). Se ha comprobado que producen 5HT además de presentar receptores propios de células serotoninérgicas de Rafe como el 5HT1A (Borroto-Escuela et al., 2012a). Esta línea celular procedente del núcleo del Rafe se utilizó en la primera parte de esta tesis, donde mediante inmunofluorescencia se comprobó que presentaba los receptores GALR1 y GALR2. Además, en esta tesis también mediante inmunofluorescencia se ratifica la presencia del receptor 5HT1A, lo cual hace idóneo a este modelo celular para el estudio de la interacción entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A.

Una vez validada la línea celular RN33B para el estudio de la interacción entre la GAL(1-15) y el 5HT1A, estudiamos, mediante la **técnica de ligazón por proximidad**, si los receptores GALR1 y 5HT1A o los receptores GALR2 y 5HT1A se encuentran en estrecha proximidad. Las señales positivas encontradas muestran los posibles heterodímeros GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A en este tipo celular, además como mostramos en la primera parte de esta tesis, también se forman heterodímeros GALR1/GALR2, por lo que podemos sugerir la existencia de mosaicos de receptores GALR1-GALR2/5HT1A. Estos resultados coinciden con los realizados en secciones de tejido, donde se encontraba en el núcleo del Rafe presencia de heterodímeros GALR1/5HT1A y GALR2/5HT1A además de GALR1/GALR2 y donde también se sugería la existencia de un heterotrímero GALR1-GALR2/5HT1A, por tanto la coincidencia entre los resultados encontrados en tejido y en cultivos celulares, refuerzan la hipótesis de la existencia de este mosaico de receptores, además de validar la línea celular RN33B como modelo para el estudio de la interacción entre la GAL(1-15) y el 5HT1A.

Para el estudio de la **interacción entre la GAL(1-15) y el 5HT1A en las células RN33B procedentes del Rafe**, analizamos el efecto que presenta la GAL(1-15) sobre la cantidad del receptor 5HT1A en este tipo celular.

Nuestros resultados muestran que 2 horas tras la estimulación del cultivo de células RN33B con la GAL(1-15) se produce un descenso significativo de la inmunorreactividad del receptor 5HT1A, que resultó ser más potente que el descenso observado tras la estimulación con GAL. Por lo que el fragmento GAL(1-15) produciría un descenso del número de receptores 5HT1A a las 2 horas que sería más potente al descenso producido por la GAL.

En experimentos mostrados en apartados anteriores, demostramos el descenso tanto de la densidad de receptores 5HT1A como de expresión de los mismo en el Rafe dorsal producido por la administración de la GAL(1-15), lo cual coincide con los resultados encontrados en cultivo de células procedentes del Rafe, validando el modelo utilizado. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación muestran en autorradiografía *in vivo*, que dos horas tras la administración de GAL se produce un incremento de la densidad del número de receptores 5HT1A en el núcleo dorsal del Rafe, sin embargo se produce una disminución de la expresión en este mismo periodo (Razani et al., 2000), por lo que podemos pensar que la disminución de expresión del receptor se produciría como mecanismo compensatorio del mantenimiento de este en la membrana, debido a la existencia de un heterodímero formado por receptores de GAL y el 5HT1A (Razani et al., 2000), por tanto esto puede ser lo que observamos en los experimentos realizados en células.

Por tanto, los experimentos realizados en cultivos de células del Rafe RN33B, confirman la existencia de una interacción entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A en este núcleo, donde la GAL(1-15) produciría una disminución a medio plazo tanto del número como de la expresión de los receptores 5HT1A, por lo que apoyaría los efectos funcionales descritos anteriormente en esta tesis, donde la GAL(1-15) potencia los efectos antidepresivos producidos por el receptor 5HT1A. Ya que la activación de los autorreceptores 5HT1A en el Rafe produce una disminución de la tasa de descargas de la célula (Artigas, 2013), lo que se traduce en una reducción de la liberación de 5HT en muchas regiones del cerebro (Hjorth y Sharp, 1991; Adell et al., 1993; Casanovas y Artigas, 1996; Artigas, 2013). Por lo que este receptor estaría relacionando con efectos depresivos (Boldrini et al., 2008; Lemonde et al., 2003; Neff et al., 2009). Por tanto la disminución del receptor 5HT1A presináptico apoyaría un aumento de la conducta antidepresiva.

CONCLUSIONES

- I. La administración Intracerebroventricular de GAL(1-15) induce un efecto prodepresivo y ansiogénico en las pruebas de la natación forzada, campo abierto y tarea de evitación pasiva. Además estos efectos son más potentes que los producido por la molécula completa de GAL.
- II. El efecto prodepresivo y ansiogénico producido por la administración de la GAL(1-15) se bloquea con el antagonista de los receptores GALR2, M871. Además, la reducción de la expresión del receptor GALR2 (Knockdown GALR2) impide el efecto de la GAL(1-15) en las pruebas de comportamiento de depresión y ansiedad.
- III. Los receptores de Galanina GALR1 y GALR2 colocalizan en las zonas del Hipocampo dorsal y en el núcleo dorsal del Rafe, donde además se encuentran a una distancia que permite la formación de complejos heterodímeros. El número de complejos GALR1/GALR2 fue superior en el núcleo del Rafe dorsal que en el Hipocampo dorsal. Además, en ambas zonas, se produce una reducción de los complejos GALR1/GALR2 detectados en tejido de animales Knockdown GALR2.
- IV. En células HEK-293 que coexpresan los receptores de Galanina GALR1 y GALR2, la estimulación con GAL(1-15) induce un mayor aumento en la internalización del receptor GALR1 que el inducido tras la estimulación con GAL. Además, la estimulación con GAL(1-15) produce una reducción en la formación de lisosomas y un aumento del número de endosomas tempranos comparado con la estimulación con GAL.
- V. En la línea celular derivada del núcleo del Rafe RN33B, los receptores de Galanina GALR1 y GALR2 se encuentran a una distancia de entre 10 y 20 nm. La estimulación con GAL(1-15) induce una reducción de la síntesis y almacenamiento de 5HT así como de la expresión de C-Fos de una manera más potente que tras la estimulación con GAL.

- VI. La GAL(1-15) potencia la acción antidepresiva, en la prueba de la natación forzada, del agonista 5HT1A tanto a dosis subumbrales como efectivas. Además esta potenciación del efecto es mayor que la producida por la GAL. La acción de fragmento GAL(1-15) sobre el efecto antidepresivo del agonista 5HT1A se bloquea con el antagonista de los receptores GALR2, M871.

- VII. La GAL(1-15) modula las características y la expresión de los receptores 5HT1A en el hipocampo dorsal y en el núcleo dorsal del Rafe.

- VIII. Los receptores GALR1 y 5HT1A y los receptores GALR2 y 5HT1A se encuentran a una distancia que permite la interacción física entre receptores en las zonas del Hipocampo dorsal y en el núcleo dorsal del Rafe.

- IX. En las células RN33B, los receptores de GALR1 y 5HT1A y los receptores GALR2 y 5HT1A se encuentran en estrecha proximidad. La estimulación con GAL(1-15) induce una reducción de la expresión del receptor 5HT1A de una manera más potente que la GAL.

- X. Todos estos resultados sugieren que la GAL(1-15) participa en los mecanismos de control de la ansiedad y depresión disminuyendo la actividad celular y la síntesis y almacenamiento de 5HT de las células del Rafe dorsal. La GAL(1-15) actuaría a través de heterodímeros GALR1/GALR2 que tiene un patrón de internalización diferente a los receptores de forma aislada.

- XI. Además, los resultados de este trabajo sugieren la existencia de una interacción entre la GAL(1-15) y el receptor 5HT1A en el hipocampo dorsal y el núcleo dorsal del Rafe que sería responsable de la potenciación del efecto antidepresivo del agonista 5HT1A inducido por la GAL(1-15). El mecanismo molecular de esta interacción podría implicar la formación de mosaicos de receptores entre los receptores GALR1/GALR2-5HT1A.

SUMMARY

A Role for Galanin N-Terminal Fragment (1–15) in Anxiety- and Depression-Related Behaviors in Rats.

INTRODUCTION

Mood disorders, including depression and anxiety, are among the most prevalent mental illnesses with high socioeconomic impact (Gelenberg, 2010; Wittchen et al., 2011). According to the World Health Organization, between 10% and 15% of the general population will experience a clinical depressive episode in their lifetime (Wittchen et al., 2011). Although it is clear that these illnesses result from, and can result in, changes in the neuroanatomy of the brain, the underlying mechanisms have not yet been clearly defined. In the last decade the importance of the role of neuropeptides, including Galanin, and/or their receptors in the treatment of stress-related mood disorders is becoming increasingly apparent (Kormos and Gaszner, 2013).

Galanin (GAL) is a neuropeptide (Tatemoto et al., 1983) widely distributed in neurons within the Central Nervous System (CNS) (Jacobowitz et al., 2004). Three GAL receptor (GALR) subtypes, GALR1-3, with high affinity for GAL have been cloned (Branchek et al., 2000; Mitsukawa et al., 2008). GALR1 and GALR2 are found in many regions of the CNS as demonstrated with *in situ* hybridization, radioligand binding and immunohistochemical studies (Jacobowitz et al., 2004). GALR1 and GALR3 mainly activate inhibitory G proteins Gi/Go, while GALR2 mainly couples to Gq/G11 to mediate excitatory signaling (Wang et al., 1997; Branchek et al., 2000)

These three GALR subtypes are involved in a number of central functions modulating neuroendocrine, pain control, cardiovascular, addiction, food intake and seizure threshold (Mitsukawa et al., 2008; Diaz-Cabiale et al., 2010; Picciotto, 2010). GAL is also involved in mood regulation including depression and anxiety-like behaviors. GAL-overexpressing mice and rodents in which GAL was infused either intraventricularly (i.c.v) or into the ventral tegmental area show an increase in the immobility during the forced swimming test (FST) indicative of depression-like behavior (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2005; Kuteeva et al., 2007). Also, in a genetic rat model of depression, the Flinders Sensitive Line, an up-regulation of the GALR binding sites is found in the dorsal raphe nucleus linked to high immobility in the FST (Bellido et al., 2002). However, intra peritoneal (i.p.) injections of GalR2 agonists exhibit anti-depressant-like effects and two non-selective GALR agonists, galnon and galmic, decreased immobility time in the FST (Bartfai et al., 2004; Lu et al., 2005). These discrepancies may be attributed to the different physiological roles of the GALR

subtypes. I.c.v. infusion of a GALR1 agonist (M617) or a GALR2 antagonist (M871) elevated immobility time, while the GALR2 agonist (AR-M1896) produced an antidepressant-like effect in the rat FST (Kuteeva et al., 2008). Furthermore, administration of GALR3-selective antagonists to rats and mice produced antidepressant-like effects in both FST and the tail suspension test (TST) (Swanson et al., 2005; Barr et al., 2006). In view of these results it has been proposed that activation of GALR1 and GALR3 results in a depression like behavior while stimulation of GALR2 leads to anti-depressant-like effects.

The role of GAL in anxiety-like behaviors depends on the route and site of drug administration, and also on the intensity of stress-conditions (Holmes et al., 2003; Holmes and Picciotto, 2006). For instance, i.c.v GAL produced an anxiolytic-like effect in rats in the Vogel conflict test (Bing et al., 1993) whereas intra-amygdala microinjection induced the opposite effect on the same task (Moller et al., 1999). However, intra-amygdala administration of GAL did result in anxiolytic-like effects in animals tested under heightened stress conditions in the elevated plus maze (Morilak et al., 2003; Barrera et al., 2005) suggesting that GAL may be involved mainly under high-stress and silent otherwise (Karlsson et al., 2005). The varying effects of GAL on anxiety-related behaviors may also partly stem from actions of GAL at differentially distributed GALR subtypes (Holmes and Picciotto, 2006; Bailey et al., 2007). GALR1 knockout mice exhibit increased anxiety in the elevated plus-maze (Holmes et al., 2003) and GALR2 knockout mice show anxiety-like behavior or no effect depending on the genetic background of the mutants (Bailey et al., 2007; Lu et al., 2008). In contrast, an antagonist of GALR3 produces anxiolytic-like effects in several behavioral tests (Swanson et al., 2005).

Not only GAL but also the Galanin N-terminal fragments like GAL(1-15) have been shown to be active in the CNS. For example both GAL and GAL(1- 15) molecules have specific roles in cardiovascular regulation and interact differently with other neuropeptides (Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2007). The three cloned receptors show a higher affinity for GAL than for GAL(1-15) (Branchek et al., 2000) but the demonstration of specific GAL(1-15) binding sites in the rat brain emphasizes the powerful role of GAL fragments in GAL communication, especially in dorsal hippocampus, neocortex and striatum (Hedlund et al., 1992).

In agreement with above only GAL(1-15) but not GAL can antagonistically modulate the serotonin 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus and this effect was blocked by a known GAL receptor antagonist M35 (Hedlund et al., 1994). Also in the ventral limbic cortex N-terminal GAL fragments can more strongly and more potently reduce postjunctional 5-HT_{1A} receptor recognition than GAL, where also high affinity GAL receptors exist (Diaz-Cabiale et al., 2000).

The purpose of the present study was to assess the role of GAL(1-15) in mood regulation using behavioral test of anxiety and depression in rats. Additionally, we analyze with the proximity ligation assay (Trifilieff et al., 2011; Borroto- Escuela et al., 2013), the proximity of GALR1 and GALR2 in the dorsal hippocampus and dorsal raphe nuclei showing specific GAL(1-15) binding (Hedlund et al., 1992) since GALR1-GALR2 heteroreceptor complex may exist in areas selectively enriched in GAL(1-15) binding sites (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012). Therefore, we tested the involvement of the GALR2 in the GAL(1- 15) effect with the selective GALR2 antagonist M871 and with an in vivo model of siRNA GALR2 knockdown rats. The effects of GAL(1-15) vs GAL were analyzed on 5-HT IR in the rat medullary raphe-derived cell line RN33B to compare the actions of these two GAL peptides on 5-HT mechanisms on the RN33B cells which may be of relevance for their actions on the dorsal raphe 5- HT nerve cells.

RESULTS

Behavioral studies

GAL(1-15) induced a depression and anxiogenic-like effect in the behavioral tests

In the FST, rats were pre-exposed to water for 15 minutes. 24 hours later the immobility, climbing as signs of depression-like behavior were analyzed during a second 5 min exposure to water. GAL(1-15) at 3nmol significantly increased the immobility ($t=4.071$, $p<0.001$, $df=13$) and decreased the climbing ($t=3.857$, $p<0.01$, $df=12$) behavior by 44% and 46% respectively (Figure 1). These results indicate that GAL(1-15) evokes a strong depression-like behavior. Similar results were obtained at the dose of 6nmol, GAL(1-15) also significantly increased the immobility ($t=4.97$, $p<0.001$, $df=13$) and decreased the climbing ($t=4.815$, $p<0.01$, $df=12$) behavior (Figure 1).

To assess the role of GAL(1-15) in the regulation of anxiety related behaviors, the time spent in and numbers of entries into the central square were examined in the open field. GAL(1-15) at the dose of 3 nmol induced an anxiogenic-like effect since it significantly decreased the entries ($t=3.379$, $p<0.01$, $df=16$) and the time spent ($t=2.318$, $p<0.05$, $df=13$) into the central square in the open field by 42% and 39% respectively (Figure 1). GAL(1-15) lacked effects at the doses of 1nmol or 6 nmol (Figure 1).

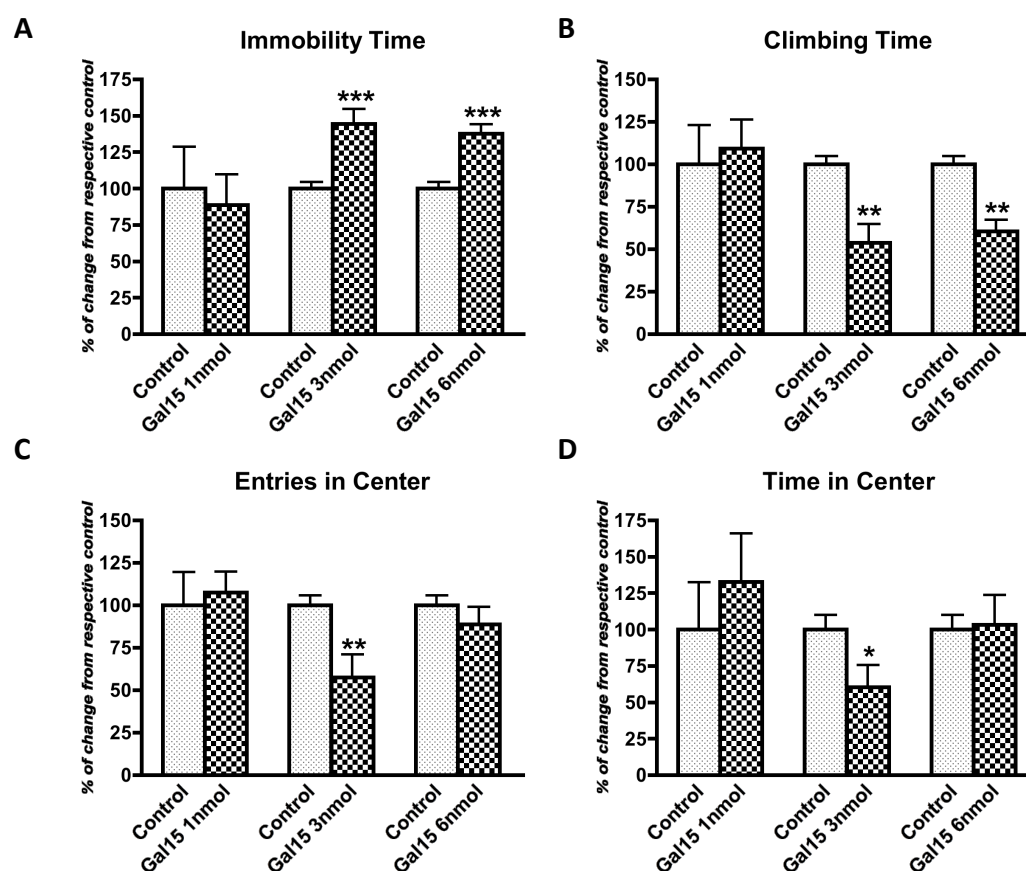


Figure 1. Dose-Response curve of Galanin (1-15)[Gal15] in the Forced Swimming Test (A,B) and Open Field Test (C,D) in rats. Gal15 (1; 3 or 6 nmol/rat) was administered via chronical cannula into the lateral ventricle 15 min before the tests. Cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Vertical bars represents mean \pm SEM of percentage of change from respective controls of time for immobility or climbing (A,B) and number of entries or time in central square (C,D) during a 5 min test period (6-12 animals per groups). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus respective control according to Student's t-test.

These anxiogenic-like effects were independent of the locomotor activity, since the total distance reached and speed were equivalent between all the groups (Table I).

Locomotor parameters	Control	Gal15 1nmol	Gal15 3nmol	Gal15 6nmol
Total Distance Travelled (cm)	3209 \pm 113,9	3458 \pm 159,1	3532 \pm 255,8	3058 \pm 232,5
Mean Speed (cm/s)	10,7 \pm 0,4	11,5 \pm 0,5	11,7 \pm 0,8	10,2 \pm 0,8

Table 1. Analysis of locomotor activity parameters in the Open Field Test. n=6-14 animals in each test group. Data shown as Mean \pm SEM. No differences were found according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

Comparison between GAL and GAL(1-15)

In the FST, the overall one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment for immobility (one-way ANOVA, $F_{2,26}=12.8$, $p<0.001$). The increase in the immobility induced by GAL(1-15) was significantly higher than the one induced by GAL (Newman-Keuls post-hoc test: $p<0.01$; Figure 2A). In the climbing behavior we observed the same pattern of response (one-way ANOVA, $F_{2,26}=7.6$, $p<0.01$), GAL(1-15) induced a significantly stronger decrease in climbing response compared with GAL (Newman-Keuls post-hoc test: $p<0.05$; Figure 2B).

In the open field, in agreement with other authors the dose of 3nmol of GAL lacked effect on the time spent in and numbers of entries into the central square in the open field (Figure 2C,D). In view of the fact that GAL(1-15) 3nmol significantly decreased the time ($t=2.318$, $p<0.05$, $df=13$) and numbers of entries ($t=3.379$, $p<0.01$, $df=16$) in the open field, our results indicate that only GAL(1-15) and not GAL modifies the anxiety parameters in the present model.

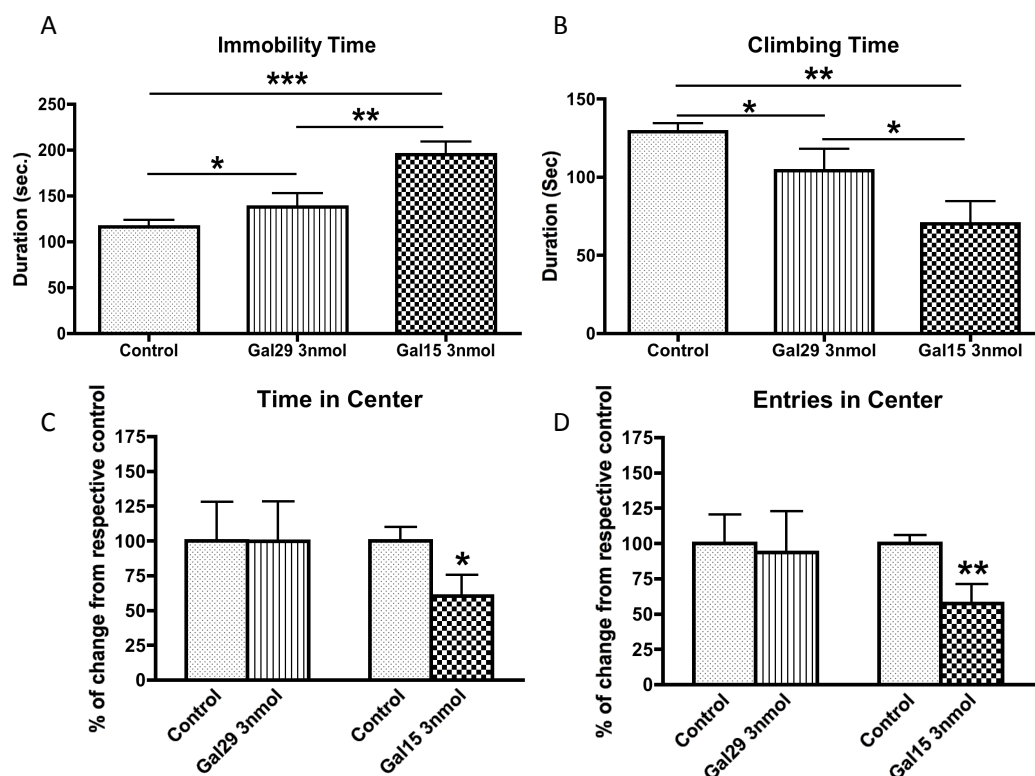


Figure 2. Behavioral effect of administration of Galanin (Gal29) and Galanin(1-15) [Gal15] in the Forced Swimming Test (A,B) and Open Field Test (C,D) in rats. Gal29 (3nmol/rat) and Gal15 (3nmol/rat) were administered via chronical cannula into lateral ventricle 15 min before the test. Cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Values, indicated as mean \pm SEM, represent time of immobility and climbing in FST (A,B) and percentage of change from respective controls of entries and

time in center in open field test (C,D) during a 5 min test period (6-15 animals per group). (A,B) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test. (C,D) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus respective control according to Student's t-test.

GALR2 antagonist M871 induced blockade of the behavioral effects of GAL(1-15)

In the FST, GALR2 antagonist M871 blocked significantly the increased immobility (one-way ANOVA, $F_{3,32}=10.38$, $p < 0.001$, Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.01$) and decreased climbing (one-way ANOVA, $F_{3,32}=4.535$, $p < 0.01$, Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.05$) induced by GAL(1-15) (Figure 3A).

The GALR2 antagonist M871 alone in the dose of 3nmol lacked effects with respect to immobility or climbing time (Figure 3B).

In the open field the same type of change was observed. GALR2 participates in the effect induced by GAL(1-15) since the GALR2 antagonist M871 significantly blocked the decreased of number of entries (one-way ANOVA, $F_{3,29}=10.6$, $p < 0.001$, Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.05$) and time spent into the central square (one-way ANOVA, $F_{3,26}=4.03$, $p < 0.05$, Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.05$) mediated by GAL(1-15) (Figure 3C,D). In this test M871 significantly increased the number in the entries (Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.01$) but not the time spent into the central square in the open field (Figure 3C,D).

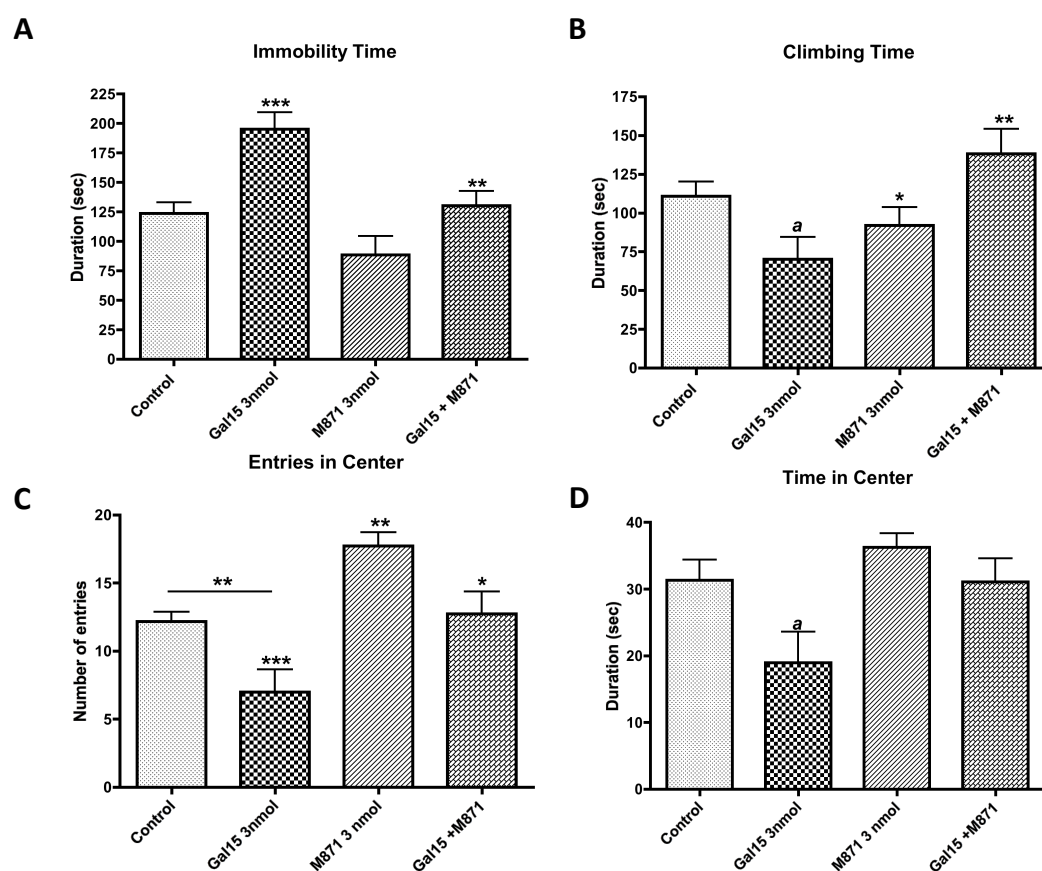
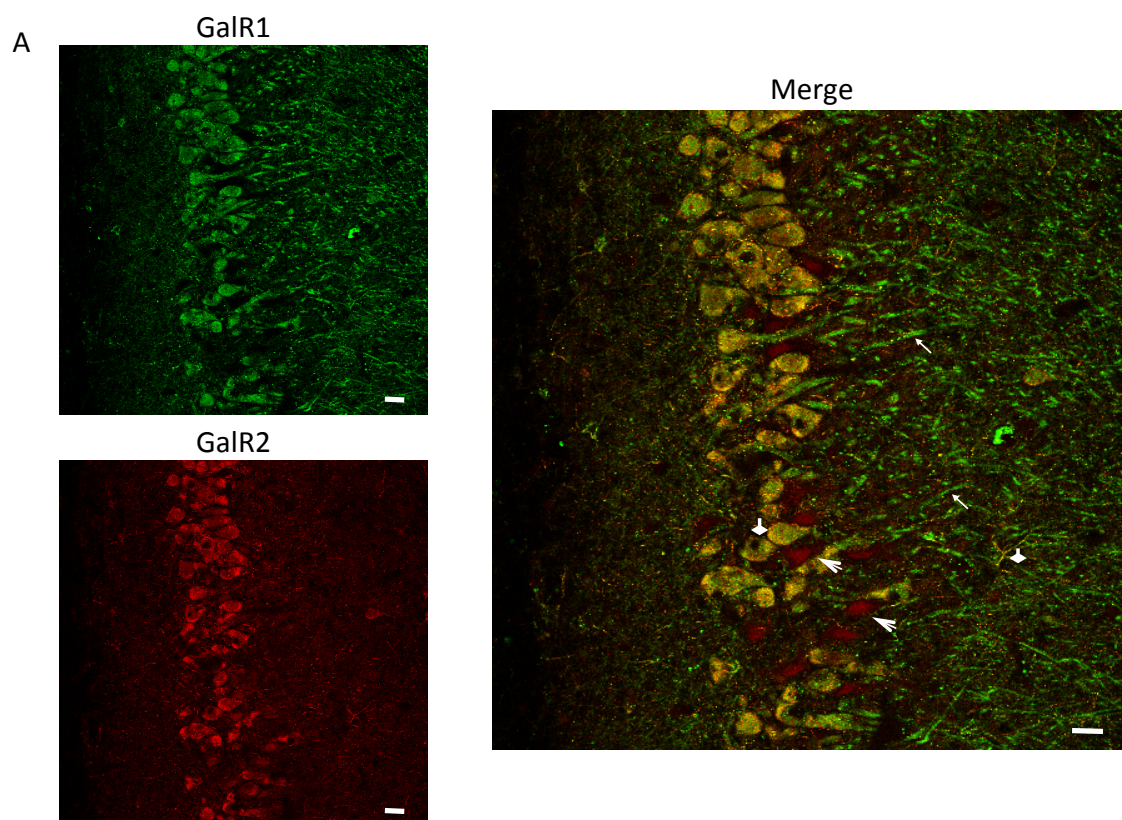


Figure 3. Behavioural effects of the coadministration of GalR2 antagonist M871 (3nmol/rat) and an effective dose of Galanin(1-15) [Gal15] (3nmol/rat) in the Forced Swimming Test (FST) (A,B) and Open field test (C,D). Treatments were injected via chronical cannula into lateral ventricle 15 min prior the tests. Cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Data represents mean \pm SEM of immobility and climbing time in FST (A,B) and entries and time in center in open field test (C,D) during the 5 min test period (6-14 rats per group). (A,B) * $p < 0.05$ versus Gal15+M871; ** $p < 0.01$ versus Gal15 group; *** $p < 0.001$ versus Control and M871 group; ^a $p < 0.05$ versus Control group. (C,D) * $p < 0.05$ versus Gal15; ** $p < 0.01$ versus Control and versus Gal15+M871; *** $p < 0.001$ versus M871; ^a $p < 0.05$ versus rest of the groups according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

Neurochemical studies

GALR1 and GALR2 are in close proximity in the dorsal raphe nucleus and in the dorsal hippocampus as shown with the proximity ligation assay

Positive results were obtained with the in situ proximity ligation assay (PLA) indicating the formation of GALR1/GALR2 heteroreceptor complexes. This was supported by studies using double immunolabeling which demonstrated colocalization of GALR1 and GALR2 IR in the nerve cells of the dorsal raphe nucleus and of the dorsal hippocampus (Figure 4A,B).



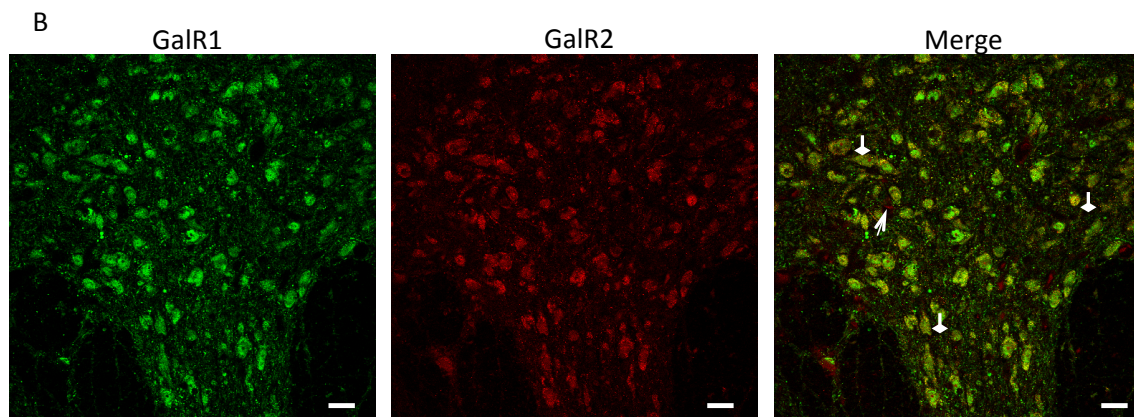


Figure 4. Galanin Receptor 1 and Galanin Receptor 2 colocalizes in neurons of rat dorsal Hippocampus and dorsal Raphe. Double-immunolabeled for Galanin receptor 1 (GalR1) (green, arrows) and Galanin receptor 2 (GalR2) (red, arrowhead) in (A) dorsal Hippocampus and (B) dorsal Raphe. The colocalization of GalR1 and GALR2 is shown in the merge (orange-yellow, rhombus). Scale bar, 20 μ m.

In Figure 5A large numbers of the Ammon's horn 1, 2 and 3 (CA1, CA2 and CA3) and Dentate Gyrus of the dorsal hippocampus and the dorsal raphe showed a significant number of red clusters (blobs) representing positive PLA signals. The quantification of PLA in these areas demonstrated that the highest number of PLA clusters were present in the cytoplasm of nerve cells of the dorsal raphe (one-way ANOVA, $F_{4,35}=26.57$, $p<0.001$, Newman-Keuls post- hoc test: $p<0.001$; Figure 5B).

The specificity was demonstrated by the fact that no PLA clusters were observed in lateral corpus callosum (Figure 5A), an area that seems to lack of GALR2 receptor (O'Donnell et al., 1999). The fact that we did not observed PLA positive signal in the molecular layer of the Dentate Gyrus confirm the specificity of the signal (Figure 5A). The results obtained in the dorsal raphe were validated in PLA experiments on raphe RN33B cells (see below).

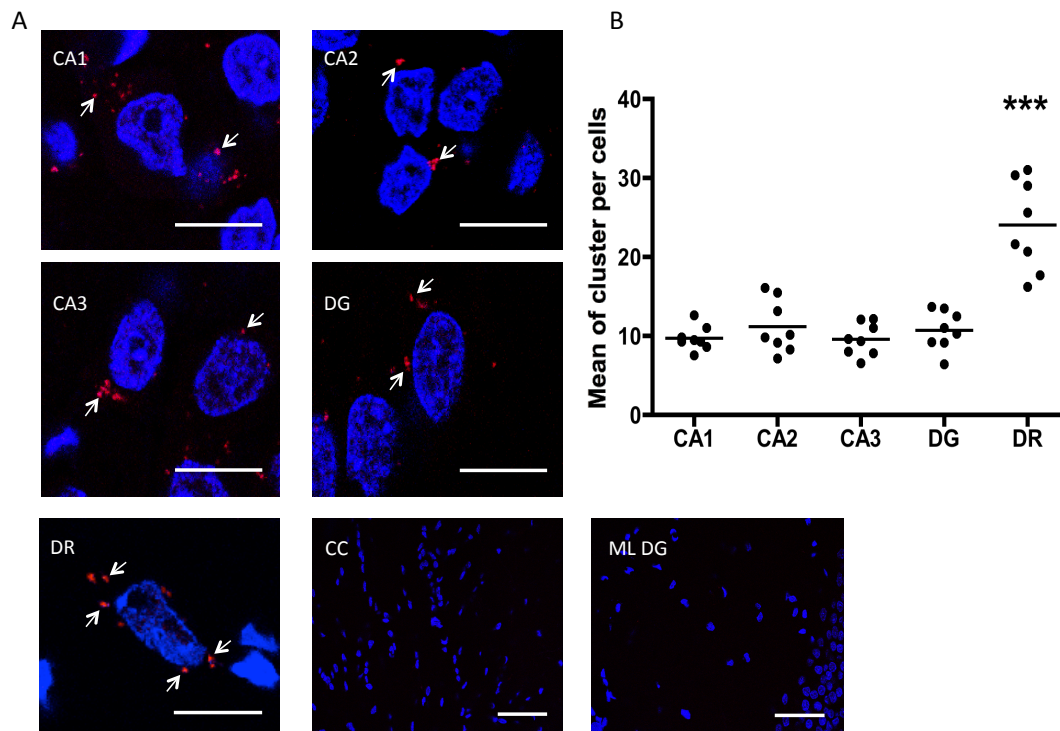


Figure 5. Close proximity between GalR1-GalR2 is detected by *in situ* proximity ligation assay (PLA) (seen as red clusters indicated by arrows) in dorsal rat Hippocampus and dorsal Raphe nucleus. *In situ* PLA was performed using primary antibodies of different species directed to GalR1 and GalR2 followed by PLA reagents. (A) Representatives photographs for positive PLA regions (Ammon's horn 1, 2 and 3 (CA1, CA2 and CA3) Dentate Gyrus (DG) and Dorsal Raphe nucleus (DR)) and for negative PLA region (Corpus callosum (cc) and Molecular layer of DG (ML DG)). (B) Quantification of red clusters/DAPI-positive nuclei. Quantification was made in 10-20 cells per photo and performed 8 photos per brain zone. Thus each point in the scatter plot represent the mean between 10-20 cells (80-160 cells per zone). The line in each group represent the mean value. *** $P < 0.001$ versus rest of the groups according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test. Nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar, 10 μm and 50 μm in cc and ML DG photographs.

siRNA GALR2 knockdown in rats validates the involvement of GALR1- GALR2 heteroreceptor complexes in the behavioral and neurochemical effects induce by GAL(1-15)

Behavioral tests

To verify the Acell system employed, we generated siRNA-Control rats (Acell Non-targeting pool) and vehicle rats (Acell siRNA Delivery Media). We did not observe any difference between these groups compared to aCSF normal rats in any behavioral test.

Down regulation of GALR2 by siRNA did not affect any parameter of the behavioral tests neither in the FST nor in the open field (Figure 6). However the decrease in GALR2 was sufficient to block the effect of GAL(1-15) in the siRNA GALR2 knockdown rats (Figure 6). Thus, GAL(1-15) at the dose of 3nmol lacked effect on the immobility

(one-way ANOVA, $F_{2,18}=0.743$, $p=0.48$), climbing (one-way ANOVA, $F_{2,18}=0.426$, $p=0.65$) and swimming time (one-way ANOVA, $F_{2,17}=0.923$, $p=0.41$) in the FST (Figure 6A,B,C). The same effect was observed in the number of the entries (one-way ANOVA, $F_{2,17}=0.517$, $p=0.6$) and in the time spent into the central square (one-way ANOVA, $F_{2,16}=0.253$, $p=0.77$) in the open field (Figure 6D,E).

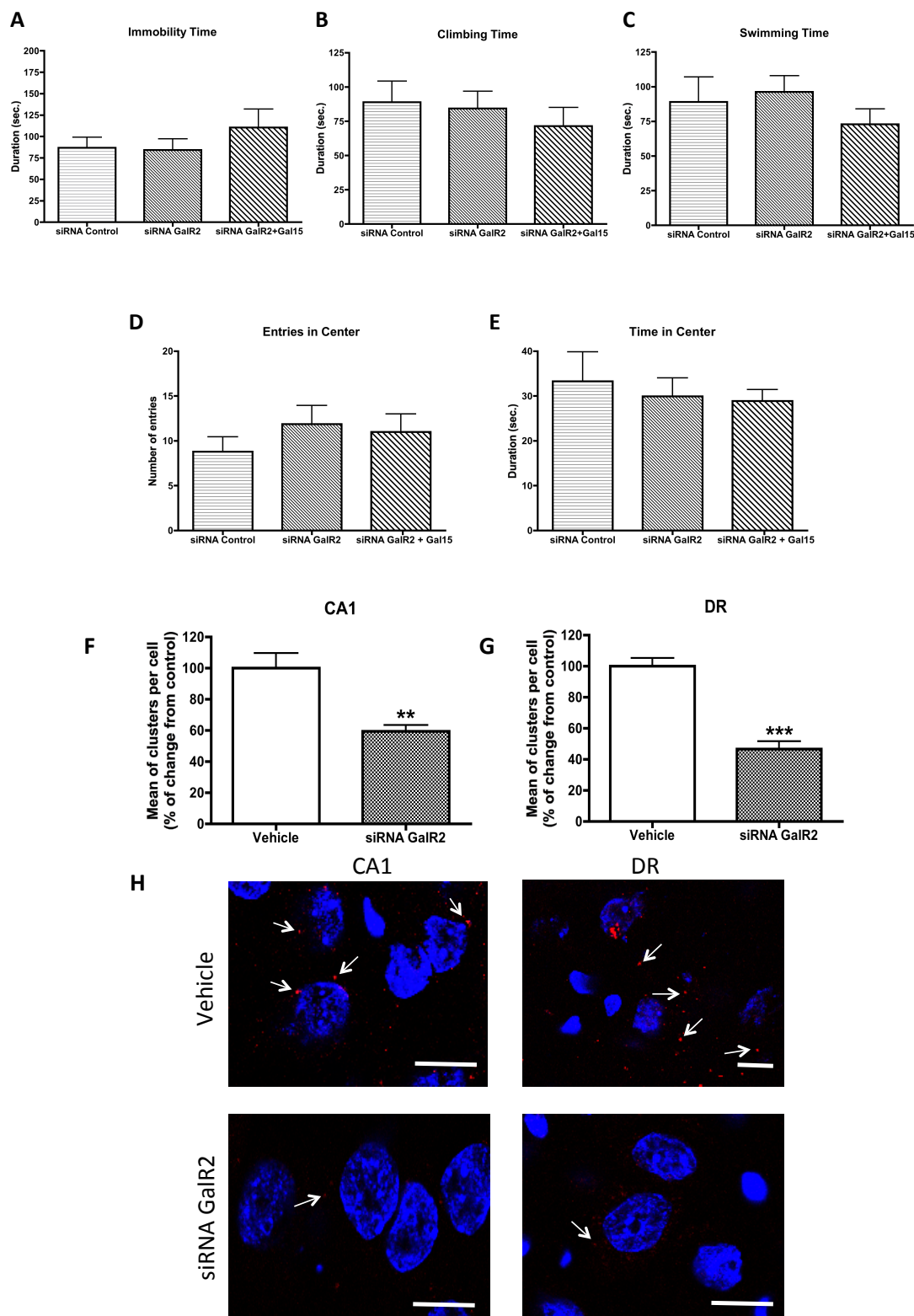


Figure 6. Analysis of Galanin(1-15) [Gal15] in GalR2 knockdown rats in the Forced Swimming Test (FST) and Open field test or in the detection of close proximity between GalR1-GalR2 in rat brain. (A,B,C,D,E) Behavioural effects of effective dose of Gal15 (3nmol/rat) in GalR2 knockdown in FST and Open field test. Treatments were injected via chronical cannula into lateral ventricle 15 min prior the tests. siRNA control injected rats were used as control group. Data represents mean \pm SEM of immobility, climbing and swimming time in FST (A,B,C) and entries and time in center in open field test (D,E) during the 5 min test period (6-14 rats per group). No differences were found according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test. (F,G,H) Detection of close proximity between GalR1-GalR2 in dorsal hippocampus and dorsal raphe in GalR2 knockdown rats by *in situ* proximity ligation assay (PLA). (F,G) Quantification of red clusters/DAPI-positive nuclei in dorsal Hippocampus (CA1) and dorsal Raphe, 9 days after of single icv injection of siRNA GalR2 or vehicle. Vertical bars represents mean \pm SEM of percentage of change from respective controls. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus respective control according to Student's t-test. (H) Representatives photographs for decrease of detection of cytoplasmatic GalR1-GalR2 PLA (seen as red clusters indicated by arrows) in dorsal Hippocampus (CA1) and dorsal Raphe in GalR2 knockdown rats by *in situ* PLA; Nuclei are shown in blue(DAPI). Scale bar, 10 μ m.

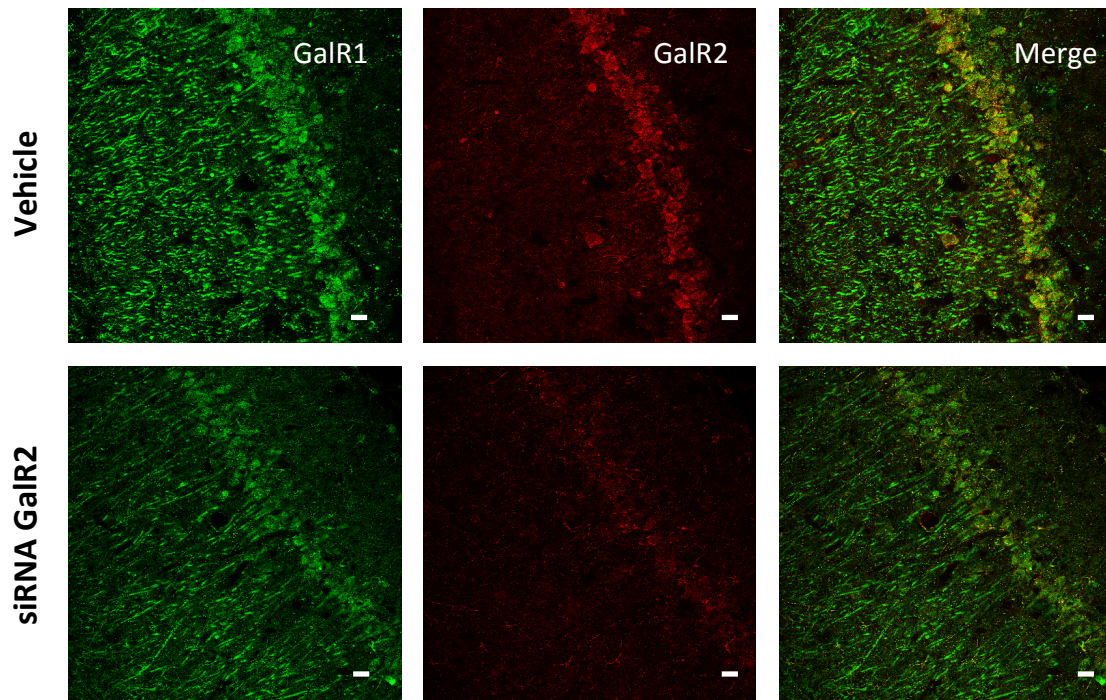
Proximity ligation assays

In the siRNA GALR2 treated animals PLA positive red clusters (blobs) were still observed in the dorsal hippocampus and dorsal raphe (Figure 6H). However the quantification of PLA shows a reduction of around 40 % ($t=3.174$, $p < 0.01$, $df=19$) in nerve cells of the CA1 area and 60% ($t=7.325$, $p < 0.001$, $df=14$) of the dorsal raphe compared with the vehicle group (Figure 6F,G).

These results confirm that the PLA signal obtained is specifically due to the GALR1-GALR2 complex.

In agreement with these results, the colocalization of GALR1 and GALR2 immunoreactivities was reduced in siRNA GALR2 in the dorsal raphe and also in the dorsal hippocampus (Figure 7).

A



B

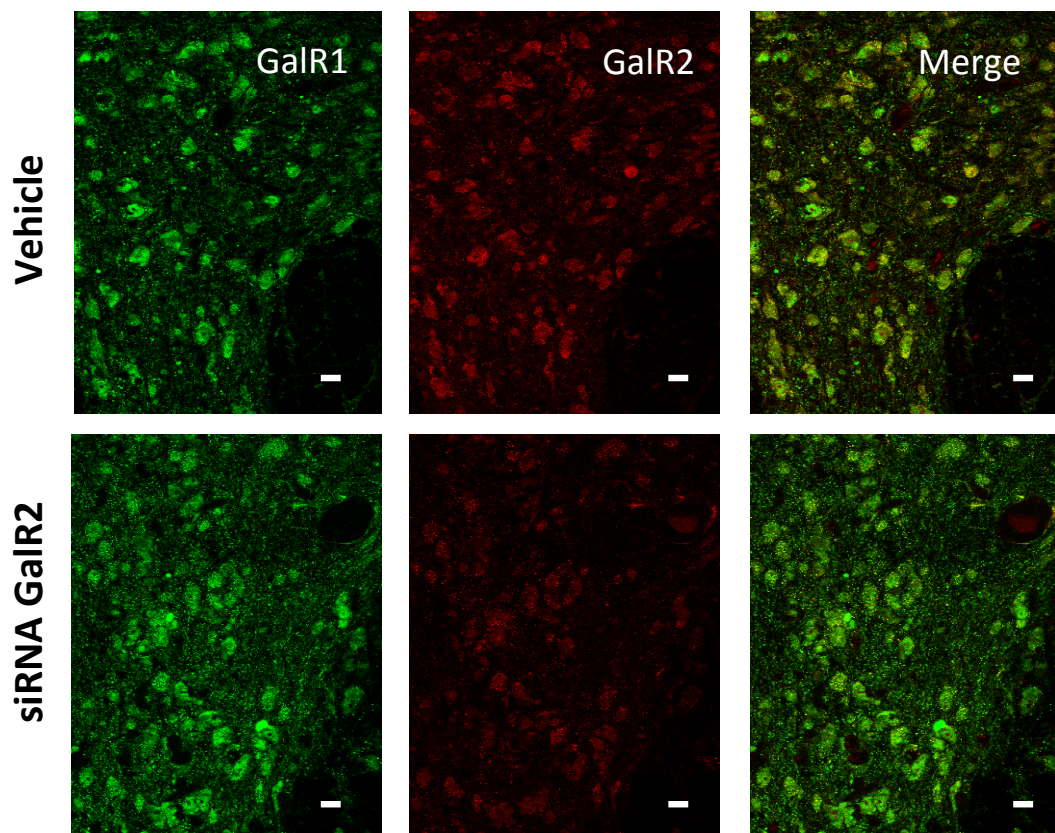


Figure 7. Representative laser scanning confocal micrographs illustrating the decrease of Galanin receptor 2 (GalR2) immunoreactivity in GalR2 knockdown rat at dorsal hippocampus and dorsal Raphe.

Double-immunolabeled for Galanin receptor 1 (GalR1) (green) and Galanin receptor 2 (GalR2) (red) in rat (A) dorsal Hippocampus and (B) dorsal Raphe, 9 days after of single icv injection of siRNA GalR2 or vehicle. Escale bar, 20 μ m.

GAL(1-15) produced a different vesicular trafficking than GAL in HEK-293 cells co-transfected with GALR1-YFP and GALR2

The GAL(1-15) effects were also examined on the GALR1-YFP internalization by immunofluorescence microscopy in transiently cotransfected HEK-293 cells with YFP-tagged GALR1 and GALR2. HEK-293 cells coexpressing GALR1-YFP and GALR2 were incubated with GAL(1-15) or GAL at 37°C for 120 min to monitor receptor internalization (Figure 8).

After incubation with GAL(1-15), GALR1-YFP was dramatically reduced at plasma membrane and internalized into numerous vesicles in the cytoplasm along to 120 min to monitor receptor internalization. The internalization began as early as 10 min after ligand addition with a maximum point at 30 min where the intensity of intracellular GALR1-YFP was increased by 30 % and continued at 120 min (Figure 8A). On the contrary, the incubation with GAL produced less internalization of GALR1-YFP, being found predominantly in the plasmatic membrane (Figure 8).

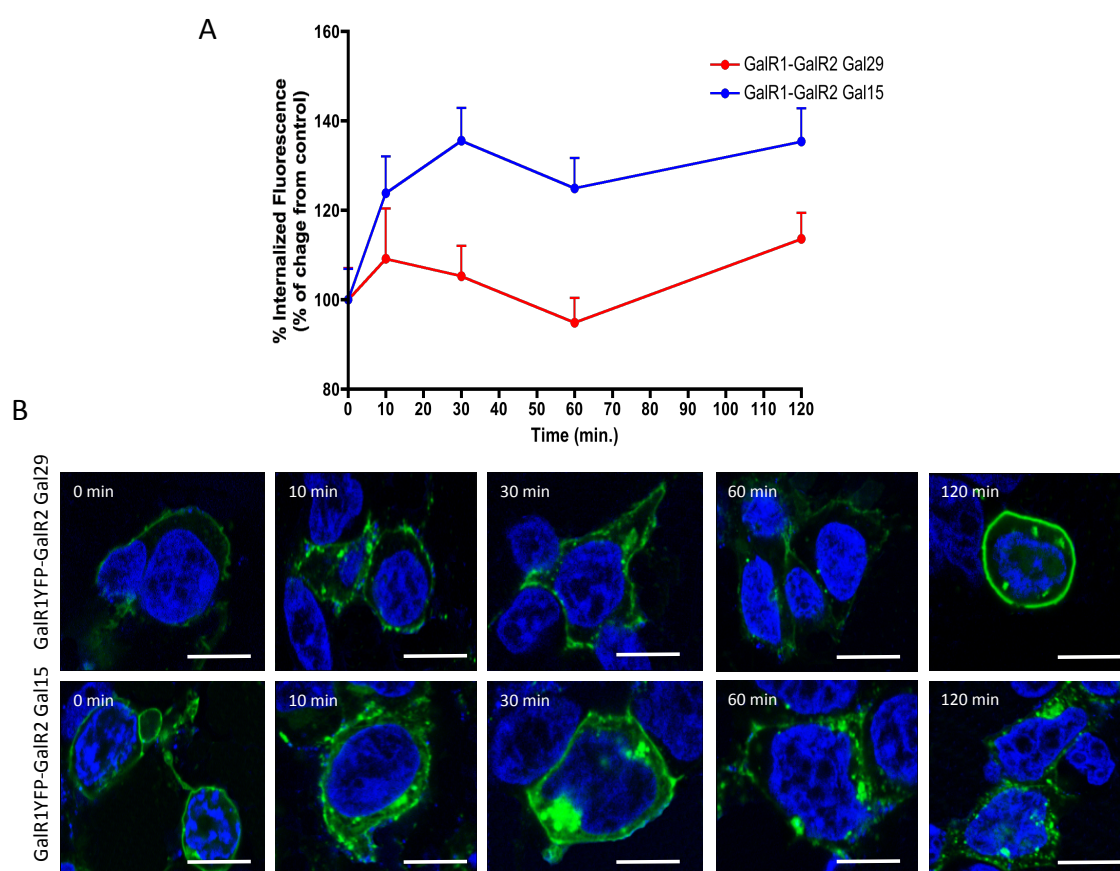


Figure 8. Confocal imaging of GalR1-YFP in cells co-transfected with GalR1-YFP and GalR2 after incubation with Gal29 or Gal15. HEK293 cells co-transfected with GalR1-YFP and GalR2 were incubated with Gal29 (500nM) or Gal15 (500 nM) for period of 10, 30, 60 and 120 min before fixation and visualization by confocal microscopy. Representative images of GalR1-YFP receptor fluorescence (green) are shown (B). Quantification of time course of fluorescence translocation of plasma membrane to interior of the cell after agonist stimulation are shown (A). Data represent mean \pm SEM of percentage of change from control of % internalized fluorescence. Nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar, 10 μ m.

In the early endosome formation we observed the same pattern of response, the incubation with GAL(1-15) of cells co-transfected with GALR1-YFP/GALR2/Rab5-RFP produced a stronger increase of the number of early endosomes compared with GAL (Figure 9A,B). Addition of GAL(1-15) induced a rapid increase of the number of vesicles that contains Rab5-RFP with an increase of around 100% of number of early endosomes with a maximum point at 60 min. However, the formation of lysosomes was similar after the incubation with GAL(1-15) or GAL, in both cases, the amount of vesicles with LAMP-RFP was very low (Figure 9C,D).

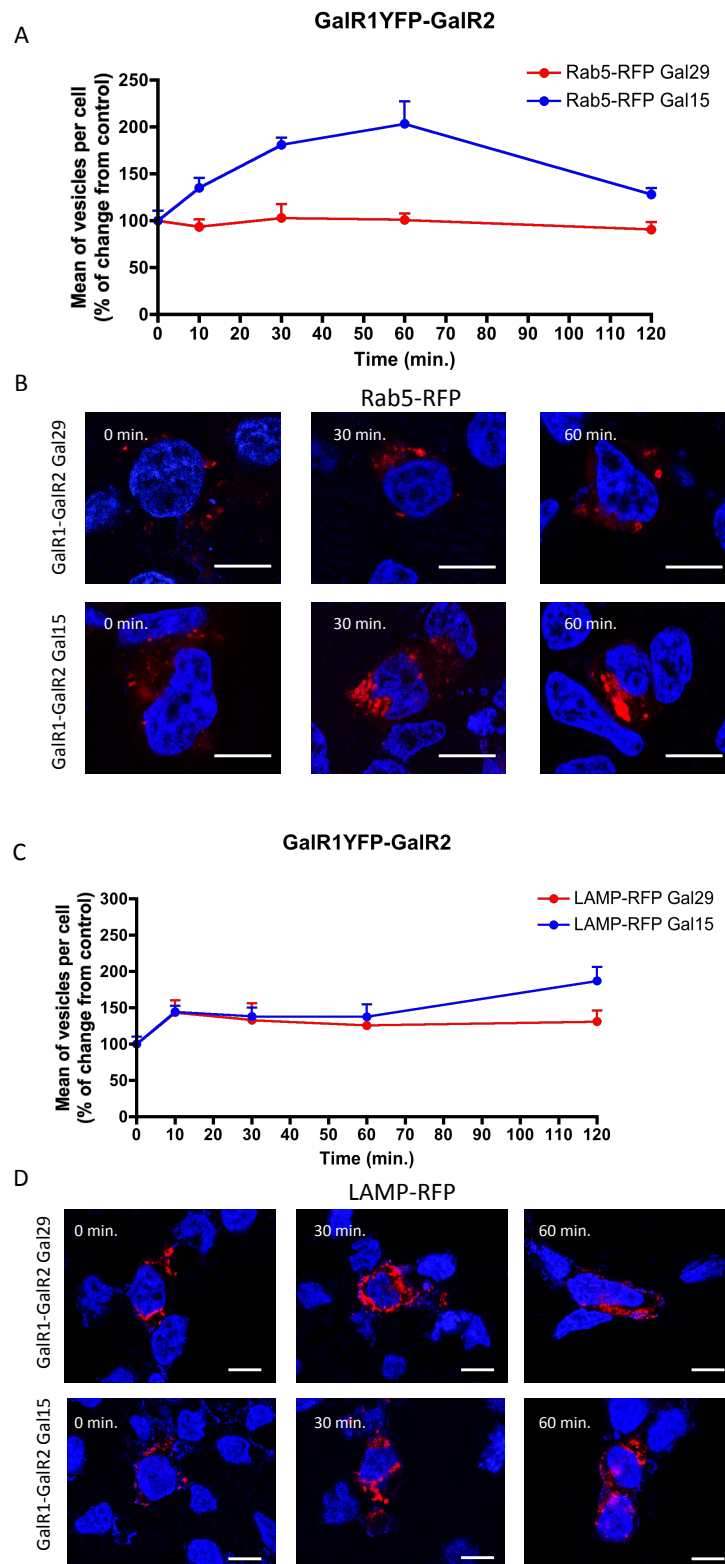


Figure 9. Confocal microscopy of agonist-induced Early Endosomes formation in cells co-transfected with GalR1-YFP/GalR2/Rab5-RFP (A,B) and Lysosomes formation in cells co-transfected with GalR1-YFP/GalR2/LAMP-RFP (C,D) after incubation with Gal29 or Gal15. HEK293 cells co-transfected with GalR1-YFP/GalR2/Rab5-RFP (A,B) or co-transfected with GalR1-YFP/GalR2/LAMP-RFP (C,D) were incubated with Gal29 (500nM) or Gal15 (500 nM) for period of 10, 30, 60 and 120 min before fixation and visualization by confocal microscopy. Rab5-RFP was used as early endosome marker and LAMP-RFP

was used as Lysosomes marker. Quantification of Early Endosomes (A) and Lysosomes (C) as red vesicle/DAPI-positive nuclei of the cell after agonist stimulation are shown. Data represent mean \pm SEM of percentage of change from control of mean of vesicles per cell. Representative images of Early Endosomes (red vesicles) (B) or Lysosomes (D) in cells are shown. Nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar, 10 μ m.

GAL(1-15) decreased the 5-HT immunoreactivity in Raphe RN33B cells

The presence of GALR1 and GALR2 in raphe RN33B cells was established with immunohistochemical techniques. Moreover, PLA positive clusters were detected within them which supports the presence of GALR1/GALR2 heteroreceptor complexes in these cells and the validity of these cells as a target for GAL(1-15) (Figure 10A).

In the semiquantitative image analysis, the one-way ANOVA showed a significant effect in 5-HT immunoreactivity after GAL and GAL(1-15) treatment (one-way ANOVA, $F_{2,147} = 63.85$, $p < 0.001$). The incubation with GAL caused a significant (Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.001$) decrease in the 5-HT immunoreactivity in RN33B cells (Figure 10B,C). GAL(1-15) also significantly decreased (Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.001$) the 5-HT immunoreactivity in these cells. This reduction was significantly stronger (Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.001$) than the one induced by GAL (Figure 10B,C).

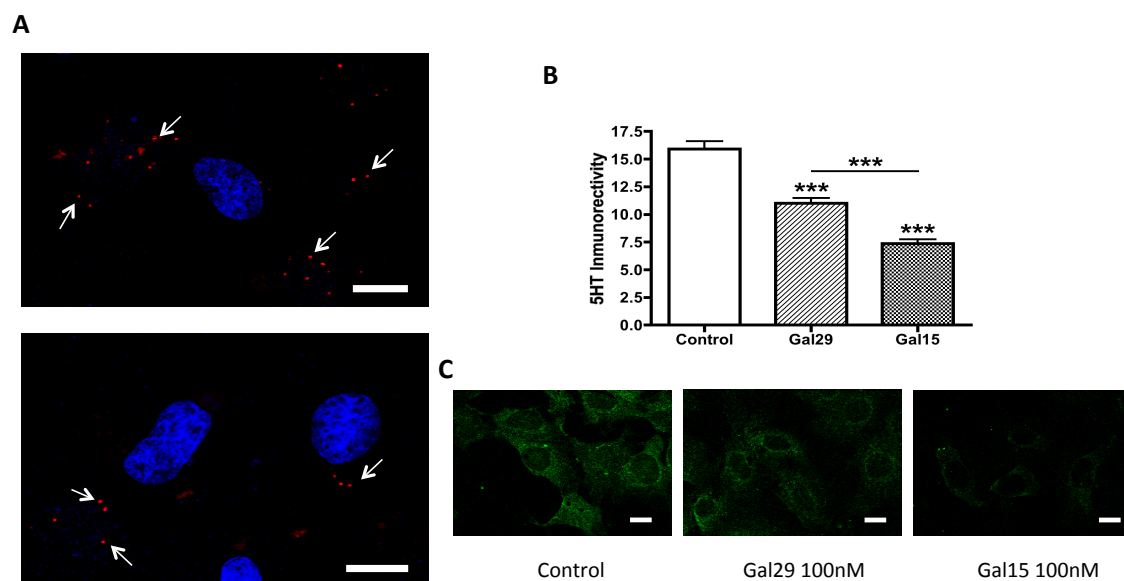


Figure 10. Close proximity between Galanin receptor 1 (GalR1) and Galanin receptor 2 (GalR2) and their effects in 5-HT synthesis and storage in RN33B cells. (A) Detection of close proximity between GalR1-GalR2 receptors (seen as red clusters indicated by arrows) in RN33B cells by *in situ* PLA; Nuclei are shown in blue (DAPI). Scale bar, 10 μ m. (B) Quantification of 5-HT immunoreactivity [5-HT immunoreactivity (green color) was used as a marker for 5-HT synthesis and storage] in RN33B cell cultures after incubation with Gal29 and Gal15. RN33B brain-derived immortalized cells were treated for 1h with Gal29 (100nM), Gal15(100nM) or control, followed for 1h for recuperation. 5-HT immunoreactivity was determined after immunofluorescent labeling with 5-HT by measuring of 5-HT immunoreactivity of the cells. The data are presented as mean \pm SEM, $n=60$ cells for two independent experiments. *** $p < 0.001$ according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple

Comparison Test. (C) Representative images of 5-HT stained RN33B cells under different conditions are presented. Scale bar, 10 μ m.

DISCUSSION

In the current study we describe for the first time that GAL(1-15) induces strong depression and anxiogenic-like effects in the FST and in the open field, respectively. Importantly, these effects were significantly stronger than the ones induced by GAL. With the PLA indications were also obtained for the existence of GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes in the dorsal hippocampus and especially in the dorsal raphe nerve cells, areas rich in GAL fragment binding sites (Hedlund et al., 1992). Indications were also obtained for the involvement of this heteroreceptor complex in the actions of GAL(1-15) based on the use of the specific GALR2 antagonist M871 and i.c.v. injections of GALR2 siRNA producing a reduction of GALR2. In the latter experiment the reductions of the behavioral actions of GAL(1-15) was linked to a substantial disappearance of PLA positive blobs in the nerve cells of the hippocampus and the dorsal raphe and thus to a reduction in the GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes. Thus, the current study supports the concept that GAL fragment binding sites mainly exist on GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes which preferentially bind GAL(1-15) (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012). The different role of GAL(1-15) and GAL was shown in HEK293 cells co-transfected with GALR1-YFP and GALR2, where GAL(1-15) produced a different profile of vesicular trafficking than GAL. GAL(1-15) increased the GALR1-YFP internalization and the Early Endosomes number than GAL, however the number of Lysosomes was very low. The relevance of the dorsal raphe as a target for GAL(1-15) was supported by studies in rat medullary raphe-derived cell line RN33B where GAL(1-15) decreased 5-HT Immunoreactivity (IR) more strongly than GAL.

In the behavioral tests we observed that GAL induced the same pattern of response as in previous studies validating the conditions of our behavioral models. In the FST GAL infused either i.c.v or into the ventral tegmental area was shown to increase the immobility (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2005; Kuteeva et al., 2007). This effect was reproduced with icv GAL 3 nmol in this test. Moreover in the open field GAL 3nmol lacked behavioral effects. This indicates the absence of stress conditions in our model since GAL produced anxiolytic-like effects only in animals tested under heightened stress conditions (Morilak et al., 2003; Barrera et al., 2005).

GAL(1-15) induced a strong depression and anxiogenic-like effect in these tests indicating a potential role of GAL(1-15) in mood disorders. Furthermore, these effects were significantly stronger than the corresponding behavioral effects induced by GAL. In previous work it has been shown that N- terminal GAL fragments can reduce

postjunctional recognition of 5-HT_{1A} receptor, known to be involved in mood disorders, more strongly and potently than GAL (Diaz-Cabiale et al., 2000). This was true not only for behavioral functions, but also for other central functions such as cardiovascular functions. Thus, GAL(1-15) acts differentially from GAL. The N-terminal fragment GAL (1- 15) antagonized the cardiovascular effects of GAL and GAL(1-15) but not GAL decreased baroreceptor reflex sensitivity (Diaz-Cabiale et al., 2005). GAL(1-15) also interacted differently from GAL with other neuropeptides involved in central cardiovascular function such as Angiotensin or Neuropeptide Y (Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2010). Our results at behavioral level validate and extend the view of a specific role of GAL(1-15) in brain communication.

GALR2 is involved in the GAL(1-15) effects since the GALR2 antagonist M871 blocked the GAL(1-15)-induced depression-like and anxiogenic effects. GALR2 has been involved in neuronal mechanisms underlying antidepressant-like effects but the specific role for GALR2 in anxiety is not well characterized. In fact, GALR2 knockout mice showed anxiety-like behavior or no effect depending on the genetic background of the mutants (Bailey et al., 2007; Lu et al., 2008). However, our results demonstrate the importance of GALR2 in the anxiogenic-like effect induced by GAL(1-15).

In previous work it was described that a GALR2 agonist (AR-M1896) administered i.c.v. to rats decreased immobility time in the FST indicating antidepressant effects (Kuteeva et al., 2008). In line with these results transgenic mice overexpressing GALR2 demonstrated decreased immobility in the FST indicative of antidepressant-like behavior (Le Maitre et al., 2011). Moreover, repeated fluoxetine treatment of rats increases the number of GALR2 binding sites in the dorsal raphe nucleus which could contribute to the antidepressant effects of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs) mediated via GALR2 in the dorsal raphe (Lu et al., 2005). These results indicate that the activation of GALR2 induces antidepressant-like effects. Instead the current results showing that the GALR2 antagonist blocks the depressant actions of the GAL fragment in the FST can be explained by our hypothesis that it targets the GALR2 protomer of the GALR1-GALR2 heteroreceptor complex which reduces the signaling from this complex mediating the depression like actions of GAL(1-15).

In the current work positive PLA blobs (puncta) formed from GALR1- GALR2 were in fact observed in the nerve cells of the dorsal hippocampus and dorsal raphe. This indicates that the distances between the two receptors are in a range compatible with the formation of GALR1/GALR2 heteroreceptor complexes in these two brain regions (Trifilieff et al., 2011; Borroto-Escuela et al., 2012). The formation of GALR1/GALR2 heteroreceptor complexes with high affinity for GAL(1-15) can help explain the fact that GAL(1-15) induces a stronger action than GAL at the behavioral level and in the reduction of 5-HT in RN33B cells. It is of interest that PLA blobs exist in higher number in the dorsal raphe nerve cells than in the dorsal hippocampal nerve cells which indicates that the dorsal raphe nerve cells can be a special target for GAL(1-15). The meso-limbic 5-HT neurons are well-known to be dysfunctional in depression (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012; Artigas, 2013). Therefore, the marked decrease in 5-HT IR induced by GAL(1-15) may indicate one mechanism contributing to the depression-like actions of GAL(1-15).

GALR2 may induce antidepressant actions via Gq/G11 mediated GALR2 signaling. It seems possible that in the GALR1-GALR2 heteroreceptor complex the GALR2 protomer signals in a different way upon activation by its preferred ligand GAL(1-15) leading to its strong depression-like action. Alternatively, the GAL(1-15) activation of the GALR1 protomer may via an allosteric receptor- receptor interaction inhibit the Gq/G11 mediated signaling of the GALR2 protomer and switch it towards Gi/o mediated signaling. In this way both GALR1 and GALR2 protomers become coupled to Gi/o which may lead to the strong depression-like actions observed with GAL(1-15). The formation of homodimers and heterodimers among neuropeptide receptors is known (AbdAlla et al., 2005). GALR1 can form homodimers (Wirz et al., 2005) and heterodimers with 5HT1A receptors (Borroto-Escuela et al., 2010; Fuxe et al., 2012) and likely with other G-protein coupled receptors.

In the current work GAL(1-15) induced a strong internalization of GALR1-YFP in GALR1-YFP and GALR2 co-transfected cells, indicating that the heteromer GALR1-GALR2 acts as a target of the GAL(1-15). Furthermore, this effect was stronger than the internalization induced by GAL. These results are in agreement with the existence of GALR1-GALR2 heteroreceptors complexes which preferentially bind GAL(1-15) (Fuxe et al., 2008; Fuxe et al., 2012). The co-internalization of heteromers complexes has been observed by other authors, where the A2A-D2 and 5HT1A-5HT7 heteromers shown a different profile of internalization than the receptors alone (Borroto-Escuela et al., 2011; Renner et al., 2012).

In the analysis of vesicular trafficking we used the Rab5 protein as marker of early endosomes (Borrito-Escuela et al., 2012) and LAMP1 protein as marker of lysosomes (Fichter et al., 2010). In HEK293 cells expressing GALR1 and GALR2 receptors GAL(1-15) produced a high formation of early endosomes while GAL lacks of effect over early endosomes formation. These results suggest again that GAL(1-15) acts over GALR1-GALR2 heterodimer. By other hand, GAL(1-15) produced a very low numbers of lysosomes which indicates that GALR1-GALR2 heterodimer is not being degraded after GAL(1-15) induced internalization, therefore GALR1-GALR2 heteromers could follow predominantly the recycling pathway (Bliek, 2005; Haas et al., 2005) which could explain the powerful effects of GAL(1-15) compared with GAL at behaviour level.

GALR2 siRNA was injected into the lateral ventricle of rats to reduce GALR2 expression and validate the role of GALR2 in the formation of the PLA positive blobs in the dorsal hippocampus and the dorsal raphe and in the GAL(1-15) mediated behavioral actions. The time course curve indicated a maximal reduction of GALR2 protein expression 8 days after the injection, and this was the time point selected for the behavioral tests. Moreover in these animals the quantification of PLA showed a maximal reduction of around 40 % in the CA1 area and 60% in the dorsal raphe compared with the vehicle group. These results strongly indicate that the PLA signals obtained are specific and represents the GALR1-GALR2 heteroreceptor complex. This reduction of the PLA signal was sufficient to block the depression and anxiogenic-like effects of GAL(1-15) linking them to its actions at the GALR1-GALR2 heteroreceptor complex.

In conclusion, our results give strong support to the view that GAL(1-15) acts at GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes in the raphe-limbic system to exert its strong depression-like and anxiogenic effects. These results may give the basis for the development of novel therapeutic drugs targeting specifically the GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes for treatment of depression and anxiety.

GAL(1-15) modifies 5HT1A receptors at pre and postsynaptic level: Involvement in depression.

INTRODUCTION

Depression is a complex and heterogeneous disorder that will become the second cause of disability worldwide.

Decreased serotonergic (5-HT) activity is involved in the development and expression of major depression and most drugs used for treating depression increase 5-HT levels, including the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). 5HT mediates its functions through multiple 5HT-receptors. Of the 5-HT1 family, the role of the 5HT1A subtype in depression is well-established. 5HT1A receptor (5HT1AR) is an inhibitory G-protein coupled receptor expressed both as presynaptic autoreceptor on raphe neurons (DR), and as a postsynaptic receptor in several brain regions as hippocampus, septum, and amygdala where it mediates serotonin actions.

Several studies reported abnormalities in 5HT1AR in patients with major depression. Postmortem and neuroimaging studies suggest an increased density of 5HT1A autoreceptor in major depressives compared with control subjects (Boldrini et al., 2008). Genetic studies have also shown that individuals with elevated density or activity of 5HT1A autoreceptors, including those with a functional polymorphism in the promoter region of Htr1a gene, are more susceptible to depression and suicide and respond poorly to antidepressants (Lemondé et al., 2003; Neff et al., 2009). In animal models, transgenic mice with a moderate reduction of 5HT1A autoreceptors report antidepressant-like responses (Richardson-Jones., 2010) and acute 5-HT1A autoreceptor knockdown mice increased antidepressant responses (Ferres-Coy et al., 2013).

Contrary to presynaptic 5HT1A autoreceptors, the activation of postsynaptic hippocampal 5HT1AR indicate antidepressant efficacy. PET scan studies of 5-HT1A binding indicated a reduced postsynaptic hippocampal 5HT1AR in major depression (Drevets et al., 1999). In preclinical studies, chronic antidepressant treatments tonically activated hippocampal 5HT1AR (Haddjeri et al., 1998) and selective 5HT1AR agonist shows antidepressant-like activity (Cyran et al., 2005). Also, genetic studies indicated that postsynaptic 5HT1A are sufficient for antidepressant-like effects in rodents.

All these results indicate an opposing role of pre- and postsynaptic 5HT1AR in depression. Combination of SSRI treatment with mixed 5-HT1AR antagonist to accelerate the clinical effect of SSRI have been tried, however pharmacological

approaches have been hampered by the difficulty in separating effects on autoreceptors from effects on postsynaptic 5HT_{1A}R.

New approaches in the treatment of stress-related mood disorders including neuropeptides are becoming increasingly apparent (Kormos and Gaszner, 2013). Galanin (GAL) is a neuropeptide (Tatemoto et al., 1983) widely distributed in neurons within the Central Nervous System (CNS). To date, three GAL receptor (GALR) subtypes, GALR1-3, with high affinity for GAL have been cloned (Branchek et al., 2000; Mitsukawa et al., 2008). GALR1 and GALR3 mainly activate inhibitory G proteins Gi/Go, while GALR2 mainly couples to Gq/G11 to mediate excitatory signaling (Wang et al., 1997; Branchek et al., 2000)

GAL has a variety of physiological functions, including mood regulation and depression (Weiss et al., 1998; Bellido et al., 2002; Kuteeva et al., 2005; 2007). The activation of GALR1 and GALR3 results in a depression like behavior while stimulation of GALR2 leads to anti-depressant-like effects (Bartfai et al., 2004; Lu et al., 2005; Kuteeva et al., 2008).

Moreover, GAL modulates 5HT_{1A}R function at pre- and postsynaptic level in the brain. In the DR nerve cells, intracerebroventricular (icv) GAL induced a time-dependent reduction in affinity and an increase in the HT_{1A}R autoreceptor density (Razani et al., 2000) and the reduction in 5-HT release induced by GAL is partially reduced with a 5HT_{1A}R antagonist (Yoshikate et al., 2003). At post-synaptic level GAL reduced the affinity of the 5HT_{1A}R in the ventral limbic cortex. Moreover in various behavior including hypothermia, locomotor activity and passive avoidance, icv GAL blocked post-synaptic 5HT_{1A}R function. Recent results have shown that this interaction is at least in part, due to the existence of GALR1-5HT_{1A}R heteromers in discrete brain regions (Borroto-Escuela et al., 2010).

Not only GAL but also the Galanin N-terminal fragments like GAL(1-15) are active in the CNS (Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2007). In recent work we have described that GAL(1-15) induces strong depression-related and anxiogenic-like effects in rats and importantly, these effects were significantly stronger than the ones induced by GAL (Millón et al., 2014). The GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes in the dorsal hippocampus and especially in the dorsal raphe nerve cells, areas rich in GAL(1-15) binding sites (Hedlund et al., 1992) were involved in these effects (Millón et al., 2014).

Also GAL(1-15) interacts with 5-HT_{1A}-R, GAL(1-15) can antagonistically modulate the serotonin 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus and also in the ventral limbic

cortex N-terminal GAL fragments can more strongly and more potently reduce postjunctional 5-HT_{1A} receptor recognition than GAL, (Diaz-Cabiale et al., 2000).

The purpose of the present study was to assess the ability of GAL(1-15) to modulate 5HT_{1A}R at both pre- and postsynaptic level in rats. We have analyzed the effect of GAL(1-15) on 5HT_{1A}R mediated response in a behavioral test of depression and the involvement of the GALR2 in these effects. Moreover we studied the effect of GAL(1-15) on the binding characteristics and mRNA levels of 5HT_{1A}R in the dorsal raphe and the dorsal hippocampus nuclei. Therefore, we analyze with the proximity ligation assay (Trifilieff et al., 2011; Borroto-Escuela et al., 2013), the proximity of 5HT_{1A}R with GALR1 and GALR2 in these nuclei. The effects of GAL(1-15) on 5-HT_{1A}-IR were also analyzed in the rat medullary raphe-derived cell line RN33B, a cell line where GAL(1-15) decreased 5-HT IR (Millón et al., 2014).

RESULTS

GAL(1-15) enhances 8-OHDPAT-mediated antidepressant-like behaviors

In the FST, rats were pre-exposed to water for 15 minutes. 24 hours later the immobility, climbing and swimming as signs of depression-like behavior were analyzed during a second 5 min exposure to water.

As previously described, the 5HT_{1A}R agonist 8-OHDPAT at the dose of 0,25 mg/Kg induced antidepressant-like effects as it significantly decreased the immobility ($p < 0.05$) and the climbing behavior ($p < 0.01$) while an increased swimming behavior by 140% ($p < 0.01$) was observed (Table 1A). This dose modifies the locomotor parameters, since the total distance travelled and the mean speed were significantly reduced during a 5 min test period (Table 1B).

The dose of 0,125mg/Kg of 8-OHDPAT was a threshold dose in this test. Moreover, this dose lacks of effect in the locomotor parameters (Table 1).

A			
Parameters	Control	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg	8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg
Immobility time (S)	104,9 ±21,21	93,7 ±20,9	44,1 ±14,3*
Climbing time (S)	88,6 ±18	105,3 ±9,6	42,7 ±9,2**
Swimming time (S)	72,2 ±11,6	77,3 ±13,3	166,2 ±14,5**

B			
Locomotor parameters	Control	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg	8-OH-DPAT 0,25 mg/Kg
Total Distance Travelled (cm)	3827 ±255	3302 ±207,7	1854 ±223,2**
Mean Speed (cm/s)	12,7 ±0,8	11 ± 0,7	6,2 ±0,7**

Table 1. Dose-Response curve of 8-OH-DPAT in the Forced Swimming Test (A) and the locomotor activity parameters in the Open Field Test (B) in rats. 8-OH-DPAT (0,125 or 0,25 mg/Kg) was administered via subcutaneously 60 min before the tests and cerebrospinal fluid was injected via i.c.v. 15 min before the test. Saline + cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Data shown as mean ± SEM of time for immobility, climbing or swimming (A) and total distance travelled or mean speed (B) during a 5 min test period (5-8 animals per groups). *p<0.05 and **p<0.01 versus respective control according to one-way ANOVA followed by Dunnet post-test.

The threshold dose of GAL(1-15) 1nmol enhanced the antidepressant-like effects mediated by the effective dose of the 8-OHDPAT (Figure 1). GAL(1-15) significantly decreased the immobility (p<0.05) and the climbing (p<0.05) behavior induced by an effective dose of the 8-OHDPAT in the FST (Figure 1). Moreover GAL(1-15) increased the swimming behavior induced 8-OHDPAT by 20% (p<0.01) (Figure 1).

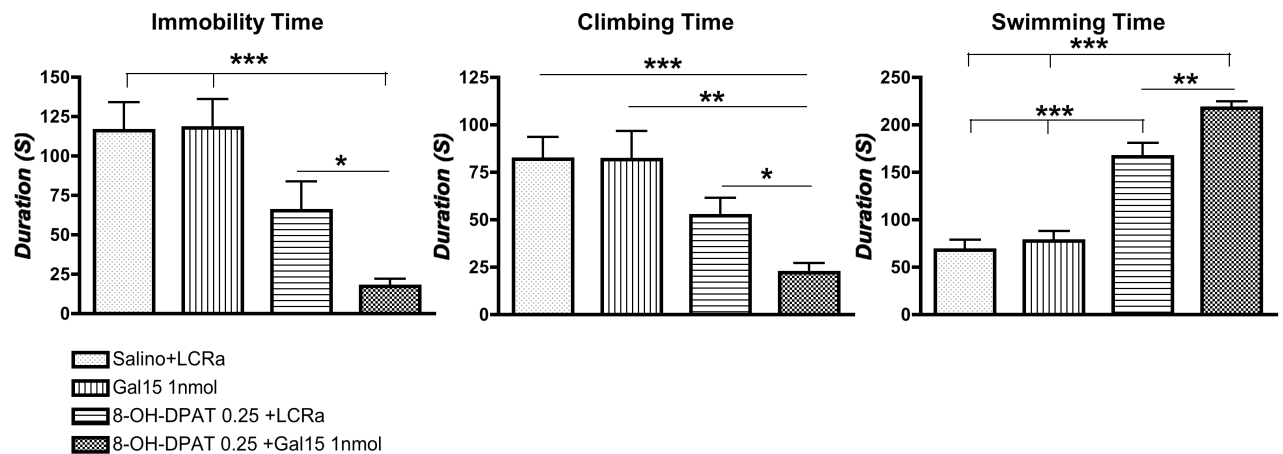


Figure 1. Behavioural effects of the coadministration of effective dose of 8-OH-DPAT (0,25 mg/Kg) and threshold dose of GAL(1-15) (1nmol/rat) in the Forced Swimming Test. 8-OH-DPAT was administered via subcutaneously 60 min before the tests and GAL(1-15) was injected via icv 15 min before the test. Saline + cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Data represents mean \pm SEM of immobility, climbing and swimming time in FST during the 5 min test period (6-11 rats per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

To avoid the locomotor activity of the 8-OHDPAT we analyzed the effects of the coadministration of 8-OHDPAT (0,125mg/Kg) and GAL(1-15) (1nmol) at threshold doses. A strong antidepressant effect was observed after the coadministration of GAL(1-15) and 8-OHDPAT (0,125mg/Kg) since a significantly decreased in the immobility ($p < 0.01$) and the climbing ($p < 0.01$) behavior by 50 and 60% respectively appeared (Figure 2). Moreover an increase of the swimming behavior of about 80% was also observed ($p < 0.001$) (Figure 2).

These antidepressant effects were independent of the locomotor activity, as the total distance reached and speed were equivalent between all the groups (Table 2).

GALR2 participates in this interaction since the presence of the GALR2 antagonist M871 blocks significantly ($p < 0.001$) all the effect induced by the coadministration of GAL(1-15) and 8-OHDPAT in the FST (Figure 2).

The GAL2 receptor antagonist M871 alone in the dose of 3 nmol lacked effects with respect to immobility, climbing or swimming time.

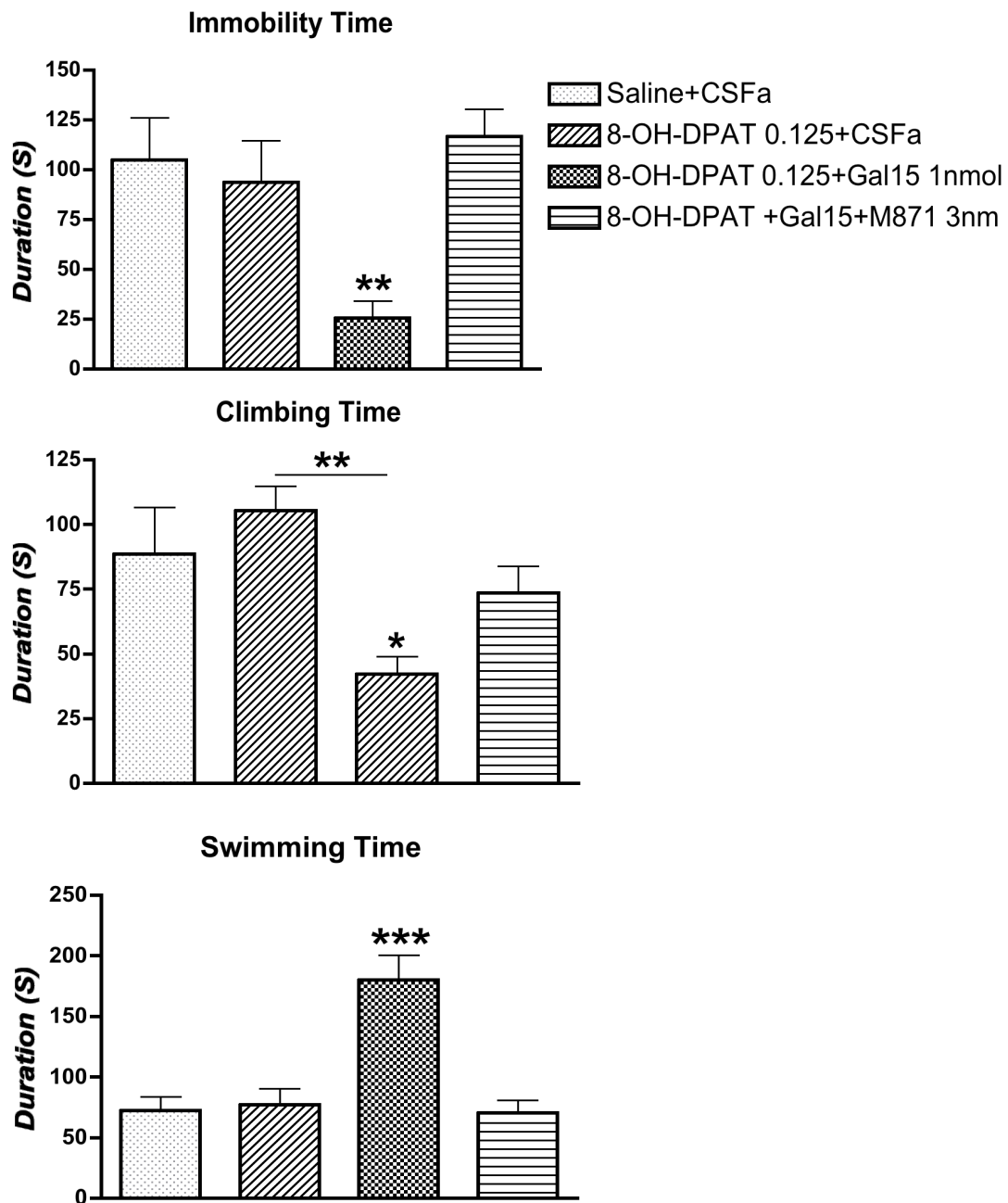


Figure 2. Behavioural effects of the coadministration of threshold doses of 8-OH-DPAT (0,125 mg/Kg) and Galanin(1-15) [Gal15] (1nmol/rat) and the coadministration with GalR2 antagonist M871 (3nmol/rat) in the Forced Swimming Test (FST). 8-OH-DPAT was administered via subcutaneously 60 min before the tests and Gal15 and Gal15+M871 were injected via icv 15 min before the test. Saline + cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Data represents mean \pm SEM of immobility, climbing and swimming time in FST during the 5 min test period (5-8 rats per group). * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 versus rest of the group according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

Locomotor parameters	Control	8-OH-DPAT + CSFa 0,125 mg/Kg	8-OH-DPAT 0,125 mg/Kg + Gal15 1nmol
Total Distance Travelled (cm)	4188 ±181,6	3318 ±245	3295 ±244,8
Mean Speed (cm/s)	13,9 ±0,6	11,1 ±0,8	11 ±0.8

Table 2. Analysis of locomotor activity of the coadministration of threshold doses of 8-OH-DPAT (0,125 mg/Kg) and Galanin(1-15) [Gal15] (1nmol/rat) in the Open Field Test. 8-OH-DPAT was administered via subcutaneously 60 min before the tests and Gal15 was injected via icv 15 min before the test. Saline + cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. N=4-6 animals in each test group. Data shown as Mean ± SEM. No differences were found according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

Comparison between the effect of GAL(1–15) or GAL on 8-OH-DPAT-mediated antidepressant-like behaviors

In the FST, the overall one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment for immobility (one-way ANOVA, $F_{3,19}=5.771$, $p<0.01$). The decrease in the immobility induced by the coadministration of GAL(1–15) and 8-OH-DPAT (0,125mg/kg) was significantly higher than the one induced by GAL and 8-OH-DPAT (0,125mg/kg) (Newman- Keuls post-hoc test: $p<0.05$; Figure 3). In the climbing behavior we observed the same pattern of response (one-way ANOVA, $F_{3,21}=8.995$, $p<0.001$): GAL(1–15)+8-OH-DPAT (0,125mg/kg) induced a significantly stronger decrease in climbing response compared with GAL+8-OH-DPAT (0,125mg/kg) (Newman- Keuls post-hoc test: $p<0.05$; Figure 3).

Importantly, in the swimming behaviour GAL(1–15)+8-DPAT (0,125mg/kg) also induced a significantly stronger increase in swimming response compared with GAL+8-DPAT (0,125mg/kg) (one-way ANOVA, $F_{3,29}=27.47$, $p<0.001$; Newman- Keuls post-hoc test: $p < 0.01$; Figure 3).

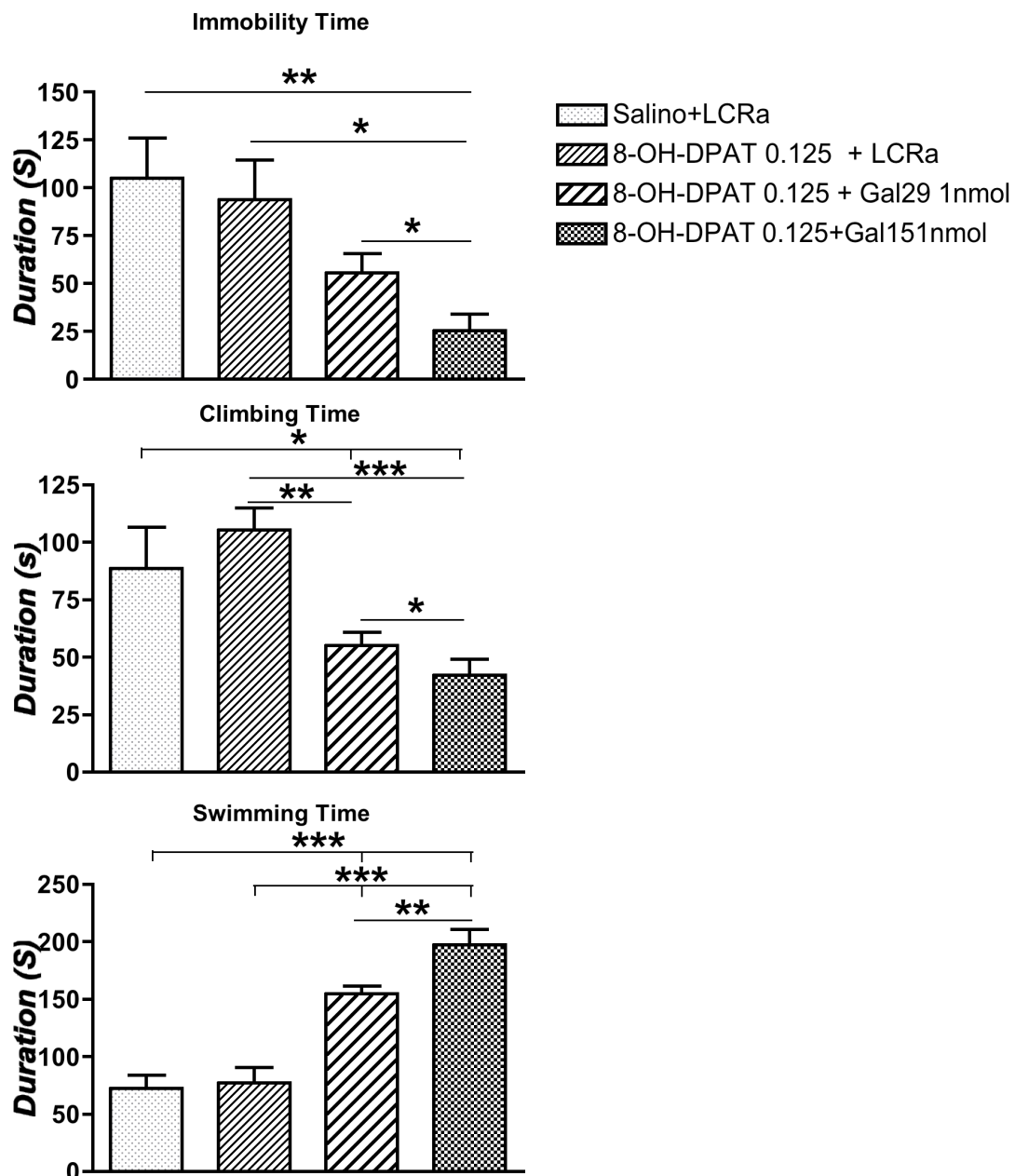


Figure 3. Behavioural effects of the coadministration of 8-OH-DPAT (0,125 mg/Kg) and Galanin (Gal29) (1nmol/rat) and the coadministration of 8-OH-DPAT (0,125 mg/Kg) and Galanin(1-15) [Gal15] (1nmol/rat) in the Forced Swimming Test (FST). 8-OH-DPAT was administered via subcutaneously 60 min before the tests and Gal29 or Gal15 were injected via icv 15 min before the test. Saline + cerebrospinal fluid injected rats were used as control group. Data represents mean \pm SEM of immobility, climbing and swimming time in FST during the 5 min test period (5-7 rats per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

GAL(1–15) modifies the binding characteristics and mRNA levels of 5HT1AR in the dorsal hippocampus and the dorsal raphe nuclei

GAL(1-15) administered i.c.v. (3 nmol/rat) produced a time dependent effect on the binding of [³H]-8-OH-DPAT in CA1/DG areas of the dorsal hippocampus formation (Figure 4).

10 minutes after icv GAL(1-15), that corresponds with the time point of the performance of the FST, GAL(1-15) produced a significant increase in the K_d and B_{max} values of the [³H]8-OH-DPAT binding sites in the CA1 area by about 90% and 85% respectively (p<0.05). In the DG we observed the same pattern of response, GAL(1-15) also induced a significant increase in the K_d and B_{max} values of the [³H]8-OH-DPAT binding sites in the DG area by about 150% and 95% respectively (p<0.01) (Figure 4B)

Representative autoradiograms illustrate the increase of labelling (increase in B_{max} values) in both areas, CA1 and DG, 10 minutes after i.c.v. GAL(1-15) (Figure 4C).

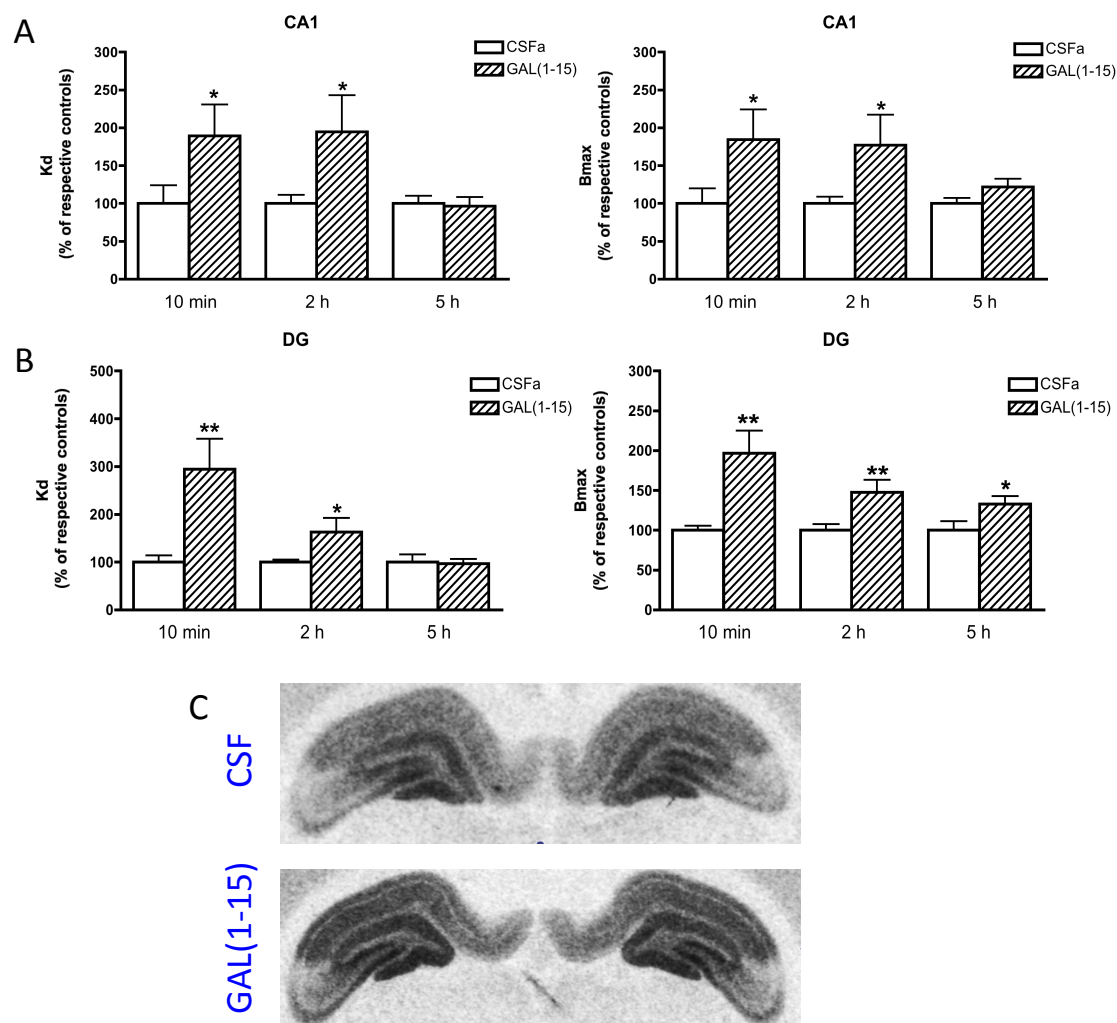


Figure 4. Effects of Galanin (1-15) on the binding characteristics of 5HT1A receptor agonist [³H] 8-OH-DPAT binding sites in the dorsal hippocampus (CA1 (A) and DG (B)). Saturation experiments with ten concentration of [³H] 8-OH-DPAT (0,26-10 nM) were performed in sections from dorsal hippocampus.

Non-specific binding was defined as the binding in the presence of 10 μ M serotonin. The values shown are percentages of respective CSF values. K_d (nM) values (100%) for the pooled CSF group (10min, 2h and 5h after i.c.v. GAL(1-15)) in the CA1 were $3,27\pm 0,9$ (n=18) and in the DG were $1,73\pm 0,2$ (n=18). The B_{max} (fmol/mg protein) (100%) for the pooled CSF groups (10 min, 2h and 5h after i.c.v. GAL(1-15) administration in the CA1 were $751,9\pm 70$ (n=18) and in the DG were $696\pm 49,5$ (n=18). The K_d values and the B_{max} values are shown as mean \pm SEM., n=6. * p <0.05; ** p <0.01 vs respective CSF group (Student's t-test). (C) Representative autoradiograms from dorsal hippocampus sections of rat at Bregma -3,6 mm showing the increase of the 5HT1A agonist binding in the CA1 and DG 10 min with a high concentration of the radioligand [3H]8-OH-DPAT (7.2 nM) after the GAL(1-15) (3 nmol, i.c.v.) administration.

The presence of the GALR2 antagonist M871 blocks significantly the increase in the K_d and B_{max} values of the [3H]8-OH-DPAT binding sites induced by GAL(1-15) in both areas, CA1 and DG, confirming the involvement of GALR2 in the effect (Table 3).

	Area	CSF	GAL(1-15)	M871	GAL(1-15)+M871
K_d (nM)	CA1	$3,28\pm 0,53$	$7,05\pm 0,8^{**}$	$3,96\pm 0,27$	$4,85\pm 0,68^b$
	DG	$2,65\pm 0,3$	$4,55\pm 0,4^a$	$3,3\pm 0,3$	$3,3\pm 0,73$
B_{max} (fmol/mg protein)	CA1	$1209\pm 150,6$	$1874\pm 127,4^*$	$1541\pm 114,3$	$1337\pm 142,5$
	DG	$1493\pm 118,4$	$2312\pm 188,2^{aa}$	$2013\pm 124,2$	$1885\pm 225,1^b$

Table 3. Effects of galanin receptor 2 antagonist M871 on the GAL(1-15)-induced modulation of the 5HT1A receptor agonist [³H] 8-OH-DPAT binding sites in the dorsal hippocampus (CA1 and DG). Saturation experiments with ten concentration of [³H] 8-OH-DPAT (0,26-10 nM) were performed in sections from dorsal hippocampus 10 min after i.c.v. administration of GAL(1-15) 3nmol alone, M871 3nmol alone, or GAL(1-15) and M871 together. Non-specific binding was defined as the binding in the presence of 10 μ M serotonin. The K_d values and the B_{max} values are shown as mean \pm SEM., n=6. * p <0.05 vs CSF and GAL(1-15)+M871 groups; ** p <0.01 vs CSF and M871 groups; ^a p <0.05 vs CSF group; ^{aa} p <0.01 vs CSF group; ^b p <0.05 vs GAL(1-15) group according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test.

These effects on the K_d and B_{max} values of the [3H]8-OH-DPAT binding sites were maintained 2 hours after icv GAL(1-15) in the CA1 (p <0.05) and also in the DG (p <0.01) of the hippocampus (Figure 4). However, 5 hours after icv GAL(1-15) the only effect maintained was the increase of the density of [3H]8-OH-DPAT binding sites in the DG (Figure 4).

The results from the *in situ* hybridisation studies showed that 2 hours after GAL(1-15) administration a substantial increase in the 5-HT_{1A} receptor mRNA level by 53% and 43% respectively in the CA1 ($p < 0.01$) and DG ($p < 0.01$) respectively (Figure 5A,C) was observed. However, 5 hours after GAL(1-15), the effects had disappeared (Figure 5D).

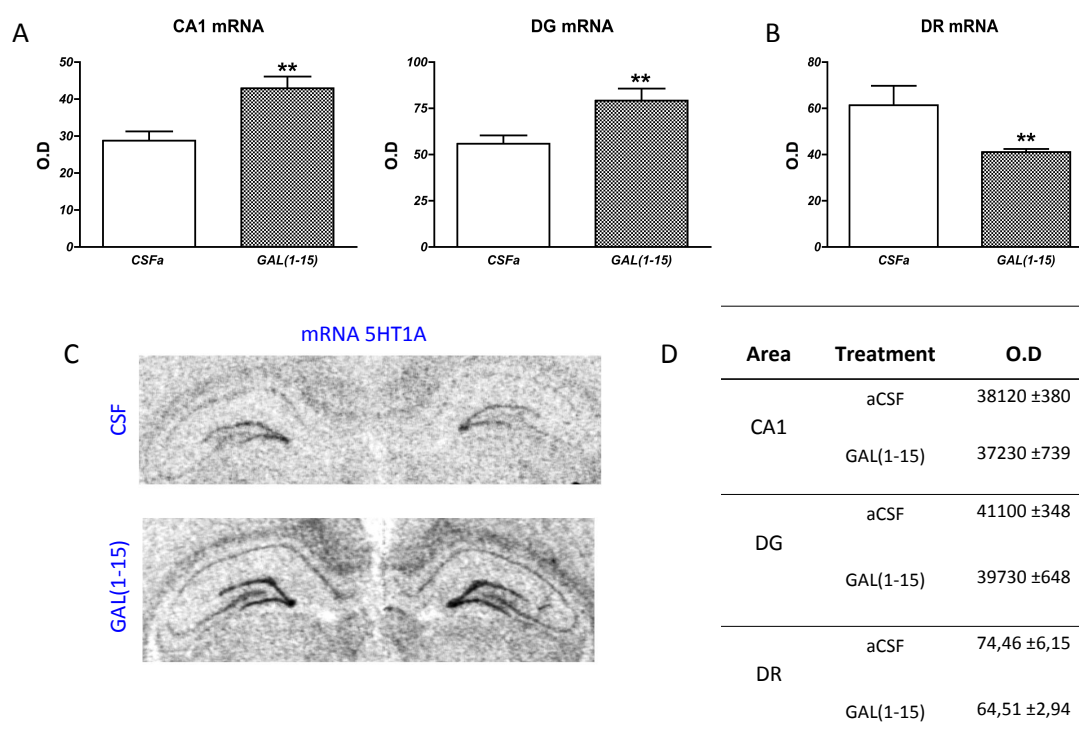


Figure 5. Effects of 3nmol Galanin (1-15) on 5HT_{1A} receptor mRNA levels in dorsal hippocampus (CA1 and DG) (**A**) and dorsal raphe nucleus (**B**) 2 h after i.c.v. administration in comparison with the CSF groups and 5 h after i.c.v. administration in comparison with the CSF groups (**D**). O.D. values are shown as mean ± SEM (n=6). ** $p < 0.01$ vs CSF group according to Student's t-test. Representative autoradiograms showing the mRNA levels coding for 5HT_{1A} receptors 2 h after administration of GAL(1-15) (3nmol, i.c.v.) compared with CSF group in the dorsal hippocampus (CA1 and DG) (**C**) determined by *in situ* hybridization.

GAL(1-15) also produced a time dependent effect on the binding of [3H]-8-OH-DPAT in the DR (Figure 6). As seen in Figure 6A GAL(1-15), 2 hours after its icv administration, produced no changes in the K_D values of [3H]8-OH-DPAT binding sites in the DR but caused instead a decrease in the B_{max} values by about 20% ($p < 0.05$). No effect was observed 10 minutes or 5 hours after icv GAL(1-15) (Figure 6).

Representative autoradiograms with a high radioligand concentration illustrate the reduction of labelling (decrease in B_{max} values) 2 hours after i.c.v. GAL(1-15) (Figure 6B).

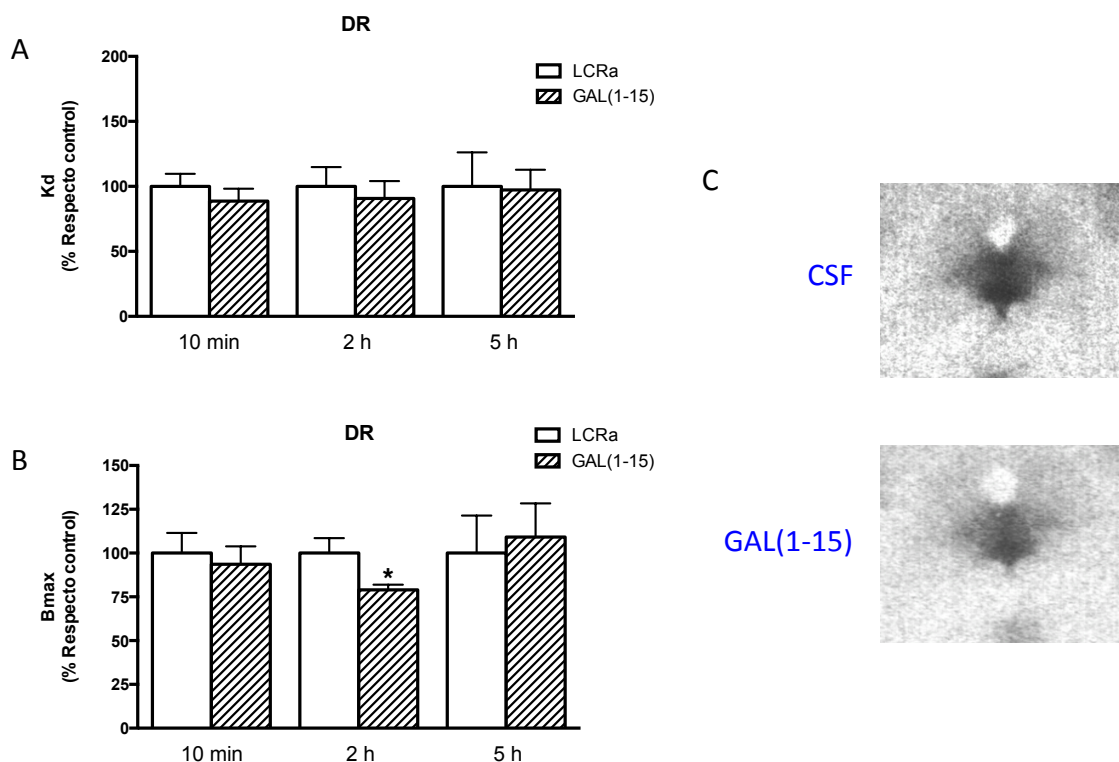


Figure 6. Effects of Galanin (1-15) on the binding characteristics of 5HT_{1A} receptor agonist [³H] 8-OH-DPAT binding sites in the dorsal Raphe. **(A,B)** Saturation experiments with ten concentration of [³H] 8-OH-DPAT (0,26-10 nM) were performed in sections from DR. Non-specific binding was defined as the binding in the presence of 10 μ M serotonin. The values shown are percentages of respective CSF values. K_d (nM) values (100%) for the pooled CSF group (10min, 2h and 5h after i.c.v. GAL(1-15)) in the DR were $2,54 \pm 0,3$ (n=18). The B_{max} (fmol/mg protein) (100%) for the pooled CSF groups (10 min, 2h and 5h after i.c.v. GAL(1-15) administration in the DR were $1262 \pm 132,5$ (n=23). The K_d values and the B_{max} values are shown as mean \pm SEM, n=6. *p<0.05 vs respective CSF group (Student's t-test). **(C)** Representative autoradiograms from DR sections of rat showing the decrease of the 5HT_{1A} agonist binding with a high concentration of the radioligand [³H]8-OH-DPAT (7.2 nM) 2 h after the GAL(1-15) (3 nmol, i.c.v.) administration.

The results from the *in situ* hybridisation studies also showed GAL(1-15) 2 hours after administration produced a substantial decrease by 30% in the 5-HT_{1A} receptor mRNA in the DR (Figure 5B). However, 5 hours after i.c.v. galanin the effects had disappeared (Figure 5D).

GALR1-5HT1A and GALR2-5HT1A Receptors are in close proximity in the Dorsal Hippocampus and Dorsal Raphe Nucleus

Positive results were obtained with the *in situ* PLA giving the indication that GALR1 and 5HT1AR are in close proximity and may form GALR1/5HT1AR heteroreceptor complexes. Moreover, positive PLA were also obtained for the GALR2/5HT1AR receptors in all the areas analyzed that were positive for GALR1/5HT1AR.

In Figure 7, large numbers of the Ammon's horn 1, 2, and 3 (CA1, CA2, and CA3) and the DG of the dorsal hippocampus and the dorsal raphe show a significant number of red clusters (blobs) representing positive PLA signals for GALR1/5HT1AR and for GALR2/5HT1AR. The quantification of PLA in these areas demonstrated that the highest number of PLA clusters for GALR1/5HT1AR were in the CA3 area ($p < 0.001$) while the elevated number of positive PLA signals for GALR2/5HT1AR were present in the cytoplasm of nerve cells of the dorsal raphe ($p < 0.01$; Figure 7A).

The specificity was demonstrated by the fact that no PLA clusters were observed in the lateral corpus callosum (Figure 7B), an area that seems to lack the GALR1 and GALR2 receptor (O'Donnell et al., 1999; Hewes and Picciotto, 2004).

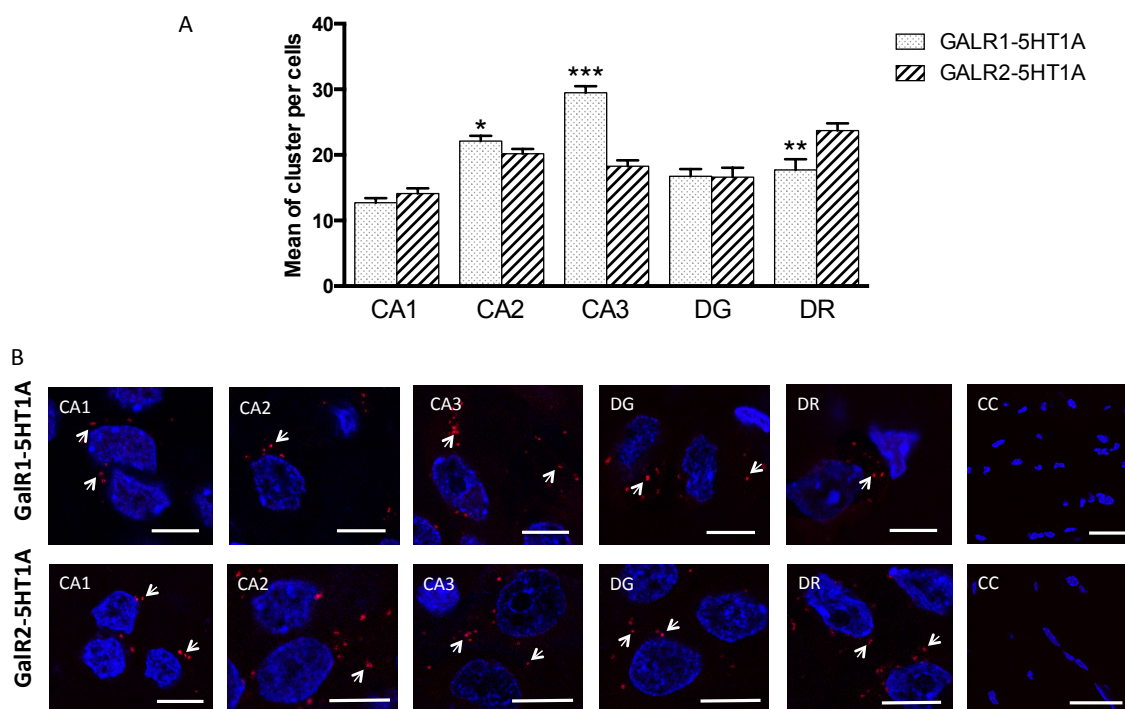


Figure 7. Close proximity between GalR1-5HT1A and between GalR2-5HT1A is detected by *in situ* proximity ligation assay (PLA) (seen as red clusters indicated by arrows) in dorsal rat Hippocampus and dorsal Raphe nucleus. *In situ* PLA was performed using primary antibodies of different species directed to GalR1 and 5HT1A and to GalR2 and 5HT1A followed by PLA reagents. **(A)** Quantification of red clusters/DAPI-positive nuclei. Quantification was made in 10-20 cells per photo and performed 8 photos per brain zone. The data represent the mean of clusters per cell (mean±SEM) for 80-160 cells per zone. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus GalR2-5HT1A PLA according to Student's t-test. **(B)**

Representatives photographs for positive GalR1-5HT1A and GalR2-5HT1A PLA regions [Ammon's horn 1, 2 and 3 (CA1, CA2 and CA3) Dentate Gyrus (DG) and Dorsal Raphe nucleus (DR)] (Scale bar, 10 μ m) and for negative region Corpus Callosum (CC) (Scale bar, 50 μ m). Nuclei are shown in blue (DAPI).

The results obtained in the DR were validated in PLA experiments on raphe RN33B cells (Figure 8). In these cells, where GALR1, GALR2 and 5HT1A receptors exist (Millón et al., 2014), we observed PLA-positive clusters GALR1/5HT1AR and GALR2/5HT1AR within them (Figure 8).

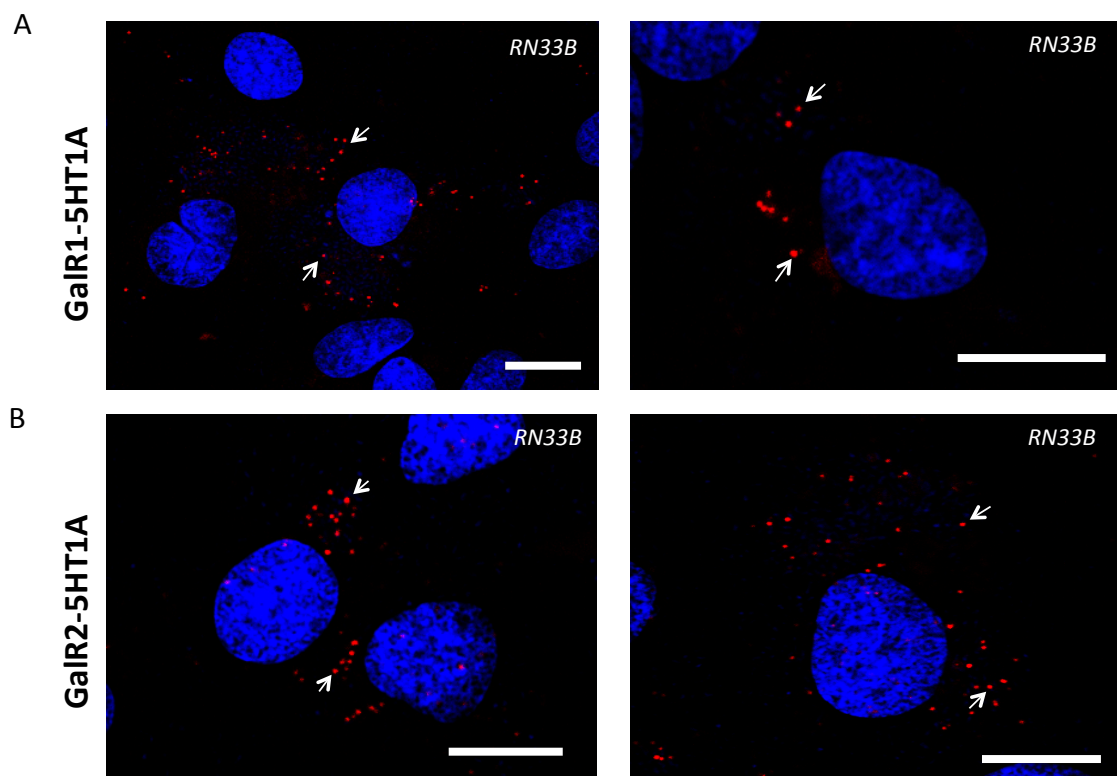


Figure 8. Close proximity between Galanin receptor 1 (GalR1) and 5HT1A receptor (A) and between Galanin receptor 2 (GalR2) and 5HT1A receptor (B) in RN33B cells. Detection of close proximity between GalR1-5HT1A and GalR2-5HT1A receptors (seen as red clusters indicated by arrows) in RN33B cells by *in situ* PLA; Nuclei are shown in blue(DAPI). Scale bar, 10 μ m.

The semiquantitative image showed that after GAL and GAL(1–15) treatment a significant effect in 5-HT1A (one-way ANOVA, $F_{2,177}=9.134$, $p<0.05$) and c-Fos (one-way ANOVA, $F_{2,177}=30.75$, $p<0.001$) immunoreactivity were observed. The incubation with GAL caused a significant decrease in the 5-HT1A ($p<0.05$) and c-Fos ($p<0.001$) immunoreactivity in RN33B cells (Figure 9). GAL(1–15) also significantly decreased the 5-HT1A ($p<0.001$) and c-Fos ($p<0.001$) immunoreactivity in these cells. This reduction was significantly stronger than the one induced by GAL (Newman-Keuls post-hoc test: $p < 0.05$; Figure 9).

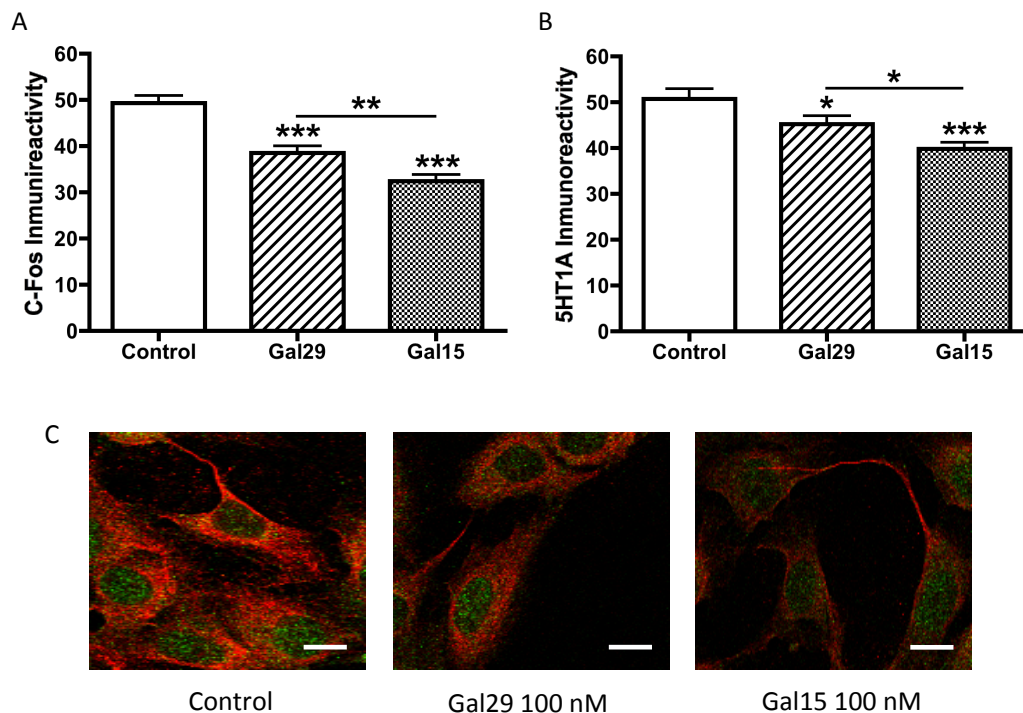


Figure 9. Effects of Galanin and Galanin (1-15) in cellular activity and 5HT1A receptor expression in RN33B cells. Quantification of C-Fos immunoreactivity [C-Fos immunoreactivity (green color) was used as a marker for cellular activity] (A) and 5HT1A immunoreactivity [5HT1A immunoreactivity (red color) was used as marker for 5HT1A receptor expression] (B) in RN33B cell cultures after incubation with Gal29 and Gal15. RN33B brain-derived immortalized cells were treated for 1h with Gal29 (100nM), Gal15(100nM) or control, followed for 1h for recuperation. The data are presented as mean \pm SEM, n=60 cells for two independent experiments. * p <0.05 vs Control group or Gal15 group; ** p <0.01 vs Gal15 group; *** p <0.001 vs Control group according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls Multiple Comparison Test. (C) Representative images of C-Fos (green nucleus) and 5HT1A (red cytoplasm) stained RN33B cells under different conditions are presented. Scale bar, 10 μ m.

DISCUSSION

In the present study we describe for the first time that GAL(1-15) enhances the antidepressant effects induced by the 5-HT_{1A}R agonist 8-OH-DPAT in the FST. These effects were significantly stronger than the ones induced by GAL. Importantly, the mechanism of this action involved interactions at receptor level since GAL(1-15) affects the binding characteristics as well as the mRNA levels of 5-HT_{1A} in the dorsal hippocampus and in the dorsal raphe nerve cells. Indications were obtained for the involvement of GALR2 in this effect, since the specific GAL2 receptor antagonist M871 blocks GAL(1-15) mediated actions at behavior and receptor level. PLA experiments indicated that 5HT_{1A}R are in close proximity with GALR1 and GALR2 in the dorsal hippocampus and in the dorsal raphe nerve cells suggesting the possibility of the formation of receptors mosaics in these areas (Fuxe et al., 2012). The interactions of GAL(1-15) with 5HT_{1A}R was supported by studies in rat medullary raphe-derived cell line RN33B, where GAL(1-15) decreased 5-HT_{1A} IR more strongly than GAL.

We used the FST, since it is a behavioral test developed to predict the efficacy of antidepressant treatments. In this test, reduced immobility time is interpreted as behavioural despair and point towards a potentially antidepressant drug effect and the enhancement of 5HT neurotransmission is related to swimming. (Detke et al., 1995 a,b). Several compounds with high affinity for 5-HT_{1A}R have been shown to decrease immobility in the FST. 5-HT_{1A}R agonist 8-OH-DPAT reduces the immobility and increases the swimming of the rats in the FST (Detke et al., 1995 a,b). The results obtained with the 8-OH-DPAT agonist alone agree with previous studies and confirms the behavioral model used (Cervo and Samanin 1987; Detke et al., 1995 a,b). We avoid the locomotion alteration performing the experiments one hour after the 8-OH-DPAT injections (Cervo and Samanin 1987).

In this paper, we demonstrated that GAL(1-15) act via GALR2 to enhance 5HT_{1A} antidepressant effect in the FST. We observed a strong decrease in immobility behavior and an 80% of increase of swimming behavior following cotreatment with threshold doses of GAL(1-15) and of 5HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. When administered alone, neither of these treatments affected performance on the test, indicating that GAL(1-15) and the 5HT_{1A} agonist interact to provoke the antidepressant responses. Since GAL(1-15) at the effective dose induce a pro-depressive effect (Millón et al., 2014), the antidepressant effect could only be due to the enhancement of 5HT_{1A}R action. Moreover, the strong enhancement of GAL(1-15) on antidepressant 5HT_{1A}R agonist mediated action was validated using an effective dose of the 5HT_{1A}R agonist.

Furthermore, the effects of GAL(1–15) on the 5HT_{1A}R mediated actions in the FST were significantly stronger than the corresponding behavioral effects induced by GAL. In previous work, N-terminal GAL fragments reduced post-junctional recognition of the 5-HT_{1A} receptor, known to be involved in mood disorders, more strongly and potently than GAL (Diaz-Cabiale et al., 2000). Also in recent studies GAL(1–15) induces strong depression-related and anxiogenic-like effects being these effects again were significantly stronger than the ones induced by GAL. This was true not only for behavioral functions, but also for cardiovascular functions (Diaz-Cabiale et al., 2005). GAL(1–15) as well interacted differently from GAL with other neuropeptides, such as angiotensin or neuropeptide Y, involved in cardiovascular regulation (Diaz-Cabiale et al., 2005, 2010). Our results at the behavioral level validate and extend the view of a specific role of GAL(1–15) in brain communication.

There is controversy over whether the antidepressant-like effects of 5-HT_{1A}R agonists in the FST are mediated by activation of 5-HT_{1A}R located at postsynaptic of presynaptic sites. A postsynaptic site of action is supported by findings that pretreatment with the 5-HT synthesis inhibitors did not affect in the FST on its own (Schreiber and De Vry 1993), nor did it alter the immobility-reducing effects of 8-OH-DPAT. Also local administration of 8-OH-DPAT into the lateral septum reduced immobility time in the FST (Schreiber and De Vry 1993). However, several other findings suggest that the immobility-reducing effect is mediated via presynaptic receptors. Local administration of 8-OH-DPAT into the dorsal raphe decreased immobility in the FST (Schreiber and De Vry 1993) and the destruction of 5-HT neurons blocked 8-OH-DPAT immobility reducing effect (Cervo and Samanin 1987).

In the present work, we demonstrated that GAL(1-15) produces a time-modulation of 5-HT_{1A}R at both post- and presynaptic level. 10 minutes after icv GAL(1-15) a significant increase in the K_d and B_{max} values of the [³H]8-OH-DPAT binding sites was observed in the CA1 and DG areas of the hippocampus. When effects of i.c.v. GAL(1-15) were examined 2 hours after administration, a marked increase in the K_d and the density of the 5-HT_{1A}R agonist binding sites were still observed in both areas associated to an increase in the mRNA levels of 5-HT_{1A}R. Moreover, at the presynaptic level GAL(1-15) also modify 5-HT_{1A}R. In the DR GAL(1-15) instead only reduced the density and the mRNA levels of the 5-HT_{1A}R two hours after its administration. Since GAL(1-15) induced the enhancement of the antidepressant-like effects of 5-HT_{1A}R agonists in the FST at 10 minutes where the only changes in the 5-HT_{1A}R described were in the hippocampus, it could be proposed that this was a key are in the behavior effect induced by GAL(1-15).

The effects of GAL(1-15) on 5-HT_{1A}R in the hippocampus and the DR are in the opposite direction than the ones induced by GAL. GAL lacks of effect in the [³H]8-OH-DPAT binding characteristics in the hippocampus (Razani et al., 2000) and in the DR a time-dependent reduction in affinity and an increase in the HT_{1A}R autoreceptor density was observed after GAL treatment (Razani et a., 2001). An antagonistic GALR/5HT_{1A}R has been proposed to explain GAL-mediated effect in the limbic forebrain and also in the DR (review Fuxe et al., 2012). Such interaction is due to the existence of GALR1/5HT_{1A} heteromers (Borroto-Escuela et al., 2010) being the mechanisms of signaling of these heteromers a trans-inhibition phenomenon to block the excessive activation of Gi/o (Borroto-Escuela et al., 2010).

In the present work the effect of GAL(1-15) on 5HT1AR at both sites, pre- and postsynaptic place could involved by the formation of receptors mosaics GALR1/GALR2/5HT1AR (Fuxe et al., 2008, 2012; Borroto-Escuela et al., 2010). GAL(1-15) acts through GALR1/GALR2 heteroreceptor complexes which preferentially bind GAL(1–15) (Fuxe et al., 2008, 2012; Millón et al., 2014, Borroto-Escuela et al., 2014). These heteromers were observed in the nerve cells of the dorsal hippocampus and dorsal raphe (Millón et al., 2014) and the mechanism of the heteromers could involved an allosteric receptor-receptor interaction that inhibits the Gq/G11-mediated signaling of the GALR2 protomer and switches it towards Gi/o-mediated signaling (Millón et al., 2014, Borroto-Escuela et al., 2014). The results of the PLA in this work confirm the possible formation of receptors mosaics GALR1/GALR2/5HT1AR since positive PLA were obtained for the GALR1/5HT1AR and GALR2/5HT1AR receptors in the DR and in the hippocampus. Moreover the studies on RN33B cells, where GALR1, GALR2 and 5HT1A receptors exist (Millón et al., 2014), showed PLA-positive clusters for GALR1/5HT1AR and GALR2/5HT1AR. Furthermore, in these raphe cells GAL(1-15) reduced the 5HT1AR immunoreactivity opening the possibility of an action of GALR1/GALR2/5HT1A mosaics on 5HT1A signal.

The existence of receptor mosaics of galanin fragment preferring receptors and 5-HT1A receptors has been proposed previously (Fuxe et al., 2008, 2012). These mosaics could work an integrative nodes in 5-HT neurotransmission and as major targets for the antidepressant effects at the pre and postjunctional level of serotonin transmission (Fuxe et al., 2008, 2012,). In fact, the presence of GALR2 facilitates the interactions of the GALR1-5HT1A heteromer (Borroto-Escuela et al., 2010).

In conclusion, our results indicate that GAL(1–15) enhances the antidepressant effects induced by the 5-HT1AR agonist 8-OH-DPAT acting on 5-HT1AR located at postsynaptic of presynaptic sites. These results may give the basis for the development of novel therapeutic drugs specifically targeting GALR1/GALR2 and 5HT1AR for treatment of depression.

CONCLUSIONS

- I. Intracerebroventricular administration of GAL(1-15) induces a pro-depressive and anxiogenic-like effects in the Forced Swimming test, Open field test and Passive Avoidance task. Moreover, these effects are more powerful than the ones induced by GAL.
- II. The pro-depressive and anxiogenic-like effects produced by the administration of GAL(1-15) are blocked by the Galanin Type 2 receptor antagonist, M871. Moreover, the reduction of expression of GALR2 (Knockdown GALR2) prevents the effects of GAL(1-15) in depression and anxiety behavioural tests.
- III. The GALR1 and the GALR2 colocalize in the dorsal Hippocampus and dorsal Raphe nucleus, at a distance that is compatible with the formation of heterodimer complexes. The GALR1/GALR2 heterodimers complexes are in a higher number in the dorsal Raphe nucleus than in the dorsal Hippocampus. Moreover, in both brain regions the complexes GALR1/GALR2 are reduced in the Knockdown GALR2 animal tissue.
- IV. In HEK cells coexpressing GALR1 and GALR2 the stimulation with GAL(1-15) induces a higher increase in the internalization of GALR1 than GAL. Moreover, the stimulation with GAL(1-15) produces a reduction in the lysosomes formation and an increased of the number of early endosomes compared with GAL stimulation.
- V. In the Raphe RN33B cells line, the Galanin receptors GALR1 and GALR2 are at a distance between 10 and 20 nm. The stimulation with GAL(1-15) induces a more powerful reduction in the synthesis and storage of 5HT as well as in the C-Fos expression than GAL.

- VI. The GAL(1-15) enhances the antidepressant effect induced by threshold and effective doses of 5HT1A agonist in the forced swimming test. Moreover, this potentiation is higher than ones induced by GAL. The action of GAL(1-15) on the 5HT1A agonist antidepressant effect is blocked by the Galanin Type 2 receptor antagonist, M871.

- VII. The GAL(1-15) modulates the characteristics and the expression of 5HT1A receptor in the dorsal Hippocampus and the dorsal Raphe nucleus.

- VIII. The receptors GALR1 and 5HT1A and the receptors GALR2 and 5HT1A are at a distance that allows the formation of receptor mosaics in the dorsal Hippocampus and the dorsal Raphe nucleus.

- IX. In the RN33B cells, the receptors GALR1 and 5HT1A and the receptors GALR2 and 5HT1A are in close proximity. The stimulation with GAL(1-15) induces a stronger reduction in the 5HT1A receptor than GAL.

- X. Our results give strong support to the view that GAL(1–15) acts at GALR1 and GALR2 heteroreceptor complexes in the raphe-limbic system to exert its strong depression-like and anxiogenic effects. These results may give the basis for the development of novel therapeutic drugs specifically targeting the GALR1 and GALR2 heteroreceptor complexes for treatment of depression and anxiety.

- XI. Our results indicate that GAL(1–15) enhances the antidepressant effects induced by the 5-HT1AR agonist 8-OH-DPAT acting on 5-HT1AR located at postsynaptic or presynaptic sites. These results may give the basis for the development of novel therapeutic drugs specifically targeting receptor mosaics GALR1/GALR2/5HT1AR for treatment of depression

BIBLIOGRAFÍA

- AbdAlla, S., A. Abdel-Baset, H. Lothar, A. el Massiery and U. Quitterer (2005). "Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension." J Mol Neurosci **26**(2-3): 185-192.
- Adell, A., A. Carceller and F. Artigas (1993). "In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin." J Neurochem **60**(5): 1673-1681.
- Adell, A., J. M. Casanovas and F. Artigas (1997). "Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas." Neuropharmacology **36**(4-5): 735-741.
- Aguilera, G. and C. Rabadan-Diehl (2000). "Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation." Regul Pept **96**(1-2): 23-29.
- Aguirre, J. A., K. Fuxe, P. Hedlund, J. A. Narvaez, A. Cintra, L. Rosen and L. F. Agnati (1991). "Neuropeptide Y/angiotensin II interactions in central cardiovascular regulation of the rat." Brain Res **566**(1-2): 61-69.
- Airan, R. D., L. A. Meltzer, M. Roy, Y. Gong, H. Chen and K. Deisseroth (2007). "High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression." Science **317**(5839): 819-823.
- Akhtar, S. and I. F. Benter (2007). "Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo." J Clin Invest **117**(12): 3623-3632.
- Akimova, E., R. Lanzenberger and S. Kasper (2009). "The serotonin-1A receptor in anxiety disorders." Biol Psychiatry **66**(7): 627-635.
- Amaral, D. G. (1978). "A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat." J Comp Neurol **182**(4 Pt 2): 851-914.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-591.
- Amaral DG, Lavenex P (2007). Hippocampal neuroanatomy. En: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'keefe J. Editores. The Hippocampus Book. Oxford University Press; New York: 2007.
- Anden, N. E., A. Dahlstrom, K. Fuxe and K. Larsson (1965). "Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon." Life Sci **4**(13): 1275-1279.
- Andersen, P., T. V. Bliss and K. K. Skrede (1971). "Lamellar organization of hippocampal pathways." Exp Brain Res **13**(2): 222-238.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'keefe J (2007). Historicam perspective: Proposed functions, biological characteristics, and neurobiological models of the

hippocampus. En: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'keefe J. Editores. The Hippocampus Book. Oxford University Press; New York: 2007.

Anderson, I. M. and B. M. Tomenson (1994). "The efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a meta-analysis of studies against tricyclic antidepressants." J Psychopharmacol **8**(4): 238-249.

Artigas, F. (2013). "Serotonin receptors involved in antidepressant effects." Pharmacol Ther **137**(1): 119-131.

Artigas, F., L. Romero, C. de Montigny and P. Blier (1996). "Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists." Trends Neurosci **19**(9): 378-383.

Azmitia, E. C. and M. Segal (1978). "An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat." J Comp Neurol **179**(3): 641-667.

Bailey, K. R., M. N. Pavlova, A. D. Rohde, J. G. Hohmann and J. N. Crawley (2007). "Galanin receptor subtype 2 (GalR2) null mutant mice display an anxiogenic-like phenotype specific to the elevated plus-maze." Pharmacol Biochem Behav **86**(1): 8-20.

Bailey, S. J., R. L. Featherstone, C. C. Jordan and I. K. Morton (1986). "An examination of the pharmacology of two substance P antagonists and the evidence for tachykinin receptor subtypes." Br J Pharmacol **87**(1): 79-85.

Baker, K. G., G. M. Halliday and I. Tork (1990). "Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus." J Comp Neurol **301**(2): 147-161.

Barnes, N. M. and T. Sharp (1999). "A review of central 5-HT receptors and their function." Neuropharmacology **38**(8): 1083-1152.

Barr, A. M., J. W. Kinney, M. N. Hill, X. Lu, S. Biro, J. Rebeck, Jr. and T. Bartfai (2006). "A novel, systemically active, selective galanin receptor type-3 ligand exhibits antidepressant-like activity in preclinical tests." Neurosci Lett **405**(1-2): 111-115.

Barrera, G., D. J. Echevarria, J. F. Poulin, S. Laforest, G. Drolet and D. A. Morilak (2005). "One for all or one for one: does co-transmission unify the concept of a brain galanin "system" or clarify any consistent role in anxiety?" Neuropeptides **39**(3): 289-292.

Bartfai, T., G. Fisone and U. Langel (1992). "Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives." Trends Pharmacol Sci **13**(8): 312-317.

Bartfai, T., X. Lu, H. Badie-Mahdavi, A. M. Barr, A. Mazarati, X. Y. Hua, T. Yaksh, G. Haberhauer, S. C. Ceide, L. Trembleau, L. Somogyi, L. Krock and J. Rebeck, Jr. (2004). "Galnic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain, and forced-swim tests." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10470-10475.

Baskin, L., S. Urschel and B. Eiberger (2008). "A novel ex-vivo application of RNAi for neuroscience." Biotechniques **45**(3): 338-339.

- Baudry, A., S. Mouillet-Richard, B. Schneider, J. M. Launay and O. Kellermann (2010). "miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants." Science **329**(5998): 1537-1541.
- Bedecs, K., M. Berthold and T. Bartfai (1995). "Galanin--10 years with a neuroendocrine peptide." Int J Biochem Cell Biol **27**(4): 337-349.
- Bel, N. and F. Artigas (1993). "Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei." Synapse **15**(3): 243-245.
- Bellido, I., Z. Diaz-Cabiale, P. A. Jimenez-Vasquez, B. Andbjør, A. A. Mathe and K. Fuxe (2002). "Increased density of galanin binding sites in the dorsal raphe in a genetic rat model of depression." Neurosci Lett **317**(2): 101-105.
- Belmaker, R. H. and G. Agam (2008). "Major depressive disorder." N Engl J Med **358**(1): 55-68.
- Bendotti, C. and R. Samanin (1986). "8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons." Eur J Pharmacol **121**(1): 147-150.
- Berger, M., J. A. Gray and B. L. Roth (2009). "The expanded biology of serotonin." Annu Rev Med **60**: 355-366.
- Berton, O., C. A. McClung, R. J. Dileone, V. Krishnan, W. Renthal, S. J. Russo, D. Graham, N. M. Tsankova, C. A. Bolanos, M. Rios, L. M. Monteggia, D. W. Self and E. J. Nestler (2006). "Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress." Science **311**(5762): 864-868.
- Berumen, L. C., A. Rodriguez, R. Miledi and G. Garcia-Alcocer (2012). "Serotonin receptors in hippocampus." ScientificWorldJournal **2012**: 823493.
- Bing, O., C. Moller, J. A. Engel, B. Soderpalm and M. Heilig (1993). "Anxiolytic-like action of centrally administered galanin." Neurosci Lett **164**(1-2): 17-20.
- Blackstad, T. W., K. Brink, J. Hem and B. Jeune (1970). "Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods." J Comp Neurol **138**(4): 433-449.
- Blier, P. and C. de Montigny (1987). "Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain." Synapse **1**(5): 470-480.
- Blier, P. and C. de Montigny (1994). "Current advances and trends in the treatment of depression." Trends Pharmacol Sci **15**(7): 220-226.
- Blier, P. and N. M. Ward (2003). "Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression?" Biol Psychiatry **53**(3): 193-203.

Bloch, B., B. Dumartin and V. Bernard (1999). "In vivo regulation of intraneuronal trafficking of G protein-coupled receptors for neurotransmitters." Trends Pharmacol Sci **20**(8): 315-319.

Bogdanova, O. V., S. Kanekar, K. E. D'Anci and P. F. Renshaw (2013). "Factors influencing behavior in the forced swim test." Physiol Behav **118**: 227-239.

Boldrini, M., M. D. Underwood, J. J. Mann and V. Arango (2008). "Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides." J Psychiatr Res **42**(6): 433-442.

Bondy, B., T. C. Baghai, C. Minov, C. Schule, M. J. Schwarz, P. Zwanzger, R. Rupprecht and H. J. Moller (2003). "Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results." Biol Psychiatry **53**(6): 538-542.

Bonifazi, P., C. D'Angelo, S. Zagarella, T. Zelante, S. Bozza, A. De Luca, G. Giovannini, S. Moretti, R. G. Iannitti, F. Fallarino, A. Carvalho, C. Cunha, F. Bistoni and L. Romani (2010). "Intranasally delivered siRNA targeting PI3K/Akt/mTOR inflammatory pathways protects from aspergillosis." Mucosal Immunol **3**(2): 193-205.

Borroto-Escuela, D. O., M. Narvaez, M. Di Palma, F. Calvo, D. Rodriguez, C. Millon, J. Carlsson, L. F. Agnati, P. Garriga, Z. Diaz-Cabiale and K. Fuxe (2014). "Preferential activation by galanin 1-15 fragment of the GalR1 protomer of a GalR1-GalR2 heteroreceptor complex." Biochem Biophys Res Commun.

Borroto-Escuela, D. O., M. Narvaez, D. Marcellino, C. Parrado, J. A. Narvaez, A. O. Tarakanov, L. F. Agnati, Z. Diaz-Cabiale and K. Fuxe (2010). "Galanin receptor-1 modulates 5-hydroxytryptamine-1A signaling via heterodimerization." Biochem Biophys Res Commun **393**(4): 767-772.

Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, P. Garriga, F. Ciruela, M. Narvaez, A. O. Tarakanov, M. Palkovits, L. F. Agnati and K. Fuxe (2013). "G protein-coupled receptor heterodimerization in the brain." Methods Enzymol **521**: 281-294.

Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, G. Mudo, M. Perez-Alea, F. Ciruela, A. O. Tarakanov, M. Narvaez, V. Di Liberto, L. F. Agnati, N. Belluardo and K. Fuxe (2012). "Fibroblast growth factor receptor 1- 5-hydroxytryptamine 1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity." Biol Psychiatry **71**(1): 84-91.

Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, M. Perez-Alea, M. Narvaez, A. O. Tarakanov, G. Mudo, L. F. Agnati, F. Ciruela, N. Belluardo and K. Fuxe (2012). "The existence of FGFR1-5-HT1A receptor heterocomplexes in midbrain 5-HT neurons of the rat: relevance for neuroplasticity." J Neurosci **32**(18): 6295-6303.

Borroto-Escuela, D. O., W. Romero-Fernandez, A. O. Tarakanov, F. Ciruela, L. F. Agnati and K. Fuxe (2011). "On the existence of a possible A2A-D2-beta-Arrestin2 complex: A2A agonist modulation of D2 agonist-induced beta-arrestin2 recruitment." J Mol Biol **406**(5): 687-699.

- Bouchard, T. J., Jr. (1994). "Genes, environment, and personality." *Science* **264**(5166): 1700-1701.
- Bourin, M., M. C. Colombel, J. P. Redrobe, J. Nizard, M. Hascoet and G. B. Baker (1998). "Evaluation of efficacies of different classes of antidepressants in the forced swimming test in mice at different ages." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **22**(2): 343-351.
- Branchek, T., K. E. Smith and M. W. Walker (1998). "Molecular biology and pharmacology of galanin receptors." *Ann N Y Acad Sci* **863**: 94-107.
- Branchek, T. A., K. E. Smith, C. Gerald and M. W. Walker (2000). "Galanin receptor subtypes." *Trends Pharmacol Sci* **21**(3): 109-117.
- Bremner, J. D., M. Narayan, E. R. Anderson, L. H. Staib, H. L. Miller and D. S. Charney (2000). "Hippocampal volume reduction in major depression." *Am J Psychiatry* **157**(1): 115-118.
- Bremner, J. D., M. Vythilingam, E. Vermetten, A. Nazeer, J. Adil, S. Khan, L. H. Staib and D. S. Charney (2002). "Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression." *Biol Psychiatry* **51**(4): 273-279.
- Brouwer, J. P., B. C. Appelhof, W. J. Hoogendijk, J. Huyser, E. Endert, C. Zuketto, A. H. Schene, J. G. Tijssen, R. Van Dyck, W. M. Wiersinga and E. Fliers (2005). "Thyroid and adrenal axis in major depression: a controlled study in outpatients." *Eur J Endocrinol* **152**(2): 185-191.
- Brunner, S. M., A. Farzi, F. Locker, B. S. Holub, M. Drexel, F. Reichmann, A. A. Lang, J. A. Mayr, J. J. Vilches, X. Navarro, R. Lang, G. Sperk, P. Holzer and B. Kofler (2014). "GAL3 receptor KO mice exhibit an anxiety-like phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(19): 7138-7143.
- Bunnemann, B., K. Fuxe, R. Metzger, B. Bjelke and D. Ganten (1992). "The semi-quantitative distribution and cellular localization of angiotensinogen mRNA in the rat brain." *J Chem Neuroanat* **5**(3): 245-262.
- Bunney, W. E., Jr. and J. M. Davis (1965). "Norepinephrine in depressive reactions. A review." *Arch Gen Psychiatry* **13**(6): 483-494.
- Burnet, P. W., A. Mead, S. L. Eastwood, K. Lacey, P. J. Harrison and T. Sharp (1995). "Repeated ECS differentially affects rat brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor expression." *Neuroreport* **6**(6): 901-904.
- Campos, A. C., M. V. Fogaca, D. C. Aguiar and F. S. Guimaraes (2013). "Animal models of anxiety disorders and stress." *Rev Bras Psiquiatr* **35 Suppl 2**: S101-111.
- Carlsson, A., K. Fuxe and U. Ungerstedt (1968). "The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons." *J Pharm Pharmacol* **20**(2): 150-151.
- Carr, G. V. and I. Lucki (2011). "The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies." *Psychopharmacology (Berl)* **213**(2-3): 265-287.

- Casanovas, J. M. and F. Artigas (1996). "Differential effects of ipsapirone on 5-hydroxytryptamine release in the dorsal and median raphe neuronal pathways." J Neurochem **67**(5): 1945-1952.
- Caspi, A., K. Sugden, T. E. Moffitt, A. Taylor, I. W. Craig, H. Harrington, J. McClay, J. Mill, J. Martin, A. Braithwaite and R. Poulton (2003). "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene." Science **301**(5631): 386-389.
- Castagne, V., R. D. Porsolt and P. Moser (2009). "Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse." Eur J Pharmacol **616**(1-3): 128-133.
- Celada, P., M. Puig, M. Amargos-Bosch, A. Adell and F. Artigas (2004). "The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression." J Psychiatry Neurosci **29**(4): 252-265.
- Celada, P., M. V. Puig, J. M. Casanovas, G. Guillazo and F. Artigas (2001). "Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors." J Neurosci **21**(24): 9917-9929.
- Cervo, L., C. Rossi, E. Tatarczynska and R. Samanin (1992). "Antidepressant-like effect of neurotensin administered in the ventral tegmental area in the forced swimming test." Psychopharmacology (Berl) **109**(3): 369-372.
- Cervo, L. and R. Samanin (1987). "Potential antidepressant properties of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a selective serotonin_{1A} receptor agonist." Eur J Pharmacol **144**(2): 223-229.
- Chaput, Y., C. de Montigny and P. Blier (1991). "Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat." Neuropsychopharmacology **5**(4): 219-229.
- Charney DS, Bremner JD (2006). En: Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press, 605-627.
- Chau, D. T., P. V. Rada, K. Kim, R. A. Kosloff and B. G. Hoebel (2011). "Fluoxetine alleviates behavioral depression while decreasing acetylcholine release in the nucleus accumbens shell." Neuropsychopharmacology **36**(8): 1729-1737.
- Chen, S. H. and G. Zhaori (2011). "Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations." Eur J Clin Invest **41**(2): 221-232.
- Chowdhury, G. M., T. Fujioka and S. Nakamura (2000). "Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress." Brain Res Bull **52**(3): 171-182.
- Cipriani, A., T. A. Furukawa, G. Salanti, J. R. Geddes, J. P. Higgins, R. Churchill, N. Watanabe, A. Nakagawa, I. M. Omori, H. McGuire, M. Tansella and C. Barbui (2009). "Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis." Lancet **373**(9665): 746-758.

Cipriani, A., M. Purgato, T. A. Furukawa, C. Trespidi, G. Imperadore, A. Signoretti, R. Churchill, N. Watanabe and C. Barbui (2012). "Citalopram versus other anti-depressive agents for depression." Cochrane Database Syst Rev **7**: CD006534.

Claiborne, B. J., D. G. Amaral and W. M. Cowan (1986). "A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus." J Comp Neurol **246**(4): 435-458.

Clarke, W. P., F. D. Yocca and S. Maayani (1996). "Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats." J Pharmacol Exp Ther **277**(3): 1259-1266.

Clement, Y., A. M. Le Guisquet, P. Venault, G. Chapouthier and C. Belzung (2009). "Pharmacological alterations of anxious behaviour in mice depending on both strain and the behavioural situation." PLoS One **4**(11): e7745.

Collinson, N. and G. R. Dawson (1997). "On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT_{1A} partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635." Psychopharmacology (Berl) **132**(1): 35-43.

Conrad, L. C., C. M. Leonard and D. W. Pfaff (1974). "Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study." J Comp Neurol **156**(2): 179-205.

Coppen, A. (1969). "Defects in monoamine metabolism and their possible importance in the pathogenesis of depressive syndromes." Psychiatr Neurol Neurochir **72**(2): 173-180.

Crawley, J. and F. K. Goodwin (1980). "Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines." Pharmacol Biochem Behav **13**(2): 167-170.

Crawley, J. N. (2008). "Galanin impairs cognitive abilities in rodents: relevance to Alzheimer's disease." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1836-1841.

Crawley, J. N., M. C. Austin, S. M. Fiske, B. Martin, S. Consolo, M. Berthold, U. Langel, G. Fisone and T. Bartfai (1990). "Activity of centrally administered galanin fragments on stimulation of feeding behavior and on galanin receptor binding in the rat hypothalamus." J Neurosci **10**(11): 3695-3700.

Crawley, J. N., P. J. Marangos, S. M. Paul, P. Skolnick and F. K. Goodwin (1981). "Interaction between purine and benzodiazepine: Inosine reverses diazepam-induced stimulation of mouse exploratory behavior." Science **211**(4483): 725-727.

Critchley, H. D. (2004). "The human cortex responds to an interoceptive challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6333-6334.

Cryan, J. F., R. J. Valentino and I. Lucki (2005). "Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test." Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 547-569.

Cussac, D., I. Rauly-Lestienne, P. Heusler, F. Finana, C. Cathala, S. Bernois and L. De Vries (2012). "mu-Opioid and 5-HT1A receptors heterodimerize and show signalling crosstalk via G protein and MAP-kinase pathways." Cell Signal **24**(8): 1648-1657.

Czesak, M., A. M. Burns, F. Remes Lenicov and P. R. Albert (2007). "Characterization of rat rostral raphe primary cultures: multiplex quantification of serotonergic markers." J Neurosci Methods **164**(1): 59-67.

Dahlstrom, A. and K. Fuxe (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." Experientia **20**(7): 398-399.

de Fougères, A., H. P. Vornlocher, J. Maraganore and J. Lieberman (2007). "Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics." Nat Rev Drug Discov **6**(6): 443-453.

de la Monte, S. M., M. Tong, N. Bowling and P. Moskal (2011). "si-RNA inhibition of brain insulin or insulin-like growth factor receptors causes developmental cerebellar abnormalities: relevance to fetal alcohol spectrum disorder." Mol Brain **4**: 13.

Delgado, P. L., L. H. Price, H. L. Miller, R. M. Salomon, G. K. Aghajanian, G. R. Heninger and D. S. Charney (1994). "Serotonin and the neurobiology of depression. Effects of tryptophan depletion in drug-free depressed patients." Arch Gen Psychiatry **51**(11): 865-874.

Descarries, L., K. C. Watkins, S. Garcia and A. Beaudet (1982). "The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study." J Comp Neurol **207**(3): 239-254.

Desikan, A., D. N. Wills and C. L. Ehlers (2014). "Ontogeny and adolescent alcohol exposure in Wistar rats: open field conflict, light/dark box and forced swim test." Pharmacol Biochem Behav **122**: 279-285.

Desmyter, S., C. van Heeringen and K. Audenaert (2011). "Structural and functional neuroimaging studies of the suicidal brain." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(4): 796-808.

Detke, M. J. and I. Lucki (1996). "Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth." Behav Brain Res **73**(1-2): 43-46.

Detke, M. J., M. Rickels and I. Lucki (1995). "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants." Psychopharmacology (Berl) **121**(1): 66-72.

Detke, M. J., S. Wieland and I. Lucki (1995). "Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT1A receptor antagonists." Psychopharmacology (Berl) **119**(1): 47-54.

Deussing JM (2006). Animal Model of depression. Drug Discovery Today: Disease Models, Vol.3 No. 4.

Diaz, Z., J. A. Narvaez, P. B. Hedlund, J. A. Aguirre, S. Gonzalez-Baron and K. Fuxe (1996). "Centrally infused galanin-(1-15) but not galanin-(1-29) reduces the baroreceptor reflex sensitivity in the rat." Brain Res **741**(1-2): 32-37.

Diaz-Cabiale, Z., M. P. Cordon, R. Covenas, A. Rivera, N. Yanaihara, K. Fuxe, S. Gonzalez-Baron and J. A. Narvaez (2002). "Propranolol blocks the tachycardia induced by galanin (1-15) but not by galanin (1-29)." Regul Pept **107**(1-3): 29-36.

Diaz-Cabiale, Z., J. A. Narvaez, U. B. Finnman, I. Bellido, S. O. Ogren and K. Fuxe (2000). "Galanin-(1-16) modulates 5-HT_{1A} receptors in the ventral limbic cortex of the rat." Neuroreport **11**(3): 515-519.

Diaz-Cabiale, Z., J. A. Narvaez, N. Yanaihara, S. Gonzalez-Baron and K. Fuxe (2000). "Galanin/alpha₂-receptor interactions in central cardiovascular control." Neuropharmacology **39**(8): 1377-1385.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, K. Fuxe, L. Agnati and J. A. Narvaez (2007). "Receptor-receptor interactions in central cardiovascular regulation. Focus on neuropeptide/alpha₂-adrenoreceptor interactions in the nucleus tractus solitarius." J Neural Transm **114**(1): 115-125.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, M. Narvaez, C. Millon, A. Puigcerver, K. Fuxe and J. A. Narvaez (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**(1-3): 130-136.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, M. Narvaez, C. Millon, A. Puigcerver, K. Fuxe and J. A. Narvaez (2010). "Neurochemical modulation of central cardiovascular control: the integrative role of galanin." EXS **102**: 113-131.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, M. Narvaez, A. Puigcerver, C. Millon, L. Santin, K. Fuxe and J. A. Narvaez (2011). "Galanin receptor/Neuropeptide Y receptor interactions in the dorsal raphe nucleus of the rat." Neuropharmacology **61**(1-2): 80-86.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, A. Rivera, A. de la Calle, L. Agnati, K. Fuxe and J. A. Narvaez (2006). "Galanin-neuropeptide Y (NPY) interactions in central cardiovascular control: involvement of the NPY Y receptor subtype." Eur J Neurosci **24**(2): 499-508.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, C. Vela, R. Covenas, N. Yanaihara, K. Fuxe, S. Gonzalez-Baron and J. A. Narvaez (2005). "Intracisternal galanin/angiotensin II interactions in central cardiovascular control." Regul Pept **127**(1-3): 133-140.

Diaz-Cabiale, Z., C. Parrado, C. Vela, H. Razani, R. Covenas, K. Fuxe and J. A. Narvaez (2005). "Role of galanin and galanin(1-15) on central cardiovascular control." Neuropeptides **39**(3): 185-190.

Difeo, A., F. Huang, J. Sangodkar, E. A. Terzo, D. Leake, G. Narla and J. A. Martignetti (2009). "KLF6-SV1 is a novel antiapoptotic protein that targets the BH3-only protein NOXA for degradation and whose inhibition extends survival in an ovarian cancer model." Cancer Res **69**(11): 4733-4741.

Dolga, A. M., I. Granic, T. Blank, H. G. Knaus, J. Spiess, P. G. Luiten, U. L. Eisel and I. M. Nijholt (2008). "TNF-alpha-mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF-kappaB-dependent up-regulation of K2.2 channels." J Neurochem **107**(4): 1158-1167.

Dreses-Werringloer, U., J. C. Lambert, V. Vingtdeux, H. Zhao, H. Vais, A. Siebert, A. Jain, J. Koppel, A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, F. Pasquier, D. Galimberti, E. Scarpini, D. Mann, C. Lendon, D. Campion, P. Amouyel, P. Davies, J. K. Foskett, F. Campagne and P. Marambaud (2008). "A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk." Cell **133**(7): 1149-1161.

Drevets, W. C. (2001). "Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders." Curr Opin Neurobiol **11**(2): 240-249.

Drevets, W. C., E. Frank, J. C. Price, D. J. Kupfer, D. Holt, P. J. Greer, Y. Huang, C. Gautier and C. Mathis (1999). "PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression." Biol Psychiatry **46**(10): 1375-1387.

Drevets, W. C., J. L. Price, M. E. Bardgett, T. Reich, R. D. Todd and M. E. Raichle (2002). "Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels." Pharmacol Biochem Behav **71**(3): 431-447.

Drevets, W. C., J. L. Price, J. R. Simpson, Jr., R. D. Todd, T. Reich, M. Vannier and M. E. Raichle (1997). "Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders." Nature **386**(6627): 824-827.

Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." Biol Psychiatry **59**(12): 1116-1127.

Eaton, K., F. R. Sallee and R. Sah (2007). "Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry." Curr Top Med Chem **7**(17): 1645-1659.

Eisch, A. J., C. A. Bolanos, J. de Wit, R. D. Simonak, C. M. Pudiak, M. Barrot, J. Verhaagen and E. J. Nestler (2003). "Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression." Biol Psychiatry **54**(10): 994-1005.

Ekblad, E., R. Hakanson, F. Sundler and C. Wahlestedt (1985). "Galanin: neuromodulatory and direct contractile effects on smooth muscle preparations." Br J Pharmacol **86**(1): 241-246.

el Mestikawy, S., M. Riad, A. M. Laporte, D. Verge, G. Daval, H. Gozlan and M. Hamon (1990). "Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide." Neurosci Lett **118**(2): 189-192.

Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-498.

Eskelinen, E. L. (2006). "Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy." Mol Aspects Med **27**(5-6): 495-502.

Estrada-Camarena, E., A. Fernandez-Guasti and C. Lopez-Rubalcava (2006). "Participation of the 5-HT_{1A} receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test." Neuropsychopharmacology **31**(2): 247-255.

Evenden, J. L. and K. Angeby-Moller (1990). "Effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) on locomotor activity and rearing of mice and rats." Psychopharmacology (Berl) **102**(4): 485-491.

Fava, M. and K. S. Kendler (2000). "Major depressive disorder." Neuron **28**(2): 335-341.

Ferguson, J. M. and R. N. Shingleton (2007). "An open-label, flexible-dose study of memantine in major depressive disorder." Clin Neuropharmacol **30**(3): 136-144.

Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.

Ferres-Coy, A., N. Santana, A. Castane, R. Cortes, M. C. Carmona, M. Toth, A. Montefeltro, F. Artigas and A. Bortolozzi (2013). "Acute 5-HT_{1A} autoreceptor knockdown increases antidepressant responses and serotonin release in stressful conditions." Psychopharmacology (Berl) **225**(1): 61-74.

Fichter, K. M., M. Flajolet, P. Greengard and T. Q. Vu (2010). "Kinetics of G-protein-coupled receptor endosomal trafficking pathways revealed by single quantum dots." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18658-18663.

Fisone, G., M. Berthold, K. Bedecs, A. Unden, T. Bartfai, R. Bertorelli, S. Consolo, J. Crawley, B. Martin, S. Nilsson and et al. (1989). "N-terminal galanin-(1-16) fragment is an agonist at the hippocampal galanin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9588-9591.

Flórez J y Pazos A (1997). Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: Flórez J, Armijo JA y Mediavilla A, editores, Farmacología Humana, 3a edición. Masson, Barcelona 1997.

Fox, J. E., B. Brooks, T. J. McDonald, W. Barnett, F. Kostolanska, C. Yanaihara, N. Yanaihara and A. Rokaeus (1988). "Actions of galanin fragments on rat, guinea-pig, and canine intestinal motility." Peptides **9**(5): 1183-1189.

Francis, P. T., A. Poynton, S. L. Lowe, A. Najlerahim, P. K. Bridges, J. R. Bartlett, A. W. Procter, C. J. Bruton and D. M. Bowen (1989). "Brain amino acid concentrations and Ca²⁺-dependent release in intractable depression assessed antemortem." Brain Res **494**(2): 315-324.

Freund, T. F. and G. Buzsaki (1996). "Interneurons of the hippocampus." Hippocampus **6**(4): 347-470.

Fujiwara, Y., D. L. Nelson, K. Kashihara, E. Varga, W. R. Roeske and H. I. Yamamura (1990). "The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene." Life Sci **47**(22): PL127-132.

Fuxe, K., D. O. Borroto-Escuela, D. Marcellino, W. Romero-Fernandez, M. Frankowska, D. Guidolin, M. Filip, L. Ferraro, A. S. Woods, A. Tarakanov, F. Ciruela, L. F. Agnati and S. Tanganelli (2012). "GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions." Curr Med Chem **19**(3): 356-363.

Fuxe, K., D. O. Borroto-Escuela, W. Romero-Fernandez, A. O. Tarakanov, F. Calvo, P. Garriga, M. Tena, M. Narvaez, C. Millon, C. Parrado, F. Ciruela, L. F. Agnati, J. A. Narvaez and Z. Diaz-Cabiale (2012). "On the existence and function of galanin receptor heteromers in the central nervous system." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 127.

Fuxe, K., A. Jansson, Z. Diaz-Cabiale, A. Andersson, B. Tinner, U. B. Finnman, I. Misane, H. Razani, F. H. Wang, L. F. Agnati and S. O. Ogren (1998). "Galanin modulates 5-hydroxytryptamine functions. Focus on galanin and galanin fragment/5-hydroxytryptamine1A receptor interactions in the brain." Ann N Y Acad Sci **863**: 274-290.

Fuxe, K. and T. Kenakin (2010). "The changing world of G protein-coupled receptors." J Recept Signal Transduct Res **30**(5): 271.

Fuxe, K., D. Marcellino, D. Guidolin, A. S. Woods and L. Agnati (2009). "Brain receptor mosaics and their intramembrane receptor-receptor interactions: molecular integration in transmission and novel targets for drug development." J Acupunct Meridian Stud **2**(1): 1-25.

Fuxe, K., D. Marcellino, A. Rivera, Z. Diaz-Cabiale, M. Filip, B. Gago, D. C. Roberts, U. Langel, S. Genedani, L. Ferraro, A. de la Calle, J. Narvaez, S. Tanganelli, A. Woods and L. F. Agnati (2008). "Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology." Brain Res Rev **58**(2): 415-452.

Fuxe, K., S. O. Ogren, A. Jansson, A. Cintra, A. Harfstrand and L. F. Agnati (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**(4): 579-581.

Fuxe, K., G. von Euler, L. F. Agnati and S. O. Ogren (1988). "Galanin selectively modulates 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the rat ventral limbic cortex." Neurosci Lett **85**(1): 163-167.

Gardier, A. M., I. Malagie, A. C. Trillat, C. Jacquot and F. Artigas (1996). "Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies." Fundam Clin Pharmacol **10**(1): 16-27.

Geisler, S., A. Berod, D. S. Zahm and W. Rostene (2006). "Brain neurotensin, psychostimulants, and stress--emphasis on neuroanatomical substrates." Peptides **27**(10): 2364-2384.

- Gelenberg, A. J. (2010). "The prevalence and impact of depression." J Clin Psychiatry **71**(3): e06.
- George, M. S. (2010). "Transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression." Expert Rev Neurother **10**(11): 1761-1772.
- Gold, P. W. and G. P. Chrousos (2002). "Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states." Mol Psychiatry **7**(3): 254-275.
- Goridis, C. and H. Rohrer (2002). "Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons." Nat Rev Neurosci **3**(7): 531-541.
- Gourley, S. L., F. J. Wu, D. D. Kiraly, J. E. Ploski, A. T. Kedves, R. S. Duman and J. R. Taylor (2008). "Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression." Biol Psychiatry **63**(4): 353-359.
- Gozlan, H., S. El Mestikawy, L. Pichat, J. Glowinski and M. Hamon (1983). "Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT." Nature **305**(5930): 140-142.
- Gozlan, H., S. Thibault, A. M. Laporte, L. Lima and M. Hamon (1995). "The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes." Eur J Pharmacol **288**(2): 173-186.
- Griebel, G. (1999). "Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders?" Pharmacol Ther **82**(1): 1-61.
- Griebel, G., C. Belzung, R. Misslin and E. Vogel (1993). "The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs." Behav Pharmacol **4**(6): 637-644.
- Grivas, V., A. Markou and N. Pitsikas (2013). "The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 induces anxiety-like behavior at the highest dose tested in two rat models of anxiety." Eur J Pharmacol **715**(1-3): 105-110.
- Groves, J. O. (2007). "Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression?" Mol Psychiatry **12**(12): 1079-1088.
- Gullberg, Shan Huang, Ann-Catrin Andersson (2010). Analyzing human epidermal growth factor receptor family dimerization and activation using Duolink® Nature Methods. Volume :7. Year published: (2010)
- Haas, A. K., E. Fuchs, R. Kopajtich and F. A. Barr (2005). "A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking." Nat Cell Biol **7**(9): 887-893.
- Habert-Ortoli, E., B. Amiranoff, I. Loquet, M. Laburthe and J. F. Mayaux (1994). "Molecular cloning of a functional human galanin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9780-9783.

Haddjeri, N., P. Blier and C. de Montigny (1998). "Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors." J Neurosci **18**(23): 10150-10156.

Hall, M. D., S. el Mestikawy, M. B. Emerit, L. Pichat, M. Hamon and H. Gozlan (1985). "[³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain." J Neurochem **44**(6): 1685-1696.

Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. J Comp Psychol, **18**:385-403.

Hamet, P. and J. Tremblay (2005). "Genetics and genomics of depression." Metabolism **54**(5 Suppl 1): 10-15.

Handley, S. L. and S. Mithani (1984). "Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **327**(1): 1-5.

Hasler, G., W. C. Drevets, H. K. Manji and D. S. Charney (2004). "Discovering endophenotypes for major depression." Neuropsychopharmacology **29**(10): 1765-1781.

Hedlund, P., G. von Euler and K. Fuxe (1991). "Activation of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors increases the affinity of galanin receptors in di- and telencephalic areas of the rat." Brain Res **560**(1-2): 251-259.

Hedlund, P. B., U. B. Finnman, N. Yanaihara and K. Fuxe (1994). "Galanin-(1-15), but not galanin-(1-29), modulates 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus of the rat brain: possible existence of galanin receptor subtypes." Brain Res **634**(1): 163-167.

Hedlund, P. B., N. Yanaihara and K. Fuxe (1992). "Evidence for specific N-terminal galanin fragment binding sites in the rat brain." Eur J Pharmacol **224**(2-3): 203-205.

Hensler, J. G. (2006). "Serotonergic modulation of the limbic system." Neurosci Biobehav Rev **30**(2): 203-214.

Herpfer, I., M. Katzev, B. Feige, B. L. Fiebich, U. Voderholzer and K. Lieb (2007). "Effects of substance P on memory and mood in healthy male subjects." Hum Psychopharmacol **22**(8): 567-573.

Herpfer, I. and K. Lieb (2003). "Substance P and Substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders." World J Biol Psychiatry **4**(2): 56-63.

Herpfer, I. and K. Lieb (2005). "Substance P receptor antagonists in psychiatry: rationale for development and therapeutic potential." CNS Drugs **19**(4): 275-293.

Herrick-Davis, K. (2013). "Functional significance of serotonin receptor dimerization." Exp Brain Res **230**(4): 375-386.

Hervas, I., M. T. Vilaro, L. Romero, M. C. Scorza, G. Mengod and F. Artigas (2001). "Desensitization of 5-HT(1A) autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635." Neuropsychopharmacology **24**(1): 11-20.

Hillegaart, V., M. L. Wadenberg and S. Ahlenius (1989). "Effects of 8-OH-DPAT on motor activity in the rat." Pharmacol Biochem Behav **32**(3): 797-800.

Hinojosa, F. R., L. Spricigo, Jr., G. S. Izidio, G. R. Bruske, D. M. Lopes and A. Ramos (2006). "Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression." Behav Brain Res **168**(1): 127-136.

Hiramatsu, M., H. Mori, H. Murasawa and T. Kameyama (1996). "Improvement by dynorphin A (1-13) of galanin-induced impairment of memory accompanied by blockade of reductions in acetylcholine release in rats." Br J Pharmacol **118**(2): 255-260.

Hjorth, S. and T. Sharp (1991). "Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis." Life Sci **48**(18): 1779-1786.

Hjorth, S., C. S. Suchowski and M. P. Galloway (1995). "Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain." Synapse **19**(3): 170-176.

Hobson, S. A., A. Bacon, C. R. Elliot-Hunt, F. E. Holmes, N. C. Kerr, R. Pope, P. Vanderplank and D. Wynick (2008). "Galanin acts as a trophic factor to the central and peripheral nervous systems." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1806-1812.

Holets, V. R., T. Hokfelt, A. Rokaeus, L. Terenius and M. Goldstein (1988). "Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus." Neuroscience **24**(3): 893-906.

Holmes, A. (2001). "Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice." Neurosci Biobehav Rev **25**(3): 261-273.

Holmes, A., M. Heilig, N. M. Rupniak, T. Steckler and G. Griebel (2003). "Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders." Trends Pharmacol Sci **24**(11): 580-588.

Holmes, A., J. W. Kinney, C. C. Wrenn, Q. Li, R. J. Yang, L. Ma, J. Vishwanath, M. C. Saavedra, C. E. Innerfield, A. S. Jacoby, J. Shine, T. P. Iismaa and J. N. Crawley (2003). "Galanin GAL-R1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze." Neuropsychopharmacology **28**(6): 1031-1044.

Holmes, A., Q. Li, E. A. Koenig, E. Gold, D. Stephenson, R. J. Yang, J. Dreiling, T. Sullivan and J. N. Crawley (2005). "Phenotypic assessment of galanin overexpressing and

galanin receptor R1 knockout mice in the tail suspension test for depression-related behavior." Psychopharmacology (Berl) **178**(2-3): 276-285.

Holmes, A. and M. R. Picciotto (2006). "Galanin: a novel therapeutic target for depression, anxiety disorders and drug addiction?" CNS Neurol Disord Drug Targets **5**(2): 225-232.

Hornung, J. P. (2003). "The human raphe nuclei and the serotonergic system." J Chem Neuroanat **26**(4): 331-343.

Howard, A. D., C. Tan, L. L. Shiao, O. C. Palyha, K. K. McKee, D. H. Weinberg, S. D. Feighner, M. A. Cascieri, R. G. Smith, L. H. Van Der Ploeg and K. A. Sullivan (1997). "Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin." FEBS Lett **405**(3): 285-290.

Hoyer, D., D. E. Clarke, J. R. Fozard, P. R. Hartig, G. R. Martin, E. J. Mylecharane, P. R. Saxena and P. P. Humphrey (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev **46**(2): 157-203.

Hoyer, D., J. P. Hannon and G. R. Martin (2002). "Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors." Pharmacol Biochem Behav **71**(4): 533-554.

Hughes, P. and M. Dragunow (1995). "Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system." Pharmacol Rev **47**(1): 133-178.

Hunsberger, J. G., S. S. Newton, A. H. Bennett, C. H. Duman, D. S. Russell, S. R. Salton and R. S. Duman (2007). "Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF." Nat Med **13**(12): 1476-1482.

Husum, H., D. Van Kammen, E. Termeer, G. Bolwig and A. Mathe (2003). "Topiramate normalizes hippocampal NPY-LI in flinders sensitive line 'depressed' rats and upregulates NPY, galanin, and CRH-LI in the hypothalamus: implications for mood-stabilizing and weight loss-inducing effects." Neuropsychopharmacology **28**(7): 1292-1299.

Imai, H., D. A. Steindler and S. T. Kitai (1986). "The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat." J Comp Neurol **243**(3): 363-380.

Invernizzi, R., M. Carli, A. Di Clemente and R. Samanin (1991). "Administration of 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino)tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: differences in potency and regional sensitivity." J Neurochem **56**(1): 243-247.

Ishizuka, N., W. M. Cowan and D. G. Amaral (1995). "A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus." J Comp Neurol **362**(1): 17-45.

Iversen, L. L. (1965). "The inhibition of noradrenaline uptake by drugs." Adv Drug Res **2**: 1-46.

Jacobowitz, D. M., A. Kresse and G. Skofitsch (2004). "Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography--a historical review." Peptides **25**(3): 433-464.

Janowsky, D. S., M. K. el-Yousef, J. M. Davis and H. J. Sekerke (1972). "A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression." Lancet **2**(7778): 632-635.

Jean, A., G. Conductier, C. Manrique, C. Bouras, P. Berta, R. Hen, Y. Charnay, J. Bockaert and V. Compan (2007). "Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT4 receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16335-16340.

Jimenez Vasquez, P. A., P. Salmi, S. Ahlenius and A. A. Mathe (2000). "Neuropeptide Y in brains of the Flinders Sensitive Line rat, a model of depression. Effects of electroconvulsive stimuli and d-amphetamine on peptide concentrations and locomotion." Behav Brain Res **111**(1-2): 115-123.

Jimenez-Andrade, J. M., L. Lundstrom, U. E. Sollenberg, U. Langel, G. Castaneda-Hernandez and S. M. Carlton (2006). "Activation of peripheral galanin receptors: differential effects on nociception." Pharmacol Biochem Behav **85**(1): 273-280.

Juhasz, G., G. Hullam, N. Eszlari, X. Gonda, P. Antal, I. M. Anderson, T. G. Hokfelt, J. F. Deakin and G. Bagdy (2014). "Brain galanin system genes interact with life stresses in depression-related phenotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(16): E1666-1673.

Jung, S. J., J. W. Chang, R. Won, M. H. Cha, T. S. Nam, H. J. Lee and B. H. Lee (2009). "Modulation of neuropathic pain by galanin and neuropeptide Y at the level of the medulla in rats." Int J Neurosci **119**(10): 1941-1955.

Kanazawa, T., P. K. Kommareddi, T. Iwashita, B. Kumar, K. Misawa, Y. Misawa, I. Jang, T. S. Nair, Y. Iino and T. E. Carey (2009). "Galanin receptor subtype 2 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in p53 mutant head and neck cancer cells." Clin Cancer Res **15**(7): 2222-2230.

Kandel E, Schwartz J, Jessel T (2001). Principios de Neurociencias. Capítulo 61: Trastornos del estado del animo: Depresión, manía y trastornos de ansiedad. 2001:1209- 1226. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España.

Karakas, A., H. Coskun, A. Kaya, A. Kucuk and B. Gunduz (2011). "The effects of the intraamygdalar melatonin injections on the anxiety like behavior and the spatial memory performance in male Wistar rats." Behav Brain Res **222**(1): 141-150.

Karege, F., G. Vaudan, M. Schwald, N. Perroud and R. La Harpe (2005). "Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs." Brain Res Mol Brain Res **136**(1-2): 29-37.

Katon, W. and P. P. Roy-Byrne (1991). "Mixed anxiety and depression." J Abnorm Psychol **100**(3): 337-345.

- Kehr, J., T. Yoshitake, F. H. Wang, H. Razani, L. Gimenez-Llort, A. Jansson, M. Yamaguchi and S. O. Ogren (2002). "Galanin is a potent in vivo modulator of mesencephalic serotonergic neurotransmission." Neuropsychopharmacology **27**(3): 341-356.
- Keller, M., S. Montgomery, W. Ball, M. Morrison, D. Snavely, G. Liu, R. Hargreaves, J. Hietala, C. Lines, K. Beebe and S. Reines (2006). "Lack of efficacy of the substance p (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder." Biol Psychiatry **59**(3): 216-223.
- Kempermann, G. (2008). "The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for?" Trends Neurosci **31**(4): 163-169.
- Kenakin, T. (2010). "G protein coupled receptors as allosteric proteins and the role of allosteric modulators." J Recept Signal Transduct Res **30**(5): 313-321.
- Kendler, K. S., M. Gatz, C. O. Gardner and N. L. Pedersen (2006). "A Swedish national twin study of lifetime major depression." Am J Psychiatry **163**(1): 109-114.
- Kia, H. K., M. J. Brisorgueil, M. Hamon, A. Calas and D. Verge (1996). "Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine1A receptors in the rat brain." J Neurosci Res **46**(6): 697-708.
- Kia, H. K., M. C. Miquel, M. J. Brisorgueil, G. Daval, M. Riad, S. El Mestikawy, M. Hamon and D. Verge (1996). "Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system." J Comp Neurol **365**(2): 289-305.
- Kim, J. S., W. Schmid-Burgk, D. Claus and H. H. Kornhuber (1982). "Increased serum glutamate in depressed patients." Arch Psychiatr Nervenkr **232**(4): 299-304.
- Kimbrell, T. A., T. A. Ketter, M. S. George, J. T. Little, B. E. Benson, M. W. Willis, P. Herscovitch and R. M. Post (2002). "Regional cerebral glucose utilization in patients with a range of severities of unipolar depression." Biol Psychiatry **51**(3): 237-252.
- Kobilka, B. K., T. Frielle, S. Collins, T. Yang-Feng, T. S. Kobilka, U. Francke, R. J. Lefkowitz and M. G. Caron (1987). "An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins." Nature **329**(6134): 75-79.
- Kofler, B., M. L. Liu, A. S. Jacoby, J. Shine and T. P. Iismaa (1996). "Molecular cloning and characterisation of the mouse preprogalanin gene." Gene **182**(1-2): 71-75.
- Kohler, C. and H. Steinbusch (1982). "Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain." Neuroscience **7**(4): 951-975.
- Kokare, D. M., M. P. Dandekar, C. T. Chopde and N. Subhedar (2005). "Interaction between neuropeptide Y and alpha-melanocyte stimulating hormone in amygdala regulates anxiety in rats." Brain Res **1043**(1-2): 107-114.

Kole, R., A. R. Krainer and S. Altman (2012). "RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides." Nat Rev Drug Discov **11**(2): 125-140.

Kormos, V. and B. Gaszner (2013). "Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans." Neuropeptides **47**(6): 401-419.

Kosofsky, B. E. and M. E. Molliver (1987). "The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei." Synapse **1**(2): 153-168.

Kramer, M. S., N. Cutler, J. Feighner, R. Shrivastava, J. Carman, J. J. Sramek, S. A. Reines, G. Liu, D. Snavely, E. Wyatt-Knowles, J. J. Hale, S. G. Mills, M. MacCoss, C. J. Swain, T. Harrison, R. G. Hill, F. Hefti, E. M. Scolnick, M. A. Cascieri, G. G. Chicchi, S. Sadowski, A. R. Williams, L. Hewson, D. Smith, E. J. Carlson, R. J. Hargreaves and N. M. Rupniak (1998). "Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors." Science **281**(5383): 1640-1645.

Krishnan, K. R., W. M. McDonald, P. R. Escalona, P. M. Doraiswamy, C. Na, M. M. Husain, G. S. Figiel, O. B. Boyko, E. H. Ellinwood and C. B. Nemeroff (1992). "Magnetic resonance imaging of the caudate nuclei in depression. Preliminary observations." Arch Gen Psychiatry **49**(7): 553-557.

Krishnan, V., M. H. Han, D. L. Graham, O. Berton, W. Renthal, S. J. Russo, Q. Laplant, A. Graham, M. Lutter, D. C. Lagace, S. Ghose, R. Reister, P. Tannous, T. A. Green, R. L. Neve, S. Chakravarty, A. Kumar, A. J. Eisch, D. W. Self, F. S. Lee, C. A. Tamminga, D. C. Cooper, H. K. Gershenfeld and E. J. Nestler (2007). "Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions." Cell **131**(2): 391-404.

Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature **455**(7215): 894-902.

Krystal, J. H., G. Sanacora, H. Blumberg, A. Anand, D. S. Charney, G. Marek, C. N. Epperson, A. Goddard and G. F. Mason (2002). "Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments." Mol Psychiatry **7 Suppl 1**: S71-80.

Kulkarni, S. K. and A. Dhir (2009). "Current investigational drugs for major depression." Expert Opin Investig Drugs **18**(6): 767-788.

Kuteeva, E., T. Hokfelt and S. O. Ogren (2005). "Behavioural characterisation of young adult transgenic mice overexpressing galanin under the PDGF-B promoter." Regul Pept **125**(1-3): 67-78.

Kuteeva, E., T. Hokfelt, T. Wardi and S. O. Ogren (2008). "Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1854-1863.

Kuteeva, E., T. Wardi, T. Hokfelt and S. O. Ogren (2007). "Galanin enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat." Eur Neuropsychopharmacol **17**(1): 64-69.

Kuteeva, E., T. Wardi, L. Lundstrom, U. Sollenberg, U. Langel, T. Hokfelt and S. O. Ogren (2008). "Differential role of galanin receptors in the regulation of depression-like behavior and monoamine/stress-related genes at the cell body level." Neuropsychopharmacology **33**(11): 2573-2585.

Lagny-Pourmir, I., A. M. Lorinet, N. Yanaihara and M. Laburthe (1989). "Structural requirements for galanin interaction with receptors from pancreatic beta cells and from brain tissue of the rat." Peptides **10**(4): 757-761.

Land, T., U. Langel and T. Bartfai (1991). "Hypothalamic degradation of galanin(1-29) and galanin(1-16): identification and characterization of the peptidolytic products." Brain Res **558**(2): 245-250.

Lanfume, L. and M. Hamon (2000). "Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics." Nucl Med Biol **27**(5): 429-435.

Lang, R., A. L. Gundlach and B. Kofler (2007). "The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease." Pharmacol Ther **115**(2): 177-207.

Lanni, C., S. Govoni, A. Lucchelli and C. Boselli (2009). "Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects." Cell Mol Life Sci **66**(18): 2985-3008.

Le Maitre, T. W., S. Xia, E. Le Maitre, X. P. Dun, J. Lu, E. Theodorsson, S. O. Ogren, T. Hokfelt and Z. Q. Xu (2011). "Galanin receptor 2 overexpressing mice display an antidepressive-like phenotype: possible involvement of the subiculum." Neuroscience **190**: 270-288.

Lee, C. and R. J. Rodgers (1991). "Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice." Behav Pharmacol **2**(6): 491-496.

Leibowitz, S. F. (1998). "Differential functions of hypothalamic galanin cell groups in the regulation of eating and body weight." Ann N Y Acad Sci **863**: 206-220.

Leibowitz, S. F., A. Akabayashi, J. Wang, J. T. Alexander, J. T. Dourmashkin and G. Q. Chang (2007). "Increased caloric intake on a fat-rich diet: role of ovarian steroids and galanin in the medial preoptic and paraventricular nuclei and anterior pituitary of female rats." J Neuroendocrinol **19**(10): 753-766.

Lembo, P. M. and P. R. Albert (1995). "Multiple phosphorylation sites are required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor by protein kinase C." Mol Pharmacol **48**(6): 1024-1029.

Lemondé, S., G. Turecki, D. Bakish, L. Du, P. D. Hrdina, C. D. Bown, A. Sequeira, N. Kushwaha, S. J. Morris, A. Basak, X. M. Ou and P. R. Albert (2003). "Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide." J Neurosci **23**(25): 8788-8799.

Lerner, J. T., R. Sankar and A. M. Mazarati (2008). "Galanin and epilepsy." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1864-1871.

Lesch, K. P., D. Bengel, A. Heils, S. Z. Sabol, B. D. Greenberg, S. Petri, J. Benjamin, C. R. Muller, D. H. Hamer and D. L. Murphy (1996). "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." Science **274**(5292): 1527-1531.

Lesch, K. P. and J. Waider (2012). "Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders." Neuron **76**(1): 175-191.

Levine, J., K. Panchalingam, A. Rapoport, S. Gershon, R. J. McClure and J. W. Pettegrew (2000). "Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients." Biol Psychiatry **47**(7): 586-593.

Lingor, P., P. Koeberle, S. Kugler and M. Bahr (2005). "Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo." Brain **128**(Pt 3): 550-558.

Liotti, M. and H. S. Mayberg (2001). "The role of functional neuroimaging in the neuropsychology of depression." J Clin Exp Neuropsychol **23**(1): 121-136.

Lorenzetti, V., N. B. Allen, A. Fornito and M. Yucel (2009). "Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies." J Affect Disord **117**(1-2): 1-17.

Loughlin, S. E., S. L. Foote and R. Grzanna (1986). "Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets." Neuroscience **18**(2): 307-319.

Louis, C., J. Stemmelin, D. Boulay, O. Bergis, C. Cohen and G. Griebel (2008). "Additional evidence for anxiolytic- and antidepressant-like activities of saredutant (SR48968), an antagonist at the neurokinin-2 receptor in various rodent-models." Pharmacol Biochem Behav **89**(1): 36-45.

Lowry CA, Evans K, Gasser PJ, Hale MW, Staub DR, Shekhar A (2008). Topographic organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and the median raphe nucleus. Serotonin and sleep: molecular, functional and clinical aspects. Birkhäuser Verlag, 2008.

Lu, X., A. M. Barr, J. W. Kinney, P. Sanna, B. Conti, M. M. Behrens and T. Bartfai (2005). "A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 874-879.

Lu, X., L. Lundstrom, U. Langel and T. Bartfai (2005). "Galanin receptor ligands." Neuropeptides **39**(3): 143-146.

Lu, X., B. Ross, M. Sanchez-Alavez, E. P. Zorrilla and T. Bartfai (2008). "Phenotypic analysis of GalR2 knockout mice in anxiety- and depression-related behavioral tests." Neuropeptides **42**(4): 387-397.

Lucki, I. (1997). "The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs." Behav Pharmacol **8**(6-7): 523-532.

Lucki, I., A. Singh and D. S. Kreiss (1994). "Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists." Neurosci Biobehav Rev **18**(1): 85-95.

Lui HX, Brumowski P, Schmidt R, Brown W, Payza K, Hodzic L, Pou C, Godbout C, Hökfelt T (2001). Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: selective actions via GalR1 and GalR2 receptors. Proc Natl Acad Sci USA., **98**:9960-9964.

Lukasiewicz, S., E. Blasiak, A. Faron-Gorecka, A. Polit, M. Tworzydło, A. Gorecki, Z. Wasylewski and M. Dziedzicka-Wasylewska (2007). "Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A2A and serotonin 5-HT1A receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane." Pharmacol Rep **59**(4): 379-392.

Lundberg, C., U. Englund, D. Trono, A. Bjorklund and K. Wictorin (2002). "Differentiation of the RN33B cell line into forebrain projection neurons after transplantation into the neonatal rat brain." Exp Neurol **175**(2): 370-387.

MacLean, P. D. (1985). "Evolutionary psychiatry and the triune brain." Psychol Med **15**(2): 219-221.

Magalhaes, A. C., H. Dunn and S. S. Ferguson (2012). "Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins." Br J Pharmacol **165**(6): 1717-1736.

Magloczky, Z., L. Acsády and T. F. Freund (1994). "Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat." Hippocampus **4**(3): 322-334.

Makimura, H., T. M. Mizuno, J. W. Mastaitis, R. Agami and C. V. Mobbs (2002). "Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake." BMC Neurosci **3**: 18.

Malison, R. T., L. H. Price, R. Berman, C. H. van Dyck, G. H. Pelton, L. Carpenter, G. Sanacora, M. J. Owens, C. B. Nemeroff, N. Rajeevan, R. M. Baldwin, J. P. Seibyl, R. B. Innis and D. S. Charney (1998). "Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [¹²³I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography." Biol Psychiatry **44**(11): 1090-1098.

Mamounas, L. A., C. A. Mullen, E. O'Hearn and M. E. Molliver (1991). "Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives." J Comp Neurol **314**(3): 558-586.

Manji, H. K., W. C. Drevets and D. S. Charney (2001). "The cellular neurobiology of depression." Nat Med **7**(5): 541-547.

Manji, H. K. and R. H. Lenox (2000). "The nature of bipolar disorder." J Clin Psychiatry **61 Supp 13**: 42-57.

- Manrique, C., V. Compan, C. Rosselet and S. G. Duflo (2009). "Specific knock-down of GAD67 in the striatum using naked small interfering RNAs." *J Biotechnol* **142**(3-4): 185-192.
- Marchese, A., C. Chen, Y. M. Kim and J. L. Benovic (2003). "The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking." *Trends Biochem Sci* **28**(7): 369-376.
- Marcos, P., Z. Diaz-Cabiale, M. P. Cordon, R. Covenas, N. Yanaihara, K. Fuxe, S. Gonzalez-Baron and J. A. Narvaez (2001). "Central galanin and N-terminal galanin fragment induce c-Fos immunoreactivity in the medulla oblongata of the anesthetized rat." *Peptides* **22**(9): 1501-1509.
- Martinowich, K., H. Manji and B. Lu (2007). "New insights into BDNF function in depression and anxiety." *Nat Neurosci* **10**(9): 1089-1093.
- Mathe, A. A., H. Husum, A. El Khoury, P. Jimenez-Vasquez, S. H. Gruber, G. Wortwein, G. Nikisch, P. Baumann, H. Agren, W. Andersson, A. Sodergren and F. Angelucci (2007). "Search for biological correlates of depression and mechanisms of action of antidepressant treatment modalities. Do neuropeptides play a role?" *Physiol Behav* **92**(1-2): 226-231.
- Mayberg, H. S., S. K. Brannan, J. L. Tekell, J. A. Silva, R. K. Mahurin, S. McGinnis and P. A. Jerabek (2000). "Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response." *Biol Psychiatry* **48**(8): 830-843.
- Mayberg, H. S., M. Liotti, S. K. Brannan, S. McGinnis, R. K. Mahurin, P. A. Jerabek, J. A. Silva, J. L. Tekell, C. C. Martin, J. L. Lancaster and P. T. Fox (1999). "Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness." *Am J Psychiatry* **156**(5): 675-682.
- McEwen, B. S. (2007). "Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain." *Physiol Rev* **87**(3): 873-904.
- McKinney, W. T., Jr. and W. E. Bunney, Jr. (1969). "Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research." *Arch Gen Psychiatry* **21**(2): 240-248.
- Melander, T., T. Hokfelt, A. Rokaeus, A. C. Cuello, W. H. Oertel, A. Verhofstad and M. Goldstein (1986). "Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS." *J Neurosci* **6**(12): 3640-3654.
- Merali, Z., P. Kent, L. Du, P. Hrdina, M. Palkovits, G. Faludi, M. O. Poulter, T. Bedard and H. Anisman (2006). "Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects." *Biol Psychiatry* **59**(7): 594-602.
- Michel, M. C., T. Wieland and G. Tsujimoto (2009). "How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies?" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **379**(4): 385-388.

Michelsen, K. A., C. Schmitz and H. W. Steinbusch (2007). "The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression." Brain Res Rev **55**(2): 329-342.

Middlemiss, D. N. and J. R. Fozard (1983). "8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site." Eur J Pharmacol **90**(1): 151-153.

Miller, H. L., P. L. Delgado, R. M. Salomon, R. Berman, J. H. Krystal, G. R. Heninger and D. S. Charney (1996). "Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression." Arch Gen Psychiatry **53**(2): 117-128.

Millon, C., A. Flores-Burgess, M. Narvaez, D. O. Borroto-Escuela, L. Santin, C. Parrado, J. A. Narvaez, K. Fuxe and Z. Diaz-Cabiale (2014). "A Role For Galanin N-Terminal Fragment (1-15) In Anxiety- And Depression-Related Behaviours In Rats." Int J Neuropsychopharmacol.

Mineka, S., M. Davidson, M. Cook and R. Keir (1984). "Observational conditioning of snake fear in rhesus monkeys." J Abnorm Psychol **93**(4): 355-372.

Misane, I., H. Razani, F. H. Wang, A. Jansson, K. Fuxe and S. O. Ogren (1998). "Intraventricular galanin modulates a 5-HT_{1A} receptor-mediated behavioural response in the rat." Eur J Neurosci **10**(4): 1230-1240.

Mitani, H., Y. Shirayama, T. Yamada, K. Maeda, C. R. Ashby, Jr. and R. Kawahara (2006). "Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **30**(6): 1155-1158.

Mitchell, A. J. (1998). "The role of corticotropin releasing factor in depressive illness: a critical review." Neurosci Biobehav Rev **22**(5): 635-651.

Mitsukawa, K., X. Lu and T. Bartfai (2008). "Galanin, galanin receptors and drug targets." Cell Mol Life Sci **65**(12): 1796-1805.

Mitsukawa, K., X. Lu and T. Bartfai (2010). "Galanin, galanin receptors, and drug targets." EXS **102**: 7-23.

Modinos, G., J. Ormel and A. Aleman (2009). "Activation of anterior insula during self-reflection." PLoS One **4**(2): e4618.

Molchan, S. E., J. L. Hill, R. A. Martinez, B. A. Lawlor, A. M. Mellow, D. R. Rubinow, G. Bissette, C. B. Nemeroff and T. Sunderland (1993). "CSF somatostatin in Alzheimer's disease and major depression: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and clinical measures." Psychoneuroendocrinology **18**(7): 509-519.

Moller, C., W. Sommer, A. Thorsell and M. Heilig (1999). "Anxiogenic-like action of galanin after intra-amygdala administration in the rat." Neuropsychopharmacology **21**(4): 507-512.

Monteggia, L. M., M. Barrot, C. M. Powell, O. Berton, V. Galanis, T. Gemelli, S. Meuth, A. Nagy, R. W. Greene and E. J. Nestler (2004). "Essential role of brain-derived

neurotrophic factor in adult hippocampal function." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10827-10832.

Monteggia, L. M., B. Luikart, M. Barrot, D. Theobald, I. Malkovska, S. Nef, L. F. Parada and E. J. Nestler (2007). "Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors." Biol Psychiatry **61**(2): 187-197.

Moore, R. Y. and A. E. Halaris (1975). "Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat." J Comp Neurol **164**(2): 171-183.

Morilak, D. A., M. Cecchi and H. Khoshbouei (2003). "Interactions of norepinephrine and galanin in the central amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis modulate the behavioral response to acute stress." Life Sci **73**(6): 715-726.

Mosko, S., G. Lynch and C. W. Cotman (1973). "The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat." J Comp Neurol **152**(2): 163-174.

Murck, H., K. Held, M. Ziegenbein, H. Kunzel, F. Holsboer and A. Steiger (2004). "Intravenous administration of the neuropeptide galanin has fast antidepressant efficacy and affects the sleep EEG." Psychoneuroendocrinology **29**(9): 1205-1211.

Murphy, J. E., B. E. Padilla, B. Hasdemir, G. S. Cottrell and N. W. Bunnett (2009). "Endosomes: a legitimate platform for the signaling train." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17615-17622.

Naber, P. A., F. H. Lopes da Silva and M. P. Witter (2001). "Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum." Hippocampus **11**(2): 99-104.

Nakajima, H., T. Kubo, Y. Semi, M. Itakura, M. Kuwamura, T. Izawa, Y. T. Azuma and T. Takeuchi (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**(2): 326-333.

Narvaez, J. A., Z. Diaz-Cabiale, P. B. Hedlund, J. A. Aguirre, R. Covenas, S. Gonzalez-Baron and K. Fuxe (2000). "The galanin receptor antagonist M40 blocks the central cardiovascular actions of the galanin N-terminal fragment (1-15)." Eur J Pharmacol **399**(2-3): 197-203.

Narvaez, M., C. Millon, D. Borroto-Escuela, A. Flores-Burgess, L. Santin, C. Parrado, B. Gago, A. Puigcerver, K. Fuxe, J. A. Narvaez and Z. Diaz-Cabiale (2014). "Galanin receptor 2-neuropeptide Y Y1 receptor interactions in the amygdala lead to increased anxiolytic actions." Brain Struct Funct.

Neff, C. D., V. Abkevich, J. C. Packer, Y. Chen, J. Potter, R. Riley, C. Davenport, J. DeGrado Warren, S. Jammulapati, A. Bhatena, W. S. Choi, P. E. Kroeger, R. E. Metzger, A. Gutin, M. H. Skolnick, D. Shattuck and D. A. Katz (2009). "Evidence for HTR1A and LHPP as interacting genetic risk factors in major depression." Mol Psychiatry **14**(6): 621-630.

Nemeroff, C. B. (1980). "Neurotensin: perchance an endogenous neuroleptic?" Biol Psychiatry **15**(2): 283-302.

Nemeroff, C. B. (1998). "The neurobiology of depression." Sci Am **278**(6): 42-49.

Nemeroff, C. B. and M. J. Owens (2002). "Treatment of mood disorders." Nat Neurosci **5 Suppl**: 1068-1070.

Nestler, E. J., M. Barrot, R. J. DiLeone, A. J. Eisch, S. J. Gold and L. M. Monteggia (2002). "Neurobiology of depression." Neuron **34**(1): 13-25.

Nestler, Erik J.; Hyman, Steven E.; Malenka, Robert (2008). Molecular Neuropharmacology. ISBN 10:0071481273/0-07-148127-3. 2008.

Nutt, D. J. (2002). "The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression." Int Clin Psychopharmacol **17 Suppl 1**: S1-12.

O'Donnell, D., S. Ahmad, C. Wahlestedt and P. Walker (1999). "Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1." J Comp Neurol **409**(3): 469-481.

Ogren, S. O., H. Razani, E. Elvander-Tottie and J. Kehr (2007). "The neuropeptide galanin as an in vivo modulator of brain 5-HT_{1A} receptors: possible relevance for affective disorders." Physiol Behav **92**(1-2): 172-179.

Palazidou, E. (2012). "The neurobiology of depression." Br Med Bull **101**: 127-145.

Pandya, M., M. Altinay, D. A. Malone, Jr. and A. Anand (2012). "Where in the brain is depression?" Curr Psychiatry Rep **14**(6): 634-642.

Paredes, R. G. and A. Agmo (1992). "GABA and behavior: the role of receptor subtypes." Neurosci Biobehav Rev **16**(2): 145-170.

Parent, A., L. Descarries and A. Beaudet (1981). "Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine." Neuroscience **6**(2): 115-138.

Pariante, C. M. (2003). "Depression, stress and the adrenal axis." J Neuroendocrinol **15**(8): 811-812.

Parker, K. J., A. F. Schatzberg and D. M. Lyons (2003). "Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression." Horm Behav **43**(1): 60-66.

Parrado, C., Z. Diaz-Cabiale, M. Garcia-Coronel, L. F. Agnati, R. Covenas, K. Fuxe and J. A. Narvaez (2007). "Region specific galanin receptor/neuropeptide Y Y₁ receptor interactions in the tel- and diencephalon of the rat. Relevance for food consumption." Neuropharmacology **52**(2): 684-692.

Paxinos, George; Charles Watson . The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Inc. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA <http://www.apnet.com>

- Pedigo, N. W., H. I. Yamamura and D. L. Nelson (1981). "Discrimination of multiple [3H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain." J Neurochem **36**(1): 220-226.
- Pellow, S. and S. E. File (1986). "Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat." Pharmacol Biochem Behav **24**(3): 525-529.
- Petty, F. (1995). "GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis." J Affect Disord **34**(4): 275-281.
- Petty, F., G. L. Kramer, C. M. Gullion and A. J. Rush (1992). "Low plasma gamma-aminobutyric acid levels in male patients with depression." Biol Psychiatry **32**(4): 354-363.
- Picciotto, M. R. (2010). "Galanin and addiction." EXS **102**: 195-208.
- Pitkanen, A., M. Pikkarainen, N. Nurminen and A. Ylinen (2000). "Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review." Ann N Y Acad Sci **911**: 369-391.
- Pittenger, C. and R. S. Duman (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." Neuropsychopharmacology **33**(1): 88-109.
- Pitts, A. F., S. D. Samuelson, W. H. Meller, G. Bissette, C. B. Nemeroff and R. G. Kathol (1995). "Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and oxytocin concentrations in treated patients with major depression and controls." Biol Psychiatry **38**(5): 330-335.
- Polo, S. and P. P. Di Fiore (2006). "Endocytosis conducts the cell signaling orchestra." Cell **124**(5): 897-900.
- Porsolt, R. D., G. Anton, N. Blavet and M. Jalfre (1978). "Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments." Eur J Pharmacol **47**(4): 379-391.
- Porsolt, R. D., A. Bertin and M. Jalfre (1978). "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine." Eur J Pharmacol **51**(3): 291-294.
- Porsolt, R. D., M. Le Pichon and M. Jalfre (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." Nature **266**(5604): 730-732.
- Price, J. L. and W. C. Drevets (2010). "Neurocircuitry of mood disorders." Neuropsychopharmacology **35**(1): 192-216.
- Prut, L. and C. Belzung (2003). "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 3-33.
- Pyapali, G. K., A. Sik, M. Penttonen, G. Buzsaki and D. A. Turner (1998). "Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro." J Comp Neurol **391**(3): 335-352.

Raison, C. L. and A. H. Miller (2003). "When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders." Am J Psychiatry **160**(9): 1554-1565.

Rajkowska, G. (2000). "Histopathology of the prefrontal cortex in major depression: what does it tell us about dysfunctional monoaminergic circuits?" Prog Brain Res **126**: 397-412.

Ramón y Cajal S (1893). Estructura del asta de ammon y fascia dentata. Ann Soc Esp Hist Nat **22**.

Rapport, M. M., A. A. Green and I. H. Page (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization." J Biol Chem **176**(3): 1243-1251.

Raymond, J. R., Y. V. Mukhin, A. Gelasco, J. Turner, G. Collinsworth, T. W. Gettys, J. S. Grewal and M. N. Garnovskaya (2001). "Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction." Pharmacol Ther **92**(2-3): 179-212.

Razani, H., Z. Diaz-Cabiale, K. Fuxe and S. O. Ogren (2000). "Intraventricular galanin produces a time-dependent modulation of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe of the rat." Neuroreport **11**(18): 3943-3948.

Razani, H., Z. Diaz-Cabiale, I. Misane, F. H. Wang, K. Fuxe and S. O. Ogren (2001). "Prolonged effects of intraventricular galanin on a 5-hydroxytryptamine(1A) receptor mediated function in the rat." Neurosci Lett **299**(1-2): 145-149.

Renner, U., A. Zeug, A. Woehler, M. Niebert, A. Dityatev, G. Dityateva, N. Gorinski, D. Guseva, D. Abdel-Galil, M. Frohlich, F. Doring, E. Wischmeyer, D. W. Richter, E. Neher and E. G. Ponimaskin (2012). "Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking." J Cell Sci **125**(Pt 10): 2486-2499.

Riad, M., S. Garcia, K. C. Watkins, N. Jodoin, E. Doucet, X. Langlois, S. el Mestikawy, M. Hamon and L. Descarries (2000). "Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain." J Comp Neurol **417**(2): 181-194.

Richardson-Jones, J. W., C. P. Craige, B. P. Guiard, A. Stephen, K. L. Metzger, H. F. Kung, A. M. Gardier, A. Dranovsky, D. J. David, S. G. Beck, R. Hen and E. D. Leonardo (2010). "5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants." Neuron **65**(1): 40-52.

Richardson-Jones, J. W., C. P. Craige, T. H. Nguyen, H. F. Kung, A. M. Gardier, A. Dranovsky, D. J. David, B. P. Guiard, S. G. Beck, R. Hen and E. D. Leonardo (2011). "Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety." J Neurosci **31**(16): 6008-6018.

Richter RM y Schuchardt S. (2008) Neuroscience Meeting. Society for Neuroscience. Washington, USA, 2008.

Rickels, K., J. Amsterdam, C. Clary, J. Hassman, J. London, G. Puzzuoli and E. Schweizer (1990). "Buspirone in depressed outpatients: a controlled study." Psychopharmacol Bull **26**(2): 163-167.

Rimon, R., P. Le Greves, F. Nyberg, L. Heikkila, L. Salmela and L. Terenius (1984). "Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients." Biol Psychiatry **19**(4): 509-516.

Robinson, D. S., K. Rickels, J. Feighner, L. F. Fabre, Jr., R. E. Gammans, R. C. Shrotriya, D. R. Alms, J. J. Andary and M. E. Messina (1990). "Clinical effects of the 5-HT_{1A} partial agonists in depression: a composite analysis of buspirone in the treatment of depression." J Clin Psychopharmacol **10**(3 Suppl): 67S-76S.

Rodgers rj (1997) animal model of anxiety :where next? Behav Pharmacol **8**:447- 496.

Rossowski, W. J., T. M. Rossowski, S. Zacharia, A. Ertan and D. H. Coy (1990). "Galanin binding sites in rat gastric and jejunal smooth muscle membrane preparations." Peptides **11**(2): 333-338.

Rotzinger, S., D. A. Lovejoy and L. A. Tan (2010). "Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety." Peptides **31**(4): 736-756.

Roy, A., J. Dejong and T. Ferraro (1991). "CSF GABA in depressed patients and normal controls." Psychol Med **21**(3): 613-618.

Ruhe, H. G., N. S. Mason and A. H. Schene (2007). "Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies." Mol Psychiatry **12**(4): 331-359.

Rustad, J. K., T. A. Stern, K. A. Hebert and D. L. Musselman (2013). "Diagnosis and Treatment of Depression in Patients With Congestive Heart Failure: A Review of the Literature." Prim Care Companion CNS Disord **15**(4).

Sachse, M., S. Urbe, V. Oorschot, G. J. Strous and J. Klumperman (2002). "Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes." Mol Biol Cell **13**(4): 1313-1328.

Sahay, A. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis in depression." Nat Neurosci **10**(9): 1110-1115.

Sanacora, G., G. F. Mason and J. H. Krystal (2000). "Impairment of GABAergic transmission in depression: new insights from neuroimaging studies." Crit Rev Neurobiol **14**(1): 23-45.

Sanacora, G., C. A. Zarate, J. H. Krystal and H. K. Manji (2008). "Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders." Nat Rev Drug Discov **7**(5): 426-437.

Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal

neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* **301**(5634): 805-809.

Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence." *Am J Psychiatry* **122**(5): 509-522.

Schreiber, R. and J. De Vry (1993). "Neuroanatomical basis for the antidepressant-like effects of the 5-HT(1A) receptor agonists 8-OH-DPAT and ipsapirone in the rat forced swimming test." *Behav Pharmacol* **4**(6): 625-636.

Schweitzer, I., V. Tuckwell, D. Ames and J. O'Brien (2001). "Structural neuroimaging studies in late-life depression: a review." *World J Biol Psychiatry* **2**(2): 83-88.

Sebeo, J., K. Hsiao, O. Bozdagi, D. Dumitriu, Y. Ge, Q. Zhou and D. L. Benson (2009). "Requirement for protein synthesis at developing synapses." *J Neurosci* **29**(31): 9778-9793.

Segal, M. and S. Landis (1974). "Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase." *Brain Res* **78**(1): 1-15.

Segurado, R., S. D. Detera-Wadleigh, D. F. Levinson, C. M. Lewis, M. Gill, J. I. Nurnberger, Jr., N. Craddock, J. R. DePaulo, M. Baron, E. S. Gershon, J. Ekholm, S. Cichon, G. Turecki, S. Claes, J. R. Kelsoe, P. R. Schofield, R. F. Badenhop, J. Morissette, H. Coon, D. Blackwood, L. A. McInnes, T. Foroud, H. J. Edenberg, T. Reich, J. P. Rice, A. Goate, M. G. McInnis, F. J. McMahon, J. A. Badner, L. R. Goldin, P. Bennett, V. L. Willour, P. P. Zandi, J. Liu, C. Gilliam, S. H. Joo, W. H. Berrettini, T. Yoshikawa, L. Peltonen, J. Lonqvist, M. M. Nothen, J. Schumacher, C. Windemuth, M. Rietschel, P. Propping, W. Maier, M. Alda, P. Grof, G. A. Rouleau, J. Del-Favero, C. Van Broeckhoven, J. Mendlewicz, R. Adolfsson, M. A. Spence, H. Luebbert, L. J. Adams, J. A. Donald, P. B. Mitchell, N. Barden, E. Shink, W. Byerley, W. Muir, P. M. Visscher, S. Macgregor, H. Gurling, G. Kalsi, A. McQuillin, M. A. Escamilla, V. I. Reus, P. Leon, N. B. Freimer, H. Ewald, T. A. Kruse, O. Mors, U. Radhakrishna, J. L. Blouin, S. E. Antonarakis and N. Akarsu (2003). "Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder." *Am J Hum Genet* **73**(1): 49-62.

Seillier, A. and A. Giuffrida (2011). "Inhibition of fatty acid amide hydrolase modulates anxiety-like behavior in PCP-treated rats." *Pharmacol Biochem Behav* **98**(4): 583-586.

Sergeyev, V., T. Hokfelt and Y. Hurd (1999). "Serotonin and substance P co-exist in dorsal raphe neurons of the human brain." *Neuroreport* **10**(18): 3967-3970.

Sheline, Y. I., M. H. Gado and J. L. Price (1998). "Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression." *Neuroreport* **9**(9): 2023-2028.

Shen, C., H. Li and E. Meller (2002). "Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT1A agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in rat brain regions." *Neuropharmacology* **42**(8): 1031-1038.

Shenker, A., S. Maayani, H. Weinstein and J. P. Green (1983). "Enhanced serotonin-stimulated adenylate cyclase activity in membranes from adult guinea pig hippocampus." *Life Sci* **32**(20): 2335-2342.

Shim, M. S. and Y. J. Kwon (2010). "Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo." *FEBS J* **277**(23): 4814-4827.

Shirayama, Y., A. C. Chen, S. Nakagawa, D. S. Russell and R. S. Duman (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." *J Neurosci* **22**(8): 3251-3261.

Shopsin, B., S. Gershon, M. Goldstein, E. Friedman and S. Wilk (1975). "Use of synthesis inhibitors in defining a role for biogenic amines during imipramine treatment in depressed patients." *Psychopharmacol Commun* **1**(2): 239-249.

Siemiatkowski, M., H. Sienkiewicz-Jarosz, A. I. Czlonkowska, A. Bidzinski and A. Plaznik (2000). "Effects of buspirone, diazepam, and zolpidem on open field behavior, and brain [3H]muscimol binding after buspirone pretreatment." *Pharmacol Biochem Behav* **66**(3): 645-651.

Skofitsch, G. and D. M. Jacobowitz (1985). "Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system." *Peptides* **6**(3): 509-546.

Smith, K. (2011). "Trillion-dollar brain drain." *Nature* **478**(7367): 15.

Smith, K. E., C. Forray, M. W. Walker, K. A. Jones, J. A. Tamm, J. Bard, T. A. Branchek, D. L. Linemeyer and C. Gerald (1997). "Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover." *J Biol Chem* **272**(39): 24612-24616.

Sorkin, A. and M. von Zastrow (2009). "Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 609-622.

Sotelo, C., B. Cholley, S. El Mestikawy, H. Gozlan and M. Hamon (1990). "Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei." *Eur J Neurosci* **2**(12): 1144-1154.

Spinedi, E., R. Hadid and R. C. Gaillard (1997). "Increased vasopressinergic activity as a possible compensatory mechanism for a normal hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in BALB/c nude mice." *Neuroendocrinology* **66**(4): 287-293.

Stahl, S. M., L. Kaiser, J. Roeschen, J. M. Keppel Hesselink and J. Orazem (1998). "Effectiveness of ipsapirone, a 5-HT-1A partial agonist, in major depressive disorder: support for the role of 5-HT-1A receptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressants." *Int J Neuropsychopharmacol* **1**(1): 11-18.

Steinberg, R., R. Alonso, G. Griebel, L. Bert, M. Jung, F. Oury-Donat, M. Poncelet, C. Gueudet, C. Desvignes, G. Le Fur and P. Soubrie (2001). "Selective blockade of neurokinin-2 receptors produces antidepressant-like effects associated with reduced corticotropin-releasing factor function." *J Pharmacol Exp Ther* **299**(2): 449-458.

Steinbusch HWM (1984). Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. *Handbook of chemical neuroanatomy*, Vol. 3, Part II. Elsevier, 68-125.

Stout, S. C., M. J. Owens and C. B. Nemeroff (2001). "Neurokinin(1) receptor antagonists as potential antidepressants." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 877-906.

Sudakov, S. K., G. A. Nazarova, E. V. Alekseeva and V. G. Bashkatova (2013). "Estimation of the level of anxiety in rats: differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and Vogel's conflict test." *Bull Exp Biol Med* **155**(3): 295-297.

Sullivan, P. F., M. C. Neale and K. S. Kendler (2000). "Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis." *Am J Psychiatry* **157**(10): 1552-1562.

Surget, A., M. Saxe, S. Leman, Y. Ibarguen-Vargas, S. Chalon, G. Griebel, R. Hen and C. Belzung (2008). "Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal." *Biol Psychiatry* **64**(4): 293-301.

Surguladze, S. A., W. El-Hage, T. Dalgleish, J. Radua, B. Gohier and M. L. Phillips (2010). "Depression is associated with increased sensitivity to signals of disgust: a functional magnetic resonance imaging study." *J Psychiatr Res* **44**(14): 894-902.

Suzuki, S., U. Yokoyama, T. Abe, H. Kiyonari, N. Yamashita, Y. Kato, R. Kurotani, M. Sato, S. Okumura and Y. Ishikawa (2010). "Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells." *J Biol Chem* **285**(31): 24248-24259.

Svenningsson, P., K. Chergui, I. Rachleff, M. Flajolet, X. Zhang, M. El Yacoubi, J. M. Vaugeois, G. G. Nomikos and P. Greengard (2006). "Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states." *Science* **311**(5757): 77-80.

Swanson LW, Köhler C, Bjorklund A (1987). The limbic region. I. The septohippocampal system. En: *Handbook of chemical neuroanatomy* (Eds. Bjorklund A. Hökfelt T, Swanson LW) pp 125-227. Amsterdam: Elsevier.

Swanson, C. J., T. P. Blackburn, X. Zhang, K. Zheng, Z. Q. Xu, T. Hokfelt, T. D. Wolinsky, M. J. Konkel, H. Chen, H. Zhong, M. W. Walker, D. A. Craig, C. P. Gerald and T. A. Branchek (2005). "Anxiolytic- and antidepressant-like profiles of the galanin-3 receptor (Gal3) antagonists SNAP 37889 and SNAP 398299." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48): 17489-17494.

Tatemoto, K., A. Rokaeus, H. Jornvall, T. J. McDonald and V. Mutt (1983). "Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine." *FEBS Lett* **164**(1): 124-128.

Thakker-Varia, S., J. J. Krol, J. Nettleton, P. M. Bilimoria, D. A. Bangasser, T. J. Shors, I. B. Black and J. Alder (2007). "The neuropeptide VGF produces antidepressant-like behavioral effects and enhances proliferation in the hippocampus." *J Neurosci* **27**(45): 12156-12167.

Tricklebank, M. D., C. Forler and J. R. Fozard (1984). "The involvement of subtypes of the 5-HT₁ receptor and of catecholaminergic systems in the behavioural response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetrilin in the rat." *Eur J Pharmacol* **106**(2): 271-282.

Trifilieff, P., M. L. Rives, E. Urizar, R. A. Piskorowski, H. D. Vishwasrao, J. Castrillon, C. Schmauss, M. Slattman, M. Gullberg and J. A. Javitch (2011). "Detection of antigen

interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum." Biotechniques **51**(2): 111-118.

van der Blik, A. M. (2005). "A sixth sense for Rab5." Nat Cell Biol **7**(6): 548-550.

Vertes, R. P., W. J. Fortin and A. M. Crane (1999). "Projections of the median raphe nucleus in the rat." J Comp Neurol **407**(4): 555-582.

Vogt, B. A., D. M. Finch and C. R. Olson (1992). "Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions." Cereb Cortex **2**(6): 435-443.

Walsh, R. N. and R. A. Cummins (1976). "The Open-Field Test: a critical review." Psychol Bull **83**(3): 482-504.

Walther, C. (2002). "Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins." Endeavour **26**(2): 41-44.

Wang, S., C. He, T. Hashemi and M. Bayne (1997). "Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes." J Biol Chem **272**(51): 31949-31952.

Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2007). "VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4647-4652.

Watanabe, Y., A. Tsujimura, K. Takao, K. Nishi, Y. Ito, Y. Yasuhara, Y. Nakatomi, C. Yokoyama, K. Fukui, T. Miyakawa and M. Tanaka (2011). "Relaxin-3-deficient mice showed slight alteration in anxiety-related behavior." Front Behav Neurosci **5**: 50.

Waters, S. M. and J. E. Krause (2000). "Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues." Neuroscience **95**(1): 265-271.

Weaver, I. C., N. Cervoni, F. A. Champagne, A. C. D'Alessio, S. Sharma, J. R. Seckl, S. Dymov, M. Szyf and M. J. Meaney (2004). "Epigenetic programming by maternal behavior." Nat Neurosci **7**(8): 847-854.

Weiss, J. M., R. W. Bonsall, M. K. Demetrikopoulos, M. S. Emery and C. H. West (1998). "Galanin: a significant role in depression?" Ann N Y Acad Sci **863**: 364-382.

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**(6): 863-877.

Whittemore, S. R. and L. A. White (1993). "Target regulation of neuronal differentiation in a temperature-sensitive cell line derived from medullary raphe." Brain Res **615**(1): 27-40.

Wiczak, W., P. Rekowski, G. Kupryszewski, J. Lubkowski, S. Oldziej and A. Liwo (1996). "Fluorescence and Monte Carlo conformational studies of the (1-15) galanin amide fragment." Biophys Chem **58**(3): 303-312.

Wirz, S. A., C. N. Davis, X. Lu, T. Zal and T. Bartfai (2005). "Homodimerization and internalization of galanin type 1 receptor in living CHO cells." Neuropeptides **39**(6): 535-546.

Wittchen, H. U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon and H. C. Steinhausen (2011). "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." Eur Neuropsychopharmacol **21**(9): 655-679.

Wojciechowski, A. B., U. Englund, C. Lundberg and K. Warfvinge (2002). "Long-term survival and glial differentiation of the brain-derived precursor cell line RN33B after subretinal transplantation to adult normal rats." Stem Cells **20**(2): 163-173.

Wrenn, C. C. and J. N. Crawley (2001). "Pharmacological evidence supporting a role for galanin in cognition and affect." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **25**(1): 283-299.

Wrenn, C. C. and A. Holmes (2006). "The role of galanin in modulating stress-related neural pathways." Drug News Perspect **19**(8): 461-467.

Wynick, D., S. W. Thompson and S. B. McMahon (2001). "The role of galanin as a multi-functional neuropeptide in the nervous system." Curr Opin Pharmacol **1**(1): 73-77.

Xia, S., X. P. Dun, P. S. Hu, S. Kjaer, K. Zheng, Y. Qian, C. Solen, T. Xu, B. Fredholm, T. Hokfelt and Z. Q. Xu (2008). "Postendocytotic traffic of the galanin R1 receptor: a lysosomal signal motif on the cytoplasmic terminus." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(14): 5609-5613.

Xia, S., S. Kjaer, K. Zheng, P. S. Hu, L. Bai, J. Y. Jia, R. Rigler, A. Pramanik, T. Xu, T. Hokfelt and Z. Q. Xu (2004). "Visualization of a functionally enhanced GFP-tagged galanin R2 receptor in PC12 cells: constitutive and ligand-induced internalization." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(42): 15207-15212.

Xia, S., S. Kjaer, K. Zheng, P. S. Hu, T. Xu, T. Hokfelt and Z. Q. Xu (2005). "Constitutive and ligand-induced internalization of EGFP-tagged galanin R2 and R1 receptors in PC12 cells." Neuropeptides **39**(3): 173-178.

Xu, Z. Q., X. Zhang, V. A. Pieribone, S. Grillner and T. Hokfelt (1998). "Galanin-5-hydroxytryptamine interactions: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors." Neuroscience **87**(1): 79-94.

Xu, Z. Q., K. Zheng and T. Hokfelt (2005). "Electrophysiological studies on galanin effects in brain--progress during the last six years." Neuropeptides **39**(3): 269-275.

Yan, Y., Y. L. Wang, Z. Su, Y. Zhang, S. X. Guo, A. J. Liu, C. H. Wang, F. J. Sun and J. Yang (2014). "Effect of oxytocin on the behavioral activity in the behavioral despair depression rat model." Neuropeptides **48**(2): 83-89.

Yates, M., A. Leake, J. M. Candy, A. F. Fairbairn, I. G. McKeith and I. N. Ferrier (1990). "5HT₂ receptor changes in major depression." Biol Psychiatry **27**(5): 489-496.

Yoshitake, T., F. H. Wang, E. Kuteeva, K. Holmberg, M. Yamaguchi, J. N. Crawley, R. Steiner, T. Bartfai, S. O. Ogren, T. Hokfelt and J. Kehr (2004). "Enhanced hippocampal noradrenaline and serotonin release in galanin-overexpressing mice after repeated forced swimming test." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 354-359.

Yoshitake, T., S. Yoshitake, M. Yamaguchi, S. O. Ogren and J. Kehr (2003). "Activation of 5-HT_{1A} autoreceptors enhances the inhibitory effect of galanin on hippocampal 5-HT release in vivo." Neuropharmacology **44**(2): 206-213.

Zarate, C. A., Jr., J. B. Singh, P. J. Carlson, N. E. Brutsche, R. Ameli, D. A. Luckenbaugh, D. S. Charney and H. K. Manji (2006). "A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression." Arch Gen Psychiatry **63**(8): 856-864.

Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-117.

Zhang, J., X. Y. Huang, M. L. Ye, C. X. Luo, H. Y. Wu, Y. Hu, Q. G. Zhou, D. L. Wu, L. J. Zhu and D. Y. Zhu (2010). "Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors." J Neurosci **30**(7): 2433-2441.

Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." Cell **132**(4): 645-660.

Zhu, M. Y., V. Klimek, G. E. Dilley, J. W. Haycock, C. Stockmeier, J. C. Overholser, H. Y. Meltzer and G. A. Ordway (1999). "Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression." Biol Psychiatry **46**(9): 1275-1286.

Zoli, M., L. F. Agnati, P. B. Hedlund, X. M. Li, S. Ferre and K. Fuxe (1993). "Receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in nerve cells." Mol Neurobiol **7**(3-4): 293-334.

Zorner, B., D. P. Wolfer, D. Brandis, O. Kretz, C. Zacher, R. Madani, I. Grunwald, H. P. Lipp, R. Klein, F. A. Henn and P. Gass (2003). "Forebrain-specific trkB-receptor knockout mice: behaviorally more hyperactive than "depressive"." Biol Psychiatry **54**(10): 972-982.