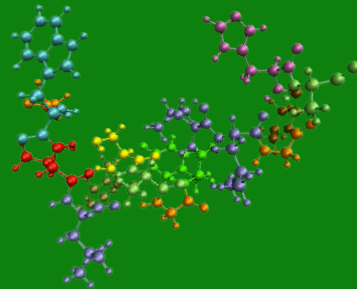




Universidad de Málaga  
Facultad de Psicología y Logopedia  
Programa de doctorado de Psicología

## TESIS DOCTORAL

### Antonio Flores Burgess



**Papel del fragmento N-terminal (1-15)  
de la Galanina en depresión:  
Interacciones con la Fluoxetina**

Directores:  
Prof. Dra. Dña. Zaida Díaz Cabiale  
Prof. Dr. D. Luis Javier Santín Núñez



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Universidad de Málaga, Facultad de Psicología y Logopedia  
Programa de Doctorado de Psicología



## TESIS DOCTORAL

### **Papel del fragmento N-terminal (1-15) de la Galanina en depresión: Interacciones con la Fluoxetina**

Role of the N-terminal fragment (1-15) of Galanin in depression:  
Interactions with Fluoxetine

Directores:

Prof. Dra. Dña. Zaida Díaz Cabiale

Prof. Dr. D. Luis Javier Santín Núñez

Memoria presentada por D. Antonio Flores Burgess para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Málaga.


Málaga, Marzo 2019.





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Antonio Flores Burgess

 <http://orcid.org/0000-0001-9155-5674>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



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

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

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

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

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





Dña. ZAIDA DÍAZ CABIALE, Doctora en Fisiología y Catedrática del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva de la Universidad de Málaga y D. LUIS JAVIER SANTÍN NÚÑEZ Doctor en Psicología y Catedrático del Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que **D. ANTONIO FLORES BURGESS** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo recogido en la presente Memoria titulada "Papel del fragmento N-terminal (1-15) de la Galanina en depresión: Interacciones con la Fluoxetina " para la obtención del Título de Doctor por la Universidad de Málaga. Revisado el trabajo, consideramos que la presente memoria reúne todo el rigor científico y los requisitos necesarios para ser sometida a juicio de la Comisión correspondiente.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Málaga a 1 de Marzo de 2019.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Fdo. Dña. Zaida Díaz Cabiale

Fdo. D. Luis Javier Santín Núñez



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## *Agradecimientos*

Quisiera dedicar estas líneas para la difícil tarea de resumir la gratitud que siento hacia todas aquellas personas que de alguna forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo.

A Zaida Díaz Cabiale mi más sincero agradecimiento y respeto. Solo ella me dio la oportunidad de empezar este camino incierto en un momento de cambio radical en mi vida. Tu inteligencia, sentido común y amor por la ciencia son las que me han hecho llegar hasta aquí, creciendo personal y profesionalmente. A Luis Santín quiero agradecerle su dedicación, la pasión por su trabajo y el tener siempre las puertas abiertas a colaborar. Entre los dos habéis hecho posible algo que no estaba previsto, esta tesis es tan vuestra como mía. Sois un ejemplo de profesionalidad y ética que espero copiar en el futuro y espero también poder seguir trabajando y aprendiendo tanto de vosotros en las próximas etapas como en esta que ahora acaba, y por supuesto celebrar lo que haga falta.

Quiero agradecer también a Mario van der Stelt la oportunidad de poder realizar una estancia predoctoral en el Instituto de Química de Leiden. Fueron tres meses de aventura constante donde me hicieron sentir como en casa y aprendí muchísimo.

Esta tesis se ha gestado entre dos departamentos y quiero, por lo menos mencionar, a todos con los que he compartido los momentos vividos durante estos años y que recordaré siempre con cariño.

Empiezo con Fisiología Humana y por Carmelo Millón, son muchas las horas, ideas, cánticos y risas, y espero que sean muchas más, muchas gracias por todo. Especial mención a José Ángel Narváez y a Manuel Narváez con los que también empecé esta aventura hace ya unos pocos de años, y a Belén Gago. Y por supuesto a todo el resto del departamento a D. Salvador, María, Estrella, Pablo Lara, Marc Stefan, Álvaro Milán,

Miguel Ángel Barbancho, Manuel Víctor, Amelia a todo el área de Fisiología del Deporte y a las nuevas incorporaciones Noelia y Laura.

Quiero hacer una mención aparte a José Ángel Aguirre, siempre lo recordaré con una sonrisa, me hubiera gustado que viera este tesis terminada.

También quiero agradecer a las profesoras del departamento de Psicobiología toda la ayuda recibida durante la gestación de esta tesis. Especialmente a Mercedes, María y Araceli por su inestimable ayuda a la hora de impartir docencia y los buenos momentos de ocio. También a David, Román, Emma, Estela, Andrea y Sara con las que he compartido largas horas en el estabulario y momentos muy divertidos en los congresos.

No quiero olvidarme de toda la gente de los servicios del scai y el estabulario, sin su calidad humana y profesional las horas hubieran sido mucho más largas y el trabajo experimental hubiera sido imposible.

Y de forma más personal quiero agradecer a todos mis amigos el apoyo que me han dado en los momentos de incertidumbre, que como buena tesis no han sido pocos, son demasiados para nombrarlos. Y por último lo mejor. A mi familia. Lo sois todo. A mi madre y a mi padre, a mi hermana y a Edu y a los dos nuevos fichajes que se han incorporado en el transcurso de esta tesis, Nicolás y Guillermo dos auténticos gigantes que no llegan al metro. Y a Mari Paz, mi compañera, que se ha apuntado a este viaje aunque a veces me de por atropellar garzas. Os quiero.



*A mi madre, a mi familia, a Mari Paz.*

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



*¿Es toda una experiencia vivir con miedo verdad?,  
eso es lo que significa ser esclavo.*

Blade Runner, 1982.

*Así es como lo conseguí, jamás me reservé nada para la vuelta.*

Gattaca, 1997.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos, un capítulo de libro y han originado la concesión de una patente internacional:**

- Artículo: "**Galanin(1-15) enhancement of the behavioral effects of Fluoxetine in the forced swimming test gives a new therapeutic strategy against depression**"; Autores: **Antonio Flores-Burgess**; Carmelo Millón; Belén Gago; Manuel Narváez; Dasiel O. Borroto-Escuela; Guadalupe Mengod; José Ángel Narváez; Kjell Fuxe; Luis Santín; Zaida Díaz-Cabiale. *Neuropharmacology*. 2017 May 15;118:233-241.
- Artículo: "**The neuropeptides Galanin and Galanin(1-15) in depression-like behaviours**" Autores: Carmelo Millón; **Antonio Flores-Burgess**; Manuel Narváez; Dasiel O. Borroto-Escuela; Belén Gago; Luis Santín; Estela Castillo-Ortega; José Ángel Narváez; Kjell Fuxe; Zaida Díaz-Cabiale. *Neuropeptides* 2017 Aug;64:39-45.
- Artículo: "**A role for galanin N-terminal fragment (1-15) in anxiety- and depression-related behaviors in rats**". Autores: Carmelo Millón; **Antonio Flores-Burgess**; Manuel Narváez; Dasiel O. Borroto-Escuela; Luis Santín; Concepción Parrado; José Ángel Narváez; Kjell Fuxe; Zaida Díaz-Cabiale. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2014 Oct 31;18(3).
- Capítulo de libro: "**Small Interference RNA Knockdown Rats in Behavioral Functions: GALR1/GALR2 Heteroreceptor in Anxiety and Depression-Like Behavior**". Autores: **Antonio Flores-Burgess**; Carmelo Millón; Belén Gago Calderón; José Ángel Narváez Bueno; Kjell Fuxe; Zaida Díaz Cabiale. *Neuromethods*, 2018. "Receptor-Receptor Interactions in the Central Nervous System" (pp133-148). Springer, Berlin, Germany.

- Patente Internacional: "**Composición farmacéutica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y Galanina(1-15)**". Inventores: **Antonio Flores Burgess**; Carmelo Millón Peñuela; Belén Gago Calderón; Manuel Alejandro Narváez Peláez; José Ángel Narváez Bueno; Luis Javier Santín Núñez; María Zaida Díaz Cabiale.

Nº Solicitud: P201730214; nº Publicación: ES2659092.

Fecha de concesión: 22/06/2018

Nº de publicación internacional: WO 2018/150073 A1.

Fecha de publicación: 23/08/2018

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

Programa de ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores: BES-2014-068426. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Proyectos financiados por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad:

Titulo de Proyecto: Interacción antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina-galanina(1-15): mecanismos fisiopatológicos de la depresión (**SAF2016-79008-P**). Investigadora principal: Zaida Díaz Cabiale. Fecha inicio y fin: 30/12/2016-30/12/2020. Cuantía: 121.000 €.

Titulo de proyecto: Mejora neurogénica mediante entrenamiento neurocognitivo como estrategia para favorecer la extinción y reducir la reinstauración de las asociaciones contexto-cocaína (**PSI2017-82604-R**). Investigador principal: Luis Javier Santín Núñez. Fecha inicio y fin: 01/01/2018-31/12/2020. Cuantía: 125.840 €.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## *Abreviaturas*

- 5-HT1AR:** Receptor 5-HT1A
- 5-HTT:** Transportador de serotonina.
- 8-OH-DPAT:** 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina.
- ACTH:** Hormona adrenocorticotropa.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- AMPA:** ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.
- ANOVA:** Análisis de la varianza de una vía.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ATV:** Área tegmental ventral.
- BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro.
- BLAST:** "Basic Local Alignment Search Tool".
- Bmax:** Número de sitios de unión.
- CA:** Cuerno de Amón.
- cDNA:** ADN complementario
- CHARMM:** "Chemistry at HARvard Molecular Mechanics".
- CIE-10:** Décima edición de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud.
- CP:** Caudado-Putamen.
- CPF:** Corteza Prefrontal.
- CRH:** Hormona liberadora de corticotropina.
- Ct:** Ciclo umbral.
- CTX:** Regiones corticales.
- DAB:** 3-3'Diaminobenzidina.
- DM:** Medio de cultivo Acell siRNA Delivery Media.
- DMS-V:** Quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de trastornos mentales.
- DOPE:** Energía discreta optimizada de la proteína.
- DRT:** Depresión resistente al tratamiento.
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.
- EC:** Corteza entorrinal.
- EL:** Bucles extracelulares.
- FDA:** "American Food and Drug Adminsitration".



**FLX:** Fluoxetina.

**FST:** Test de natación forzada.

**GABA:** Ácido gamma-aminobutírico.

**GAL:** Galanina.

**GAL(1-15):** fragmento N-terminal de la Galanina.

**GALP:** Péptido similar a Galanina.

**GALR1:** Receptor Galaninérgico tipo I.

**GALR2:** Receptor Galaninérgico tipo II.

**GALR3:** Receptor Galaninérgico tipo III.

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

**gcl:** Capa granular.

**GD:** Giro dentado.

**GIRK:** Canales rectificadores de potasio acoplados a proteína G.

**Glu:** Glutamina.

**GMAP:** Péptido mensajero asociado a Galanina.

**GPCR:** Superfamilia de receptores acoplados a proteína G.

**h:** Horas.

**HHA:** Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

**His:** Histidina.

**HP:** Hipocampo.

**i.c.v.:** Intracerebroventricular.

**IL:** Interleucinas.

**Ile:** Isoleucina.

**IMAOs:** Inhibidores de las monooxigenasas.

**INF:** Interferón.

**IRSN:** Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina-noradrenalina.

**ISRS:** Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

**Kd:** Constante de disociación.

**LC:** Locus Coeruleus.

**LCRa:** Líquido cefalorraquídeo artificial.

**i.p.:** Intraperitoneal.

**MAP:** Mitogen-Activated Protein.

**ml:** Capa molecular.

**min:** Minutos.



**NA:** Noradrenalina.

**NAc:** Núcleo acumbens.

**NMDA:** N-metil-D-aspartato.

**NPY:** Neuropeptido Y.

**NTS:** Núcleo del tracto solitario.

**OB:** Bulbo olfatorio.

**OF:** Test del campo abierto.

**PAF:** Paraformaldehído.

**PB:** Tampón fosfato.

**PBS:** Tampón fosfato salino.

**PCPA:** p-clorofenilalanina.

**PDB:** "Protein data bank".

**Phe:** Fenilalanina.

**PLA:** Ensayo de ligamiento por proximidad.

**pl:** Capa polimórfica.

**pyl:** Capa de células piramidales.

**qPCR-rt:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

**RISC:** Complejo silenciador inducido por ARN.

**RD:** Núcleo rafe dorsal.

**RMSD:** Desviación cuadrática media de la raíz.

**s:** Segundos.

**s.c.:** Subcutánea.

**SDM:** Simulaciones dinámicas moleculares.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**sl:** Estrato lucidum.

**slm:** Estrato lacunosum-molecular.

**siGalR1:** Modelo de ratas knockdown GALR1.

**siGalR2:** Modelo de ratas knockdown GALR1.

**siRNA-GALR1:** reactivo comercial Acell siRNA para GALR1.

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNPs:** Polimorfismos de un solo nucleótido.

**so:** Estrato oriens.

**sr:** Estrato radiatum.

**Sub:** Subiculum.



**TDM:** Trastorno depresivo mayor.

**TM:** Dominio transmembrana.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.

**Tyr:** Tirosina.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**Veh.:** Vehículo.

## INTRODUCCIÓN

<b>1- El Trastorno Depresivo Mayor</b> .....	3
<b>2- Etiología del TDM</b> .....	6
<b>3- Patofisiología del TDM</b> .....	7
3.1- Alteraciones en sistemas monoaminérgicos.....	8
3.2- Alteraciones en el eje HHA.....	10
3.3- Alteraciones Neuroinmunes.....	12
3.4- Alteraciones Neurogénicas y de Neuroplasticidad.....	14
<b>4- Farmacoterapia</b> .....	15
<b>5- Sistema Serotoninérgico</b> .....	19
5.1- Receptores Serotoninérgicos en el TDM.....	22
5.2- FLX, 5-HTT y 5-HT1A.....	26
<b>6- Galanina</b> .....	32
6.1- Galanina en la regulación de la ansiedad y el TDM.....	34
6.2- GAL(1-15).....	38
6.3- GAL(1-15) en la regulación de la ansiedad y el TDM.....	40
<b>7- Modelización de Receptores</b> .....	43
<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	55
<b><u>Diseño y grupos experimentales</u></b>	
<b>1- Papel del fragmento GAL(1-15) en ansiedad y depresión. Desarrollo de modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2</b> .....	57
1.1- Estudio de los efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) en pruebas conductuales de ansiedad y depresión.....	57
1.2- Desarrollo de modelos de homología de GALR1 y GALR2.....	59
<b>2- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores GALR1 y GALR2</b> .....	62
2.1- Estudiar la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST y determinar si esta interacción es exclusiva del fragmento o se da también con la GAL.....	62

2.2- Evaluar el papel de los receptores GALR2 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico M871 y un modelo de silenciamiento génico para GALR2 (siGalR2).....	65
2.3- Evaluar el papel de los receptores GALR1 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando un modelo de silenciamiento génico para GALR1 (siGalR1).....	67
<b>3- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel del receptor serotoninérgico 5-HT1A.....</b>	<b>71</b>
3.1- Evaluar el papel del 5-HT1AR en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico Way100635.....	71
3.2- Estudiar el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y FLX sobre las características funcionales y la expresión del ARNm del 5-HT1AR en el RD y el hipocampo dorsal mediante autorradiografía e <i>hibridación in situ</i> .....	72

### **Metodología General**

<b>4- Animales de experimentación.....</b>	<b>74</b>
<b>5- Cirugía estereotáxica.....</b>	<b>74</b>
<b>6- Administración de sustancias.....</b>	<b>77</b>
<b>7- Test de Comportamiento Animal.....</b>	<b>78</b>
7.1- Condiciones de la sala y manipulación de animales.....	78
7.2- Test de Suspensión de la Cola.....	79
7.3- Test de Luz/Oscuridad.....	80
7.4- Test de Natación Forzada.....	81
<b>8- Procedimientos con Tejido Cerebral.....</b>	<b>83</b>
8.1- Procesamiento de tejido cerebral.....	83
8.1.1- Perfusión intracardiaca.....	83
8.1.2- Procesamiento de tejido cerebral perfundido.....	84
8.1.3- Eutanasia por decapitación.....	85
8.1.4- Procesamiento de tejido cerebral congelado.....	86
8.2- Protocolo de Hibridación <i>In Situ</i> .....	87
8.3- Protocolo de Autorradiografía: curva de saturación.....	88
8.4- Análisis de films.....	90

<b>9- Desarrollo de ratas siGalR1</b> .....	90
9.1- qPCR-rt.....	92
9.2- Protocolo de Inmunohistoquímica.....	95
<b>10- Análisis estadísticos</b> .....	97
<b>RESULTADOS</b> .....	99
<b>1- Papel del fragmento GAL(1-15) en ansiedad y depresión. Desarrollo de modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2</b> .....	101
1.1- Efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) en las pruebas conductuales de ansiedad y depresión.....	101
1.2- Desarrollo de los modelos de homología de GALR1 y GALR2.....	101
<b>2- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores GALR1 y GALR2</b> .....	110
2.1- Estudio de la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST y comparación de la interacción GAL(1-15)-FLX con GAL-FLX.....	110
2.2- Evaluación del papel de los receptores GALR2 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico M871 y un modelo de silenciamiento génico siGalR2.....	116
2.3- Evaluación del papel de los receptores GALR1 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando un modelo de silenciamiento génico siGalR1.....	120
<b>3- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT1A</b> .....	125
3.1- Evaluación del papel del 5-HT1AR en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico Way100635.....	125
3.2- Estudio del efecto de la coadministración de GAL(1-15) y FLX sobre las características funcionales y la expresión del ARNm del 5-HT1AR en el RD y el hipocampo dorsal.....	127
<b>DISCUSIÓN</b> .....	131
<b>CONCLUSIONES</b> .....	165

<b>SUMMARY</b> .....	169
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	191
<b>ANEXO: Publicaciones y patente</b> .....	211



# INTRODUCCIÓN





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## 1- El Trastorno Depresivo Mayor

Los desordenes depresivos se engloban dentro de un conjunto de enfermedades denominadas trastornos del estado de ánimo. Los criterios diagnósticos más empleados en la práctica clínica para detectar dichos trastornos se encuentran recogidos hasta la fecha en la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de trastornos mentales (DSM-V) de la Asociación Estadounidense de Psiquiatría y en la décima edición de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10) desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (DSM-V, 2013; CIE-10, 1992).

El trastorno depresivo mayor (TDM) es un término descrito en el DSM-V que representa la condición clásica de la depresión dentro del grupo de desordenes depresivos. Se caracteriza por al menos un episodio de dos semanas de duración como mínimo donde se identifican 5 o más de los siguientes síntomas: Estado de ánimo depresivo, marcada pérdida de interés o placer en las actividades diarias (anhedonia), considerable pérdida o ganancia de peso y/o apetito, insomnio o hipersomnia, fatiga o pérdida de energía y de la actividad locomotora, sentimientos de inutilidad y culpa recurrentes, incapacidad de pensar e indecisión, pensamientos recurrentes sobre la muerte e ideación suicida con o sin plan de actuación. Estos episodios se catalogan en función de la cantidad e intensidad de los síntomas como leves, moderados o severos (DSM-V, 2013).

Además del diagnóstico y evaluación de la intensidad y duración de los episodios depresivos, en el DSM-V también se definen una serie de especificadores que completan el diagnóstico del TDM. Es interesante destacar el especificador de la angustia ansiosa que se diagnostica por la presencia de los siguientes síntomas: sentirse nervioso, inusualmente inquieto, tener dificultad para concentrarse debido a la preocupación, temor de que algo horrible pueda suceder, temor a perder el control de sí mismo (DSM-V, 2013).

La angustia ansiosa en el TDM se ha asociado con un mayor riesgo de suicidio, una mayor duración de la enfermedad y una mayor probabilidad de falta de respuesta al

tratamiento. Como resultado, es clínicamente útil especificar con precisión la presencia y los niveles de gravedad de la angustia ansiosa para la planificación y el seguimiento de la respuesta al tratamiento (DSM-V, 2013).

De forma similar, en el CIE-10 la terminología distingue entre episodios depresivos únicos y episodios depresivos recurrentes. Los episodios depresivos únicos también se clasifican como leves, moderados y severos con una duración mínima de dos semanas de duración en los síntomas para el diagnóstico. La distinción en el grado de los episodios únicos recae en el juicio clínico e implica una combinación del número, tipo y severidad de los síntomas de los que el estado de ánimo depresivo, incremento de fatiga y pérdida de interés o placer son necesarios. En el caso de los episodios graves tienen que estar presentes además los síntomas de pensamientos recurrentes negativos, alucinaciones y afectación locomotora. Independientemente de la intensidad de los episodios, la repetición o persistencia de los síntomas es la condición para el diagnóstico de episodios depresivos recurrentes (CIE-10, 1992).

En la literatura empleada para la elaboración de la presente tesis el término más empleado para referirse al concepto clásico de depresión es el de TDM, que usaremos de ahora en adelante por motivos expositivos y de claridad. No obstante, y debido a la complejidad inherente a los trastornos del estado de ánimo, hay que señalar que la clasificación de dichos trastornos se encuentra en constante revisión debido a los avances en el conocimiento derivados de los estudios clínicos e investigaciones en neurociencia (Kupfer, 2014).

Según los últimos informes de la OMS, El TDM afecta al 4,4% de la población mundial con más de 300 millones de personas afectadas. Además entre 2005 y 2015 se registró un incremento de la prevalencia del 18%, observándose cerca del doble de casos en mujeres que en hombres. Los porcentajes de incidencia en Europa son algo mayores que la media mundial, en España hay cerca de 2,5 millones de personas diagnosticada un 5,2% de la población (WHO, 2017). Se estima además que la mitad de los suicidios a nivel mundial ocurren durante un periodo depresivo. En la actualidad, el TDM es la segunda enfermedad crónica a nivel mundial medida como

años de discapacidad y está asociado con un incremento en el riesgo de enfermedades cardíacas y diabetes mellitus (Collaborators et al., 2015; Whooley and Wong, 2013). Algunas previsiones indican que para 2030 se convertirá en la principal causa de incapacidad del mundo, adelantando a las infecciones respiratorias bajas y enfermedades diarreicas (Mathers et al., 2008). Actualmente el TDM supone un coste medio por paciente de entre 2500 a 3400 euros en España, incluyendo gastos sanitarios y no sanitarios (Sicras-Mainar et al., 2013). A nivel europeo se estima que el gasto alcanza en torno a los 113 mil millones de euros al año (Smith, 2011).

La observación de patologías cerebrales relacionadas conlleva una dificultad mayor que en otros órganos. Muchas técnicas disponibles para detectar alteraciones cerebrales en humanos dependen de estudios post-mortem o técnicas de neuroimagen basadas en detectar marcadores indirectos para medir la actividad neuronal (Krishnan and Nestler, 2008). Sin embargo, gran parte del conocimiento obtenido en las últimas décadas proviene de investigaciones realizadas en el terreno de la neurociencia con modelos animales que se han utilizado para explorar la patología subyacente y los mecanismos moleculares de trastornos del estado de ánimo como el TDM (McGonigle, 2014).

El uso de modelos animales, no obstante, presenta numerosas limitaciones considerando la complejidad del TDM y su conjunto de síntomas. El criterio clave para evaluar la utilidad de un modelo animal es su validez, tanto a nivel de sintomatología como de patofisiología subyacente, así como su capacidad predictiva en el uso de agentes terapéuticos efectivos (McGonigle, 2014). Una dificultad muy evidente consiste en la traslación de la sintomatología del TDM entre humanos y animales, como por ejemplo los sentimientos de culpa o la ideación suicida, aunque existen comportamientos animales que se pueden asociar con estados depresivos (Deussing, 2006).

No obstante, se han desarrollado varios paradigmas conductuales para poder evaluar fenotipos de depresión en roedores y ensayar la efectividad de los tratamientos antidepresivos. Por ejemplo, en el test de natación forzada (FST) (Porsolt et al.,

1977), que más tarde detallaremos, los animales se colocan en un cilindro con agua y se ven obligados a nadar hasta adoptar una postura flotante e inmóvil, este comportamiento se considera un índice de desesperanza conductual relacionado con un estado depresivo. Con este test, además, podemos distinguir el mecanismo de acción de los antidepresivos probados en roedores analizando los comportamientos activos de natación y escalada. Así, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), de los que más tarde hablaremos, incrementan la natación y disminuyen la inmovilidad, mientras que inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina y dopamina disminuyen la inmovilidad y aumentan la escalada (Estrada-Camarena et al., 2003).

## **2- Etiología del TDM**

El TDM es uno de los trastornos mentales más comunes y debilitantes y sin embargo su etiología no está clara. Entre los causantes de su aparición surgen múltiples factores como posibles desencadenantes de la enfermedad. Factores sociales, psicológicos, genéticos y factores biológicos durante el desarrollo y en posteriores etapas de la vida pueden afectar en mayor o menor medida a la aparición de algún episodio de TDM (Hoffmann et al., 2017).

Estimaciones basadas en estudios con familias y entre gemelos indican que el TDM presenta una heredabilidad del 35%, con una prevalencia mayor en mujeres (40%) que en hombres (30%). Estos estudios no muestran evidencias de que la agregación familiar tenga una repercusión significativa en los resultados. Sin embargo, los estudios de asociación genómica a gran escala basados en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no han dado buenos resultados a la hora de encontrar genes con una correlación clara con la enfermedad. Esta aparente contradicción se puede solventar con dos posibles explicaciones: una es que el TDM es en realidad diferentes enfermedades que se manifiestan con síntomas similares. Y la otra es que diferentes factores desencadenan el TDM de diferentes maneras, de acuerdo a la susceptibilidad genética del individuo (Flint and Kendler, 2014).

Los factores ambientales también tienen un peso muy importante en la aparición del TDM. Abusos sexuales, físicos o emocionales en la infancia constituyen un gran factor de riesgo a la hora de desarrollar un TDM (Li et al., 2015). En estudios con animales se ha visto que la deprivación materna origina a largo plazo alteraciones del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) que están a su vez relacionadas con síntomas característicos del TDM como la degeneración hipocampal y déficits en el aprendizaje y la memoria (Meaney, 2001).

También hay que considerar la gran comorbilidad existente entre el abuso de sustancias de abuso como el alcohol y el TDM. En personas con TDM, la prevalencia durante toda la vida del abuso de alcohol alcanza el 40% (Lai et al., 2015), aunque no está claro si esta comorbilidad se debe a una relación causal entre TDM y el abuso de sustancias o viceversa. Algunos estudios que indican que la repetición en el uso de drogas de abuso pueden alterar la expresión de genes que a largo plazo incrementan el riesgo de padecer un TDM (Robinson and Riggs, 2016). El TDM también presenta una elevada comorbilidad con otro tipo de trastornos del estado de ánimo como los trastornos de pánico, los trastornos obsesivo compulsivo, anorexia nerviosa y bulimia nerviosa (DMS-V, 2013).

Parece claro que la compleja interacción entre genes y entorno constituye una de las claves en la aparición del TDM. El desarrollo del cerebro está guiado por la interacción entre las instrucciones genéticas y el entorno. Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, pueden mediar en adaptaciones a largo plazo que incrementan el riesgo de padecer un TDM (Hoffmann et al., 2017). Los estudios epigenéticos nos dan nuevas perspectivas sobre la patogénesis del TDM que no pueden ser explicados por una herencia clásica (Chen et al., 2017).

### **3- Patofisiología del TDM**

A pesar de la ingente cantidad de investigaciones realizadas en las últimas décadas no se ha podido dilucidar aún cuáles son los mecanismos fisiopatológicos implicados en el TDM. La principal hipótesis señala que alteraciones en los sistemas de

transmisión monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina y dopamina) constituyen los cambios fisiopatológicos más importantes relacionados con la aparición del TDM. Aunque un gran número de investigaciones han mostrado que las alteraciones subyacentes de este trastorno afectan a numerosos sistemas. Por ejemplo, anomalías en el funcionamiento del eje HHA, factores inflamatorios incrementados, descenso en la neuroplasticidad y la neurogénesis, y el papel de otros neurotransmisores (Glutamato, GABA) y neuropéptidos. Todas estas alteraciones pueden, además, estar relacionadas e interactuar bidireccionalmente (Dean and Keshavan, 2017).

### 3.1- Alteraciones en sistemas monoaminérgicos

La hipótesis más antigua sobre la patofisiología de la TDM postula que el descenso en los niveles de las monoaminas (Serotonina, Noradrenalina y Dopamina) subyace como la principal causa de la enfermedad (Krishnan and Nestler, 2008). Esta hipótesis está ampliamente validada desde una perspectiva farmacológica. Los primeros antidepresivos descubiertos en la década de los 50-60 del siglo pasado actuaban de alguna manera u otra sobre los sistemas monoaminérgicos. Desde entonces, las siguientes generaciones de antidepresivos desarrollados como los inhibidores de las monooxigenasas (IMAOs), los antidepresivos tricíclicos y por último los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o serotonina-noradrenalina (ISRS o IRSN), desarrollados en los años 80, tienen mecanismos de acción que implican actuar sobre elementos de los sistemas monoaminérgicos, elevando los niveles de las monoaminas en las sinapsis en un primer momento (Wong and Licinio, 2004).

Además de las evidencias farmacológicas, las alteraciones en el sistema serotoninérgico relacionadas con las enfermedades mentales se han descrito desde los años 50 del siglo pasado. Estudios clínicos han mostrado como en pacientes en remisión del TDM, tras ser administrados con inhibidores irreversibles de la síntesis de serotonina como el PCPA (Shopsin et al., 1976) o por privación de triptófano (Delgado et al., 1990), precursor de la serotonina, sufrían una recaída transitoria en sus síntomas. Además, cerca del 90% de los antidepresivos más efectivos del mercado tienen como diana farmacológica el transportador de serotonina (5-HTT) y

actúan elevando primero los niveles de serotonina en el cerebro y modificando a largo plazo la funcionalidad de los receptores serotoninérgicos como veremos detalladamente más adelante (Artigas, 2013; Dean and Keshavan, 2017).

Varios polimorfismo genéticos que afectan a algún elemento del sistema serotoninérgico se asocian con el origen del TDM o con la resistencia a antidepresivos. Por ejemplo, en el promotor del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> y del 5-HTT, ambos elementos clave en el mecanismo de acción de los antidepresivos. También se han encontrado alteraciones en los niveles de ARN mensajero del receptor 5-HT<sub>2C</sub> en víctimas de suicidio (Artigas, 2013; Dean and Keshavan, 2017).

En posteriores apartados de esta tesis describiremos más ampliamente muchas de las investigaciones realizadas en animales sobre las alteraciones del sistema serotoninérgico en el TDM ya que es el sistemas de estudio objeto de la presente tesis.

Además de la serotonina, pacientes con TDM también muestran alteraciones en el sistema noradrenérgico. Por ejemplo, se han observado incrementos en los niveles de la enzima de síntesis de la noradrenalina, la tiroxina hidroxilasa, en el Locus Coeruleus (LC). Otras alteraciones descritas en pacientes incluyen alteraciones en los receptores noradrenérgicos tanto en el LC como en la corteza prefrontal (Maletic et al., 2017). Por otra parte, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), implicada como veremos más adelante en las alteraciones del eje HHA, tiene un papel fundamental a la hora de regular el sistema noradrenérgico en el Sistema Nervioso Central (SNC). En ratas, se ha visto que la administración de CRH en el LC estimula a la enzima tiroxina hidroxilasa (Leonard, 2001).

Algunos de los síntomas del TDM como la falta de motivación o la anhedonia sugieren una papel de la dopamina en la patofisiología de la enfermedad (Porcelli et al., 2011). Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV) que inervan al núcleo accumbens constituyen la principal vía relacionada con el circuito de recompensa. En modelos animales de depresión se ha visto como algunos

tratamientos con antidepresivos pueden alterar la actividad de las neuronas del ATV. Esto indica además una posible interconexión entre el sistema serotoninérgico y el dopaminérgico dado que las neuronas dopaminérgicas del ATV expresan receptores serotoninérgicos (Nestler and Carlezzone, 2006).

Además de las alteraciones indicadas, parece claro que los sistemas monoaminérgicos juegan un papel importante en la recuperación del TDM. Los mecanismos de acción de los principales antidepresivos usados en la clínica, de los que hablaremos posteriormente, actúan sobre estos sistemas monoaminérgicos, especialmente la serotonina, elevando los niveles de este neurotransmisor en el espacio sináptico. No obstante, dicha elevación se obtiene solo horas después del tratamiento y muchos antidepresivos necesitan de periodos de acción de semanas para tener efectos clínicos. Por tanto, otros cambios pueden estar detrás de los efectos antidepresivos (Wong and Licinio, 2004).

Aunque se han realizado miles de investigaciones centradas en las alteraciones de los sistemas monoaminérgicos para poder entender la patogenia del TDM, la complejidad de la enfermedad requiere ampliar el foco a otros sistemas neuroquímicos que muestran alteraciones asociadas con la enfermedad (Wong and Licinio, 2004). Aunque como veremos, muchos de estos sistemas se encuentran interconectados con los sistemas monoaminérgicos de algún modo.

### **3.2- Alteraciones en el eje HHA**

Además de en los sistemas monoaminérgicos, se conoce desde hace tiempo que pacientes con TDM presentan alteraciones en el eje HHA. En los años 60 del siglo pasado se descubrió que un elevado porcentaje de pacientes diagnosticados con TDM mostraban una hipersecreción de cortisol y sucesivos estudios clínicos confirmaron que varias hormonas integrantes del eje HHA también se encontraban en niveles alterados en esta enfermedad (Parker et al., 2003).

El eje HHA es un sistema central en la regulación de la homeostasis y la respuesta al estrés y participan varias hormonas y péptidos en su regulación. El núcleo



paraventricular del hipotálamo sintetiza y secreta los péptidos vasopresina y la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Ambos estimulan a la pituitaria para que secrete la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y a su vez, la ACTH actúa sobre la glándula adrenal productora de glucocorticoides, como el cortisol (corticosterona en roedores). Los glucocorticoides inhiben la producción de CRH y ACTH cerrando un circuito de retroalimentación negativa (de Kloet et al., 2005).

La respuesta fisiológica al estrés implica la activación del sistema nervioso simpático y el eje HHA para preparar al organismo a una respuesta adecuada, estimulando cambios metabólicos y neuronales. La activación de estos sistemas implica cambios homeostáticos que son contrabalanceados para evitar posibles daños en la respuesta al estrés a corto plazo. No obstante, la exposición a un estrés prolongado puede derivar en cambios comportamentales y fisiológicos adversos (Weger and Sandi, 2018).

Son numerosos los trabajos en diferentes modelos humanos y animales, incluidos los primates, que indican como factor de riesgo para desarrollar patologías como trastornos de ansiedad y depresivos una hiperreactividad al estrés (Weger and Sandi, 2018).

Alteraciones del sistema HHA se han correlacionado con víctimas de suicidio que sufrieron abusos en la infancia. Por ejemplo, se ha observado un descenso de la expresión en el receptor hipocámpal de glucocorticoides NR3C1. Además, estas víctimas mostraron una metilación incrementada en regiones del promotor del receptor NR3C1 (McGowan et al., 2009).

Estudios recientes indican que el incremento de cortisol en pacientes con TDM es un rasgo característico de episodios severos que pueden acompañarse con síntomas psicóticos como alucinaciones. La terapia con antagonistas de glucocorticoides muestra algún efecto terapéutico en estos pacientes (Krishnan and Nestler, 2008).

En experimentos con roedores se ha visto como la administración crónica de glucocorticoides pueden provocar algunos síntomas depresivos (Gourley et al., 2008). Además, el exceso de corticoides puede reducir la proliferación celular en regiones del hipocampo, lo que podría contribuir a la reducción del volumen hipocampal (Krishnan and Nestler, 2008).

Otros estudios indican la importancia de los receptores de glucocorticoides en la regulación del sistema HHA. En animales que tienen reducida la expresión de estos receptores se produce un incremento de la actividad del sistema HHA en situaciones basales y estresantes. Y por el contrario, la sobreexpresión del receptor de glucocorticoides esta asociada con una mayor capacidad de amortiguación al estrés del sistema HHA (McGowan et al., 2009).

Algunos autores también sugieren un vínculo entre las alteraciones del sistema límbico-HHA y el sistema serotoninérgico, ya que tratamientos con antidepresivos tricíclicos e ISRSs se han asociados a una reducción en los niveles de CRH en el líquido cefalorraquídeo (McKay and Zakzanis, 2010).

### **3.3- Alteraciones Neuroinmunes**

Otro conjunto de alteraciones detectadas más recientemente y relacionadas con la etiología del TDM son las relacionadas con el eje neuroinmune. Desde finales de los 80 del siglo pasado se conoce que las terapias con interferón (INF) en pacientes de hepatitis C podían derivar en la aparición de TDM (Renault et al., 1987; Kovacs et al., 2016).

El sistema inmune esta formado por un conjunto de células circulantes (linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos, etc...) que se coordinan entre ellas secretando una serie de compuestos químicos para realizar una adecuada respuesta inmune. Estas moléculas son las citokinas y se dividen por sus efectos en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Furtado and Katzman, 2015).

Los trastornos de los estados de ánimo tienen una fuerte correlación con las citocinas pro-inflamatorias. Pacientes con TDM muestran niveles elevados de prostaglandina E2, la proteína C reactiva, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y las interleucinas 2, 6 y 1 $\beta$  (IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$ ) tanto en sangre circulante como en el líquido cefalorraquídeo (Rosenblat et al., 2014). También se ha descrito en modelos animales de depresión perfiles incrementados de citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  (Hodes et al., 2015).

Existen varias evidencias que indican que las citocinas inflamatorias se relacionan con el TDM por sus efectos sobre el eje HHA y sobre el sistema serotoninérgico. La IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y el IFN incrementan la producción de cortisol al incrementar los niveles de CRH y ACTH y aunque los glucocorticoides tengan efectos anti-inflamatorios es posible que simultáneamente se induzca un descenso en los niveles de los receptores de glucocorticoides (Postal and Appenzeller, 2014; Rosenblat et al., 2014).

Por otra parte, tanto el IL-2 como el INF incrementan la actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa que cataliza la conversión de triptófano en kinurenina, dejando menos triptófano disponible para la producción de serotonina. De forma parecida, se ha visto que el IL-6 y el TNF- $\alpha$  facilitan la conversión de serotonina en ácido 5-hidroxiindolacético, contribuyendo a reducir los niveles de serotonina. Por otro lado, investigaciones realizadas en líneas celulares derivadas del núcleo del rafe de ratas han mostrado que el TNF- $\alpha$  estimula la recaptación de serotonina (Postal and Appenzeller, 2014; Rosenblat et al., 2014).

También en pacientes con TDM resistentes tanto a los ISRSs como a los IRNS (inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina) se han observado elevados niveles en plasma de IL-6 pudiendo ser esta citokina un marcador de la resistencia a estos fármacos (Yoshimura et al., 2009).

### 3.4- Alteraciones Neuroplásticas

El cerebro es una estructura con una gran plasticidad, capaz de crear y eliminar sinapsis modificando la funcionalidad de circuitos neuronales relacionados con la adaptación y el aprendizaje (Dean and Keshavan, 2017). Algunos pacientes con TDM muestran un volumen disminuido del hipocampo y otras regiones del cerebro que regulan las emociones y la memoria, indicando una menor capacidad de neurogénesis y neuroplasticidad asociada con esta enfermedad. Factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su receptor TrkB parecen tener un papel en la recuperación y/o en la etiología del TDM (Krishnan and Nestler, 2008; Catrén and Rantamaki, 2010).

Estudios post-mortem en humanos con TDM muestran una reducida expresión del BDNF y el receptor TrkB en el hipocampo. Un meta-análisis realizado recientemente confirma que, además de en zonas del cerebro relacionadas con las emociones, en los pacientes con TDM se detectan niveles reducidos del BDNF circulante que se normalizan tras el tratamiento con antidepresivos (Molendijk et al., 2014). Existen estudios que indican que esta disminución se debe a la incapacidad de las plaquetas de liberar el BDNF al suero. Es interesante señalar que las plaquetas poseen receptores específicos de la serotonina mediante los cuales internalizan la serotonina circulante y que los antidepresivos impiden esta recaptación (Catrén and Rantamaki, 2009). Algunos autores han señalado el potencial del BDNF como un predictor de la eficacia de los tratamientos antidepresivos (Molendijk et al., 2014).

En modelos animales las investigaciones también apuntan a que alteraciones en los niveles de BDNF están relacionadas con el TDM. Se ha observado que el silenciamiento por medio de la tecnología de ARN interferente del BDNF en regiones específicas del hipocampo de ratas reduce la neurogénesis y produce comportamientos depresivos (Taliaz et al., 2010). Por otro lado, la administración de antidepresivos como la Fluoxetina (FLX) incrementa la expresión del ARN mensajero de BDNF tanto en el giro dentado del hipocampo como en el ATV y el núcleo acumbens, regiones ambas integradas en el circuito de recompensa y

relacionadas con los síntomas de anhedonia del TDM (Dean and Keshavan, 2017; Catrén and Rantamaki, 2010).

También se ha observado como el incremento en los niveles de BDNF con el tratamiento con antidepresivos muestra un retraso en su aparición, al igual que los efectos de los antidepresivos, pudiendo ser una explicación de este retraso en el efecto de los antidepresivos la necesidad del crecimiento de nuevas conexiones neuronales y la reorganización de las redes neuronales (Catrén and Rantamaki, 2010). Por tanto, parece que el BDNF juega un papel en el mecanismo de acción de los antidepresivos pero no está clara su implicación en la etiología de la enfermedad (Catrén and Rantamaki, 2010).

#### **4- Farmacoterapia**

A pesar de las numerosas alteraciones descritas en relación con el TDM y como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los fármacos desarrollados para esta enfermedad tienen como principal mecanismo de acción sobre los sistemas monoaminérgicos, especialmente la serotonina (Wong and Licinio, 2004). Los antidepresivos tricíclicos son la clase más antigua de antidepresivos descubiertos y debido a la gran cantidad de efectos secundarios y al conocimiento de los mecanismos de acción subyacentes se desarrolló la segunda generación de antidepresivos, los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y/o noradrenalina (ISRS, IRSN) (Khun et al., 2017). Desde su descubrimiento han surgido muchos antidepresivos de distintas clases, siendo los del tipo ISRSs, como la sertralina, el citalopam o el escitalopram, los que presentan mejores perfiles de seguridad (Khun et al., 2017). A pesar del desarrollo de una gran gama de fármacos distintos, el antidepresivo de primera elección en muchos casos clínicos continúa siendo uno de los primeros ISRS en descubrirse, la FLX (Wong et al., 1974), debido a su alta efectividad, su alta tolerancia por los pacientes y las altas tasas de adhesión al tratamiento (Iruela et al., 2009; Bonet de Luna et al., 2011).

No obstante, para que este tipo de antidepresivos sean efectivos, se requiere de un periodo como mínimo de dos semanas de tratamiento, pudiendo incrementarse la dosis en semanas sucesivas si no se consiguen los efectos deseados antes de intentar cambiar a otro tipo de medicación (Khun et al., 2017). Además de este retraso en la aparición de los efectos, se puede producir un agravamiento de los síntomas al inicio del tratamiento que incrementa el riesgo de autolisis de los pacientes (Alvarez and Viñas, 2010). Debido a las limitaciones del tratamiento con los ISRSs, numerosas investigaciones se han centrado en descubrir otras dianas terapéuticas al margen de los sistemas monoaminérgicos para tratar el TDM. Por ejemplo, neurotransmisores de tipo aminoácido, neuropéptidos o factores neurotróficos (Mathew et al., 2008).

Es destacable la aparición de moduladores de los sistemas glutamatérgicos y GABAérgicos. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador y cerca del 60% de las sinapsis son glutamatérgicas. Los cambios en los niveles de glutamato extracelular tiene amplias implicaciones en diversas funciones biológicas como la regulación de los factores neurotróficos. El glutamato media sus acciones, en parte, a través de los receptores AMPA y NMDA, muy implicados en la modulación de la plasticidad sináptica (Mathew et al., 2008). La ketamina, un anestésico antagonista de los receptores NMDA ha recibido especial atención en los últimos años al mostrar efectos antidepresivos muy rápidos y duraderos con dosis subanestésicas. En ratas se ha observado que el papel de los receptores AMPA también es fundamental para los efectos de la ketamina (Mathew et al., 2008). Las limitaciones del uso de la ketamina como antidepresivo lo constituyen sus efectos disociativos y su potencial uso abusivo, las investigaciones preclínicas se centran en descubrir los mecanismos de acción subyacentes asociados con los efectos antidepresivos de la ketamina para poder encontrar nuevas dianas terapéuticas (Zanos and Gould, 2018).

A día de hoy todavía existen neurotransmisores y neuropéptidos que no han sido estudiados en profundidad y que podrían constituir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del TDM, como el Neuropeptido Y, la Somatostatina o la Sustancia P. El estudio de los heterodímeros es otra área de interés para abordar nuevas estrategias con las que diseñar antidepresivos más eficaces (Machado-Vieira et al., 2017). Sin

embargo, es importante destacar que a pesar de las nuevas dianas terapéuticas, relativamente pocos fármacos no basados en la alteración del sistema monoaminérgico han sido aprobados por la FDA (“American Food and Drug Administration”) hasta la fecha (Mathew et al., 2008) y en el informe de uso de medicamentos publicado por la agencia española de medicamentos y productos sanitarios publicado en 2015 se señala a los antidepresivos de tipo ISRS, incluido la Fluoxetina, como los más consumidos.

Un factor clave a considerar en el desarrollo de nuevos fármacos lo constituye el elevado número de pacientes, en torno al 30%, que no responden adecuadamente a los tratamientos o no toleran sus efectos adversos (Travedi et al., 2006; Zhou et al., 2015). Aunque no existe una definición universalmente aceptada, se considera que estos pacientes sufren depresión resistente al tratamiento (DRT). Para algunos autores la DRT es una forma de TDM que no responde al menos a un antidepresivo y en los casos en que los pacientes no responden a un segundo tratamiento, las oportunidades de recuperación se reducen considerablemente (Fava and Davidson, 1996; Shelton et al., 2010). Los abordajes farmacológicos para intentar solventar la DRT implican varias estrategias: estrategias de optimización, sustitución y combinación o potenciación (Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015).

Dentro de las estrategias farmacológicas para abordar los casos donde el paciente no muestra síntomas de mejora tras la toma de antidepresivos, el primer abordaje implica un aumento o ajuste de la dosis o un incremento del tiempo de administración del fármaco con un seguimiento de la evolución de los síntomas (Shelton et al., 2010).

Las estrategias de sustitución, como su nombre indican, implican un cambio del primer antidepresivo por otro, a ser posible dentro de la misma clase, siendo los antidepresivos del tipo ISRS, como la FLX, los primeros recomendados para tratar el TDM. Este abordaje tiene la ventaja de evitar la polimedicación y la aparición de más efectos secundarios. Aunque se ha visto que esta estrategia tiene también una efectividad muy limitada (Shelton et al., 2010).

Las terapias de combinación, por su parte, han tenido mejores resultados y consisten en la coadministración de dos antidepresivos de la misma o distinta clase (Shelton et al., 2010).

Por último existen terapias de potenciación en las que se coadministran un antidepresivo con un agente potenciador que no es un antidepresivo. Se incluyen en este grupo, por ejemplo, agentes de potenciación como el litio u hormonas tiroideas. También se han probado en combinación con ISRSs beta bloqueantes como el Pindolol que además es un agonista parcial del receptor 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgico (Artigas et al., 1994). La Olanzapina, un antipsicótico con afinidad por el receptor 5HT<sub>2</sub> serotoninérgico y el D<sub>2</sub> dopaminérgico, también se ha probado en combinación con la FLX obteniéndose buenos resultados en pacientes con DRT (Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015).

Por todo lo expuesto, descubrir un mecanismo molecular que acelere la acción antidepresiva de los ISRSs sería importante para poder establecer estrategias terapéuticas más rápidas y eficaces que permitan reducir la dosis del tratamiento y/o el tiempo en el que se consiguen los efectos deseados.

Desde poco después de su descubrimiento en 1983 (Tatemoto et al., 1983), son varios los estudios, incluidos los de nuestro grupo de investigación, que han mostrado interacciones entre el sistema serotoninérgico y el neuropéptido Galanina (Fuxe et al., 1988, 1998b; Razani et al., 2000; Kuteeva et al., 2008; Millón et al., 2016). Tanto la Galanina como su fragmento N-terminal [GAL(1-15)], como se detalla más adelante, son péptidos con diversas funciones en el SNC, entre ellas, la de regular el estado de ánimo. Una de las interacciones descritas más relevantes y que afectan al estado de ánimo, se produce entre los receptores 5-HT<sub>1A</sub> de la serotonina y GAL(1-15) (Millón et al., 2016).

Al ser la FLX un fármaco del tipo ISRS que ha mostrado eficacia en estrategias de combinación y potenciación para el tratamiento del DRT y que, como describiremos a continuación, gran parte de sus efectos están mediados por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>. En



la presente tesis estudiamos la posible potenciación de los efectos antidepresivos de la FLX por parte de la GAL(1-15) en rata como una nueva estrategia farmacológica de potenciación.

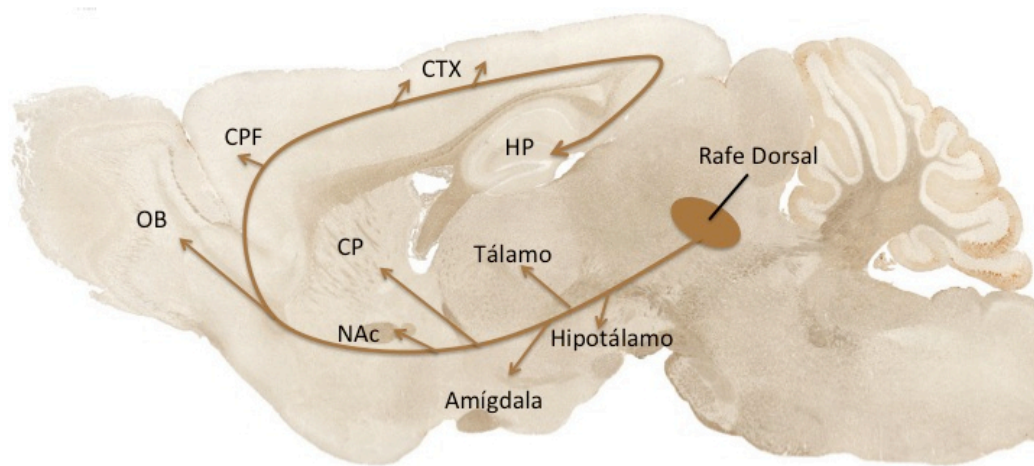
### **5- Sistema Serotoninérgico**

La serotonina en el cerebro esta implicada en multitud de funciones como la regulación del ciclo circadiano, apetito, agresión, actividad sensoriomotora, comportamiento sexual, aprendizaje, percepción, cognición, memoria y por supuesto la regulación del estado de ánimo. Durante el desarrollo, la serotonina es el primer neurotransmisor en aparecer y modula procesos como la neurogénesis, apoptosis, la migración celular y la plasticidad sináptica (Smythies, 2005).

Las neuronas serotoninérgicas se localizan en un conjunto de núcleos heterogéneos localizados en el tronco cerebral denominados núcleos del rafe y la mayor población de estas neuronas se agrupa en un conjunto de núcleos que conforman el núcleo rafe dorsal (RD). El RD se localiza entre el cerebro medio y el puente, con la mayoría de las células localizadas en la región ventral de la sustancia gris periaquiductal. En humanos se estima que el RD contiene un cuarto de millón de neuronas de las cuales un 70% son serotoninérgicas. La morfología del rafe dorsal en rata fue descrita en 1964 por Dahlström y Fuxe (Dahlström and Fuxe, 1964) y se estima que esta formado por unas 35000 neuronas de las que un tercio son serotoninérgicas (Michelsen et al., 2008).

Las proyecciones del RD muestran una organización topográfica, ya que las neuronas situadas en regiones rostrales del RD inervan a regiones más rostrales del cerebro. Las neuronas serotoninérgicas proyectan sus axones a través de fibras axonales ramificadas a regiones que están funcionalmente relacionados (Michelsen et al., 2008). Estas ramificaciones constituyen la mayor red neuroquímica del SNC en el cerebro después del glutamato, con una arborización axonal que supera el millón de terminales por  $\text{mm}^3$  en el neocortex de rata (Artigas, 2013).

Las proyecciones serotoninérgicas (figura 1) alcanzan a múltiples núcleos talámicos y subtalámicos, el caudado-putamen, núcleo acumbens, la amígdala, regiones corticales, la corteza prefrontal y el hipocampo (Michelsen et al., 2008). Estas proyecciones son en muchos casos recíprocas, de forma que las neuronas del RD son a su vez reguladas por inputs glutamatérgicos procedentes de las mismas áreas que reciben los axones serotoninérgicos, además de por interneuronas GABAérgicas del propio RD y mecanismos de autoinhibición mediados por autoreceptores serotoninérgicos que detallaremos más adelante (Artigas, 2013; Chaudury et al., 2015).



**Figura 1:** Imagen de un corte sagital de cerebro de ratona donde se señala la localización del RD y las diferentes regiones de proyección serotoninérgica. NAc: Núcleo acumbens; CP: Caudado-Putamen; OB: Bulbo olfatorio; CPF: Corteza Prefrontal; CTX: regiones corticales; HP: Hipocampo.

Muchas de estas regiones inervadas por neuronas serotoninérgicas se relacionan con la patofisiología del TDM como se ha mencionado anteriormente y el hipocampo es una de las regiones más estudiadas.

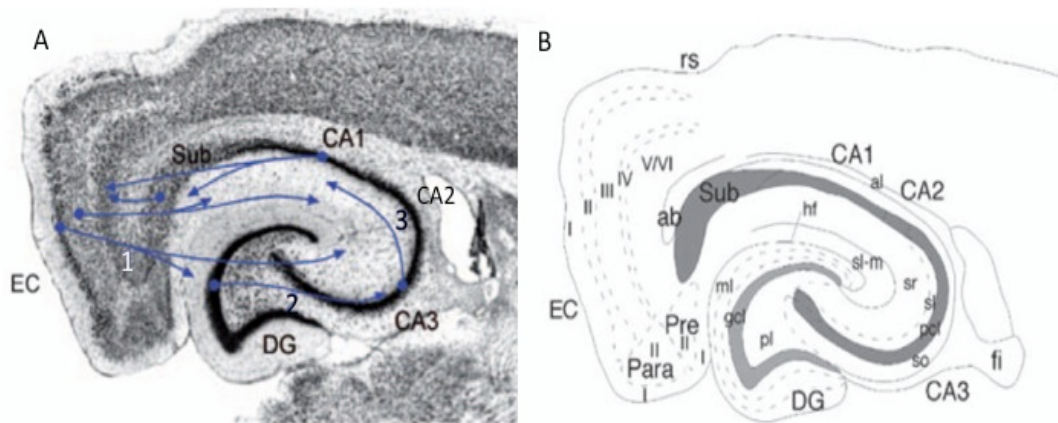
El hipocampo junto con el RD, es una de las regiones objeto de estudio de la presente tesis, por lo que a continuación describiremos brevemente su estructura. En la formación hipocámpal se distinguen 4 regiones principales: la corteza entorrinal (CE), el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho que incluye las regiones CA1, CA2 y CA3 y por último el subiculum (sub) (figura 2). El principal tipo celular en el GD son las células granulares y en las regiones CA1, CA2 y CA3

son las células piramidales que forman estructuras laminares claramente distinguible en estas regiones. El GD se divide en una capa molecular (ml), la capa granular (gcl) y la capa polimórfica (pl). Las regiones CA1, CA2 y CA3 se dividen en el estrato oriens (so), la capa de células piramidales (pyl) y los estratos lucidum (sl), radiatum (sr) y lacunosum-molecular (slm) aunque esta última capa es exclusiva de CA3. La disposición de las capas se detalla en la figura 2 (Amaral et al., 2007).

Una de las características más relevantes de la formación hipocampal es que la mayoría de sus conexiones son unidireccionales y forman un circuito sináptico entre las diferentes regiones. La CE proporciona la principal entrada de inputs a través de la llamada vía perforante, estableciendo sinapsis con la capa polimórfica del GD, con el estrato lacunosum-molecular de CA3 y también con CA1. Las células granulares del GD establecen sinapsis a su vez con la capa polimórfica del GD y con las neuronas del estrato lucidum de CA3 por medio de las fibras musgosas. Las neuronas de CA3 establecen sinapsis con las células piramidales de CA1 que a su vez proyectan al subiculum y a la CE. Por último el subiculum también proyecta a la CE (figura 2) (Amaral et al., 2007).

Pero la formación hipocampal también recibe inputs de otras regiones. Existen fibras noradrenérgicas que terminan en la capa polimórfica del GD y se extienden hacia el estrato lucidum de CA3, zonas ocupadas por las fibras musgosas. También existen proyecciones serotoninérgicas provenientes del rafe medial y dorsal que terminan en la capa polimórfica del GD (Amaral et al., 2007).

La principal vía de eferente del hipocampo también la constituye el CE, que envía proyecciones hacia toda la corteza y además el hipocampo también envía proyecciones hacia la corteza prefrontal los núcleos septales y el hipotálamo (Amaral et al., 2007).



**Figura 2:** **A)** Sección de hipocampo de rata. Se indican las 4 regiones principales, EC: corteza entorrinal; DG: giro dentado; CA1, CA2 y CA3 son las tres zonas del hipocampo propiamente dicho; Sub: Subiculum. Las flechas indican el sentido del circuito sináptico que se establece entre las diferentes regiones. 1: Vía perforante, la EC proyecta a las regiones del GD, CA3 y CA1; 2: Conexiones entre DG y CA3; 3: Conexiones entre CA3 y el CA1. **B)** Esquema de las diferentes subcapas que se distinguen en la formación hipocámpal. ml: capa molecular, gcl: capa granular, pl: capa polimórfica, so: estrato oriens, pyl: capa de células piramidales, sl: estrato lucidum, sr: estrato radiatum, slm: estrato lacunosum-molecular (Amaral et al., 2007).

Aunque el hipocampo propiamente dicho lo constituyen las regiones CA1, CA2 y CA3 por motivos expositivos y de claridad nos referiremos en adelante como hipocampo a la formación hipocámpal completa.

### 5.1- Receptores Serotoninérgicos en el TDM

La serotonina media sus acciones fisiológicas a través de varios subtipos de receptores. Se conocen 7 familias de receptores serotoninérgicos 5HT1-5HT7. Todos ellos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) excepto el tipo 5HT3 que es un receptor ionotrópico (Artigas, 2013).

La principal familia de receptores serotoninérgicos es la de los receptores 5-HT1 de la que existen 5 subtipos: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E y 5-HT1F. De los cuales los subtipos 5-HT1A y 5-HT1B son con diferencia los más estudiados. Ambos subtipos de receptores actúan acoplados a la proteína Gi/0, inhibiendo a la adenilato ciclasa, y ambos se localizan en posiciones tanto presinápticas como postsinápticas (Artigas, 2013; Nautiyal and Hen, 2017).

En su distribución presináptica, tanto el receptor 5-HT1A como el 5-HT1B actúan estableciendo un sistema de retroalimentación negativa, de forma que su activación inhibe la liberación de serotonina. Los receptores 5-HT1A presinápticos se encuentran en el soma y las dendritas de las neuronas serotoninérgicas del RD, de forma que al activarse causan una hiperpolarización en las neuronas mediante la apretura de los canales rectificadores de potasio, provocando una reducción en el ratio de descargas de potenciales de acción (Barnes and Sharp., 1999; Artigas, 2013). Esta disminución de señales origina una reducción general de los niveles de serotonina extracelular en los lugares de proyección de las neuronas serotoninérgicas. Por su parte, los receptores 5-HT1B se encuentran en los terminales axónicos, y al activarse impiden la liberación de serotonina al inhibir los canales de calcio dependiente de voltaje (Mizutani et al., 2006; Nautiyal and Hen, 2017).

Los receptores 5-HT1A presentan una distribución mucho más extendida que los receptores 5-HT1B cuando se localizan de forma postsináptica. El 5-HT1A se encuentra abundantemente distribuido por el hipocampo además de por la corteza cerebral y la amígdala y en menor medida en el tálamo, hipotálamo y los ganglios basales. El 5-HT1B sin embargo presenta una mayor en los ganglios basales (Smythies, 2005; Artigas, 2013; Nautiyal and Hen, 2017).

El receptor 5-HT1B tiene un papel relacionado con la agresividad y el comportamiento impulsivo, pero también en la modulación del TDM. Pacientes con TDM muestran una menor respuesta a los agonistas del 5-HT1B sugiriendo una menor sensibilidad de estos receptores (Artigas, 2013; Nautiyal and Hen, 2017). También existen evidencias de una posible interacción directa entre el 5-HT1B y el 5-HTT y que es la diana terapéutica de los ISRSs (Hagan et al., 2012).

Por su parte el receptor 5-HT1A (5-HT1AR) es de uno de los receptores serotoninérgicos más estudiados en relación con el TDM (Nautiyal and Hen, 2017), en gran medida debido a que fue de los primeros subtipos de receptores serotoninérgicos para el que se desarrolló un agonista específico, el 8-OH-DPAT (Gozlan et al., 1983). Esto permitió realizar su caracterización farmacológica y

conocer su distribución en el SNC, así como asignarle un papel fundamental en la regulación del estado de ánimo y en los mecanismos de actuación de los ISRSs (Barnes and Sharp, 1999). Por ejemplo, en experimentos realizados con el test de natación forzada (FST), se observó que la administración del agonista del 5-HT<sub>1A</sub>R 8-OH-DPAT inducía un efecto antidepresivo mayor incluso que antidepresivos como la FLX en ratas (De Vry et al., 2004). Este efecto se vio bloqueado con el antagonista específico del 5-HT<sub>1A</sub>R Way100635, confirmando el papel del 5-HT<sub>1A</sub>R en la mediación de los efectos antidepresivos en el FST (De Vry et al., 2004).

Además de las pruebas de comportamiento en animales, estudios postmortem han mostrado alteraciones en la activación de los 5-HT<sub>1A</sub>R en víctimas suicidas con TDM así como una mayor densidad de los mismos (Boldrini et al., 2008), asociándose este aumento en los niveles de autorreceptor con una pobre respuesta a los antidepresivos. Un polimorfismo en el promotor del gen del 5-HT<sub>1A</sub>R se ha asociado al riesgo de padecer desórdenes afectivos y también con la resistencia a tratamiento con ISRSs (Le Francois et al., 2008). Modelos genéticos de ratones que carecen del factor de regulación transcripcional Deaf-a, que se une al promotor del gen del 5-HT<sub>1A</sub>R, muestran a la vez un incremento en la densidad y función de los 5-HT<sub>1A</sub>R presinápticos a la vez de un descenso en la densidad y función de los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos (Celada et al., 2013; Artigas, 2013).

Otros subtipos de receptores serotoninérgicos también han sido estudiados en mayor o menor medida y tienen su papel en el TDM. De forma muy resumida mencionamos algunos aspectos de estos receptores.

De la familia 5-HT<sub>2</sub> se conocen 3 subtipos de receptores: 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, todos ellos se encuentran preferentemente acoplados a proteínas Gq/11, incrementando los niveles de inositol fosfato y calcio citosólico. Su activación provoca la excitación neuronal (Artigas, 2013).

El receptor 5-HT<sub>2A</sub> se encuentra ampliamente distribuido en el neocortex, concretamente en interneuronas GABAérgicas y en neuronas glutamatérgicas de

proyección (de Almeida and Mengod, 2007; Artigas, 2013). En regiones límbicas y corticales los receptores 5HT2A se coexpresan con 5-HT1AR (Amargos-Bosch et al., 2004; Artigas, 2013). Recientemente estudios in vitro han mostrado que los receptores 5-HT1A y 5-HT2A pueden formar heterodímeros con una relación alostérica antagónica entre ambos, ya que los agonistas del 5-HT2A pueden reducir la afinidad por los agonistas del 5-HT1AR y viceversa (Borrito-Escuela et al., 2017). Estos datos apoyan la hipótesis de que el bloqueo farmacológico del receptor 5-HT2A podría potenciar el efecto en la acción del 5-HT1AR a través de los ISRS (Artigas, 2013).

El receptor 5-HT2C se encuentra localizado en la corteza cerebral, el hipocampo, la sustancia negra y el cerebelo. También se ha encontrado en los núcleos del rafe, concretamente en interneuronas GABAérgicas (Serrats et al., 2005), por lo que se le supone alguna función en la supresión de la actividad de las neuronas serotoninérgicas. Se han encontrado alteraciones en el ARN mensajero del 5-HT2C en la corteza prefrontal de víctimas de suicidio (Gurevich et al., 2002). Otros estudios muestran como combinando antagonistas del receptor 5-HT2C con ISRSs se incrementan los niveles de serotonina en regiones corticales e hipocampales (Cremers et al., 2004; Artigas, 2013).

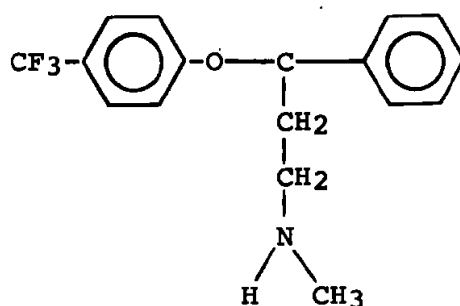
Por su parte el receptor 5-HT2B tiene una localización preferentemente periférica, aunque también se ha localizado en el RD y algunos estudios muestran que agonistas específicos tiene efectos antidepresivos (Artigas, 2013).

Respecto al resto de receptores serotoninérgicos, en los últimos años se han aportado importantes evidencias de su papel en el TDM. Los receptores 5-HT4, 5-HT6 y 5-HT7 son receptores postsinápticos con efectos excitatorios, acoplados a proteína Gs. Su activación incrementa los niveles de AMPc (Pytliak et al., 2011). Los receptores 5-HT3 son de tipo ionotrópicos y pueden encontrarse en distintas localizaciones del SNC con implicaciones en el TDM. Estudios comportamentales realizados en modelos animales muestran como tanto agonistas como antagonistas específicos del receptor 5-HT3 tienen efectos anti y prodepresivos respectivamente. En los últimos

años también se está estudiando el papel de estos receptores en la acción de los antidepresivos (Artigas, 2013).

### 5.2- FLX, 5-HTT y 5-HT1AR

La FLX es un fármaco desarrollado por la compañía Eli Lilly en los años 70 y aprobado por la FDA en 1987 para su uso clínico con el nombre de Prozac (Wong et al., 1974; Perez-Caballero et al., 2014). Es uno de los fármacos más utilizados de su clase, los ISRSs, siendo el antidepresivo de primera elección en muchos casos clínicos para el tratamiento contra el TDM (Iruela et al., 2009). Además la FLX también se utiliza para tratar otros trastornos como el trastorno obsesivo-compulsivo, bulimia y trastorno de pánico (Sghendo and Mifsud, 2012). Presenta una biodisponibilidad entorno al 70% y tras su ingesta es rápidamente metabolizada por el hígado en Norfluoxetina. Tanto FLX como Norfluoxetina tienen la capacidad de bloquear al 5-HTT. En humanos, la FLX es eliminada del plasma en un plazo de 3 días mientras que la NorFLX puede durar hasta 15 días. (Qu et al., 2009; Sghendo and Mifsud, 2011; Perez-Caballero et al., 2014).



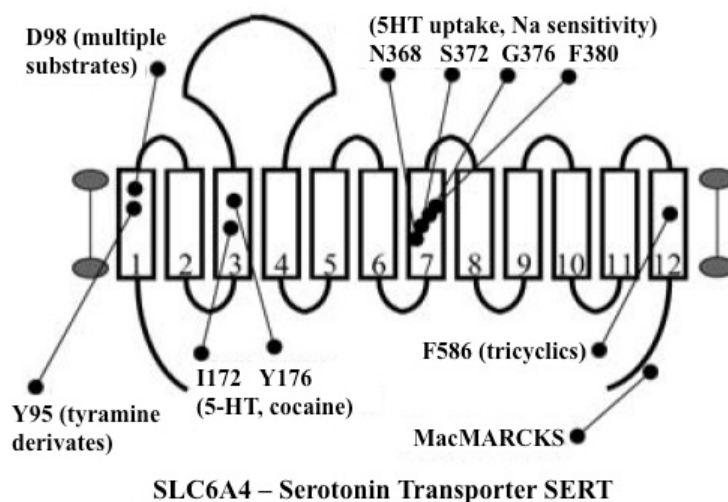
**Figura 3:** Estructura química de la FLX, (*RS*)-*N*-Metil-3-fenil-3-(4-trifluorometilfenoxi)propilamina, (Wong et al., 1974)

Ensayos competitivos han mostrado que la FLX tiene una fuerte afinidad por el 5-HTT y débil afinidad por otros recaptadores monoaminérgicos. Además, la FLX presenta una afinidad relativamente débil por algunos subtipos de receptores serotoninérgicos y también por receptores dopaminérgicos, adrenérgicos y el receptor H1 de la histamina. Este perfil de afinidad es comparativamente mucho



menor que los que presentan la anterior generación de antidepresivos tricíclicos que poseían un mayor número de efectos secundarios. No obstante, la FLX puede provocar también náuseas, pérdida de apetito, disfunción sexual, insomnio y ansiedad (Sghendo and Mifsud, 2011; Perez-Caballero et al., 2014).

La diana farmacológica de la FLX es el 5-HTT, una proteína de membrana perteneciente a la familia de transportadores dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  SLC6. El 5-HTT es una proteína de 630 aminoácidos con 12 pasos transmembrana con los extremos N- y C-terminales dispuestos en el lado citosólico y un gran bucle extracelular entre los dominios transmembrana 3 y 4 (figura 4). En el caso particular del 5-HTT también es necesaria la participación del  $\text{K}^+$  para poder transportar la serotonina desde el espacio extracelular hacia el interior de las neuronas. Varias líneas experimentales señalan que el 5-HTT necesita formar complejos oligoméricos para su correcto funcionamiento. Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se han identificado numerosos dominios y residuos imprescindibles para su funcionamiento (Chen et al., 2004; Lau et al., 2008).



**Figura 4:** Representación de la estructura del 5-HTT perteneciente a la familia de transportadores SCL6 (SLC6A4), conocido también por sus siglas en inglés *SERT*, donde se señalan algunos de los aminoácidos fundamentales en su interacción con diferentes sustancias (Chen et al., 2004).

El 5-HTT se encuentra ampliamente distribuido tanto en tejidos periféricos como en el SNC y ha sido implicado en una amplia variedad de funciones como la regulación del estado de ánimo, apetito, sueño, cognición y actividad motora (Chen et al., 2004; Hagan et al., 2012).

En cuanto a su regulación, el 5-HTT se encuentra formando un complejo con la proteína fosfatasa A2. Tras la activación de la proteína quinasa C, el 5-HTT se disocia de la fosfatasa y se internaliza. Además el receptor 5-HT1B también tiene capacidad de modular al 5-HTT. Se ha visto que los antagonistas del 5-HT1B provocan una pérdida de actividad del transportador y, por el contrario, agonistas del receptor incrementan la capacidad de recaptación del transportador (Chen et al., 2004; Hagan et al., 2012).

Los estudios de los efectos de los ISRSs sobre las características de unión del 5-HTT a sus ligandos y de los niveles de su ARN mensajero en animales han mostrado resultados contradictorios (Benmansour et al., 1999; Descarries and Riad, 2012). Hay que considerar que la variedad de resultados obtenidos se debe al uso de diferentes ISRSs con propiedades farmacológicas distintas que son administrados por vías y a dosis diferentes (Benmansour et al., 1999; Sghendo and Mifsud, 2011).

La acción de los ISRSs sobre los 5-HTT es muy rápida, elevando en poco tiempo los niveles de serotonina. Pero los efectos antidepresivos de la FLX tardan unas dos semanas en producirse, evidenciándose que otros mecanismos a más largo plazo se tienen que producir para obtener los resultados deseados (Benmansour et al., 1999; Lau et al., 2011).

El 5-HTT no se internaliza con la administración aguda de FLX, pero los tratamientos crónicos producen una reducción en los niveles del 5-HTT en membrana del 50% en el RD y del 70% en el hipocampo (Descarries and Riad, 2012). Estudios más recientes empleando ARN interferente para reducir los niveles de 5-HTT, muestran como esta reducción provoca potentes efectos antidepresivos en diferentes pruebas de comportamiento en ratones. En estos estudios, la reducción del

5-HTT produce además un conjunto de cambios parecidos a los del tratamiento crónico con ISRSs, como la pérdida de función del 5-HT1AR presináptico y el incremento de factores de crecimiento, del árbol dendrítico y la plasticidad sináptica en el hipocampo (Ferrés-Coy et al., 2016).

Aunque la diana farmacológica de la FLX sea el 5-HTT, existen numerosas evidencias que señalan que el papel del 5-HT1AR, tanto en su distribución presináptica como postsináptica, es fundamental para obtener los efectos antidepresivos.

Varios estudios de comportamiento con roedores muestran que los efectos antidepresivos inducidos por la FLX se bloquean cuando se coadministra la FLX con el antagonista del 5-HT1AR Way100635, señalando el papel fundamental del 5-HT1AR en la mediación de los efectos comportamentales de la FLX (Detke et al., 1997; De Vry et al., 2004; Estada-Camarena et al., 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, el 5-HT1AR juega un papel inhibitorio impidiendo la liberación de serotonina en su localización presináptica. En estudios de microscopía electrónica e inmunohistoquímica realizados con tejido de rata se observa como la administración aguda del agonista 8-OH-DPAT o de la FLX provocan la internalización del 5-HT1AR presináptico. Sin embargo, sólo tras la administración crónica de la FLX, dichos receptores dejan de internalizarse (Descarries and Riad, 2012).

En experimentos donde se reduce la expresión específica de los 5-HT1AR presinápticos en ratones, por medio de ARN interferentes, se observa un comportamiento antidepresivo en la prueba del FST, así como un incremento en los niveles de serotonina en la corteza prefrontal inducidos por la administración de FLX en estos ratones (Bortolozzi et al., 2012).

En estudios funcionales en rata se observa además que, aunque la administración crónica de FLX no altera la densidad de los 5-HT1AR ni en el RD ni en el

hipocampo, aunque si se detectan reducciones en los niveles de proteína G acoplada a 5-HT<sub>1A</sub>R en el RD, junto con una pérdida de funcionalidad de los autorreceptores (Castro et al., 2008). En trabajos recientes y empleando la técnica de *hibridación in situ* también se ha comprobado que la expresión del 5-HT<sub>1A</sub>R no se ve modificada por la administración crónica de FLX en rata (Volle et al., 2018).

Todos estos datos abundan en la idea de la pérdida de funcionalidad del 5-HT<sub>1A</sub>R en el RD como uno de los efectos del tratamiento con FLX. Por el contrario, la funcionalidad de los 5-HT<sub>1A</sub>R en el hipocampo parece incrementarse con la administración crónica de FLX. Además estos efectos también se ven bloqueados cuando se administra conjuntamente la FLX con el antagonista del 5-HT<sub>1A</sub>R Way100635 (Castro et al., 2008). En estudios electrofisiológicos con distintos ISRSs administrados crónicamente, se observa una mejora en la activación tónica de los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos del hipocampo (Haddjeri et al., 1998).

Es interesante señalar que la desensibilización de los 5-HT<sub>1A</sub>R también se ha observado en regiones hipotalámicas tras la administración crónica con FLX, donde los 5-HT<sub>1A</sub>R tienen una distribución postsináptica. Esta desensibilización también se asocia con una gradual pérdida en los niveles de proteína G. En otras regiones sin embargo, como la corteza prefrontal, no se observan dichos cambios en los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos (Li et al., 1996; Serres et al., 2000).

Varios estudios se han centrado en el hipocampo como región donde la FLX produce muchos de los cambios asociados a su efecto terapéutico. En el hipocampo la administración crónica de FLX incrementa la neurogénesis en la región subgranular del GD en ratas. El bloqueo de esta proliferación es capaz de bloquear también las respuestas comportamentales de los antidepresivos (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003). Por otra parte, experimentos realizados en ratas ovariectomizadas muestran como la administración crónica de FLX es capaz de incrementar la densidad de las sinapsis en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de las regiones hipocámpales CA1 y CA3 (Hajszan et al., 2005).

Experimentos más recientes con ratones que carecen de 5-HT<sub>1A</sub>R en las células granulares adultas del GD, muestran como la administración crónica de FLX no induce efectos antidepresivos en el FST. De igual forma, la administración crónica de FLX en este modelo animal produce un descenso muy notable en la neurogénesis respecto a los animales control así como un descenso en los niveles de BDNF y del Factor de crecimiento endotelial vascular, que al igual que el BDNF, se ha asociado recientemente con los efectos terapéuticos de los antidepresivos (Samuels et al., 2015).

Como acabamos de ver, el papel de los 5-HT<sub>1A</sub>R tanto presinápticos, como postsinápticos es fundamental como mediador de los efectos terapéuticos de la FLX. La administración aguda de FLX provoca un incremento de los niveles de serotonina extracelular en el RD, lo que activa a los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> e inhibe los disparos celulares hacia las zonas de proyección de las neuronas serotoninérgicas. Solo con un tratamiento prolongado se induce la desensibilización de los 5-HT<sub>1A</sub>R presinápticos, evitando el mecanismo de retroalimentación negativa e incrementando los niveles de serotonina en el cerebro en las regiones de proyección (Bortolozzi et al., 2012; Artigas, 2013; Nautiyal and Hen, 2017). Los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos, especialmente en el hipocampo, también parecen fundamentales en la mediación de los efectos antidepresivos de la FLX ya que su funcionalidad se ve incrementada por el tratamiento y por el contrario su ausencia inhibe las acciones antidepresivas en el FST (Castro et al., 2008; Samuels et al., 2015).

Este papel diferencial de los 5-HT<sub>1A</sub>R según su localización sea pre o postsináptica ha abierto la puerta al uso sustancias que bloqueen la activación del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> como una terapia adyuvante en el uso de ISRSs. Por ejemplo, agonistas parciales del 5-HT<sub>1A</sub>R, como el pindolol (Artigas et al., 1994) y, más recientemente, la vilazodona, han demostrado ser adyuvantes eficaces de los ISRS en los estudios clínicos (Nautiyal and Hen, 2017). El desarrollo de agonistas con preferencia por los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos también podría constituir una herramienta útil para el tratamiento del TDM (Newman-Tancredi et al., 2008; Nautiyal and Hen, 2017).

Además del desarrollo de fármacos con perfiles farmacológicos adecuados hay que considerar la capacidad de los GPCRs de formar oligómeros entre sí y con otro tipo de receptores. Muchos fármacos tradicionales tienen como diana los sitios de unión con el ligando endógeno, sin embargo los GPCRs pueden ser modulados de forma alostérica (Christopoulos and Kenakin, 2002; Nickols and Conn, 2014). Los contactos que se producen entre GPCRs dentro de un mosaico de receptores proporcionan la estructura por la que fármacos que no son reconocidos directamente por un receptor pueden modular su actividad (Christopoulos and Kenakin, 2002; Nickols and Conn, 2014). Varios estudios han mostrado como los receptores serotoninérgicos tienen la capacidad de formar oligómeros. Por ejemplo entre los receptores, 5-HT<sub>1A</sub>-GALR1, 5-HT<sub>1A</sub>-5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>-5-HT<sub>7</sub> (Borrito-Escuela et al., 2010, 2017; Renner et al., 2012) e incluso formando trímeros con receptores galaninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>-GALR1-GALR2 (Millón et al., 2016). La capacidad del 5-HT<sub>1A</sub>R de formar oligómeros podría constituir un mecanismo molecular con el que diseñar nuevas estrategias contra el TDM.

## **6- Galanina**

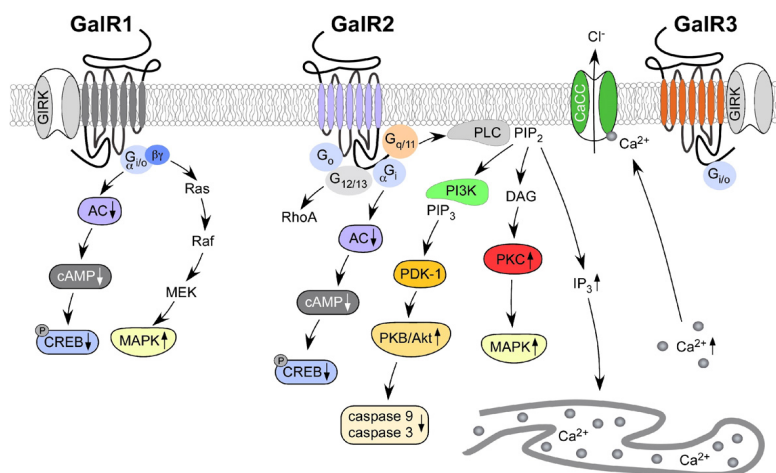
La Galanina es un péptido descubierto en 1980 en el intestino del cerdo (Tatemoto et al., 1983) que consta de 29 aminoácidos, 30 en humanos, con una secuencia altamente conservada entre especies, sobre todo en el extremo N-terminal (Wiczek et al., 1996). La Galanina se encuentra ampliamente distribuida en el SNC, localizándose entre otras regiones en la corteza cerebral, el hipocampo y en el tronco encefálico, donde colocaliza con neuronas noradrenérgicas del LC y neuronas serotoninérgicas del RD (Melander et al., 1986; Skofitsch and Jacobowitz, 1985; Jacobowitz et al., 2004).

La Galanina se asocia con varias funciones fisiológicas. Está implicada en el control central de la ingesta, ingesta de alcohol, control del umbral del dolor, rendimiento cognitivo, funciones cardiovasculares, homeostasis energética, funciones neuroendocrinas, regulación de procesos inflamatorios y regulación del estado de ánimo (Mitsukawa et al., 2008; Diaz-Cabiale et al., 2010; Fang et al., 2015; Lang et al., 2015).

La Galanina pertenece a una familia de 4 péptidos que están codificados por dos genes diferentes. Del procesado de la preprogalanina se obtienen los péptidos Galanina y GMAP a partir de un gen y mediante el splicing alternativo de otro gen se obtienen los péptidos GALP y Alarina (Lang et al., 2007). Se conocen tres tipos de receptores por los cuales la Galanina media su actividad biológica, GALR1, GALR2 y GALR3, todos ellos pertenecientes a la familia de GPCRs (Branchek et al., 2000). Los receptores GALR1 y GALR2 presentan una afinidad similar por la Galanina mientras que el receptor GALR3 tienen una afinidad un poco menor. Para el resto de péptidos de la familia de la Galanina no hay receptores conocidos (Lang et al., 2007; Ihnatko and Theodorsson, 2017).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas y estudios de hibridación *in situ*, se ha determinado que los receptores de Galanina están ampliamente extendidos en el SNC, en muchos casos de forma solapada (O'Donnell et al., 2003), y en regiones implicadas en el TDM como la corteza prefrontal, el hipocampo y el RD, todas ellas áreas de proyección de las neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas (Jacobowitz et al., 2004). Los receptores galaninérgicos de un determinado subtipo muestran una elevada conservación de su secuencia entre especies, mientras que entre los tres tipos de receptores de una determinada especie presentan una baja similaridad de secuencias (Lang et al., 2007).

El receptor GALR1 se encuentra acoplado a la proteína Gi/0 y su activación inhibe a la adenilato ciclasa y estimula la vía de señalización de las MAP kinasas y, al igual que los receptores GALR3, produce la hiperpolarización de las células mediante la apertura de los canales rectificadores de potasio. El receptor GALR2 se ha descrito acoplado a varias clases de proteína G, siendo la más común la proteína Gq/11 que activa la vía de señalización intracelular mediada por fosfolipasa C que incrementa el  $Ca^{2+}$  intracelular y la activación de canales de  $Cl^-$  dependientes de calcio. Aunque también se ha descrito la activación de proteínas Gi/0 a través del GALR2, por lo que el efecto de este receptor puede ser tanto inhibitorio como excitatorio dependiendo de a que tipo de proteína G esté acoplado (figura5) (Lang et al., 2007).



**Figura 5:** Representación esquemática de las cascadas de señalización intracelular activadas por los receptores galaninérgicos (Lang et al., 2007).

La porción N-terminal de la Galanina, concretamente los primeros 15 aminoácidos, tiene una secuencia común entre especies y es fundamental para el reconocimiento del péptido por sus receptores y para sus funciones biológicas en el SNC. Sin embargo, la porción C-terminal parece no tener actividad biológica en el SNC (Diaz-Cabiale et al., 1998; Hedlund et al., 1992). Muchos de los agonistas y antagonistas específicos para un subtipo de receptor galaninérgico se han obtenido generando compuestos quiméricos que incluyen la secuencia de los primeros aminoácidos de la Galanina (Lang et al., 2007). Por ejemplo, en el agonista específico de GALR1 M617 se incluyen los 13 primeros aminoácidos de la Galanina (Lundstrom et al., 2005) y en el antagonista específico de GALR2 M871 los aminoácidos del 2 al 13 (Sollenberg et al., 2006).

### 6.1- Galanina en la regulación de la ansiedad y el TDM

Desde poco después de su descubrimiento en 1983 se sabe que la Galanina se sintetiza junto con la NA en neuronas del LC (Melander et al., 1986), así como en neuronas de regiones implicadas en la respuesta de la ansiedad como la amígdala (Melander et al., 1988). Los efectos de la Galanina sobre la ansiedad son complejos y en roedores varían dependiendo del núcleo cerebral donde se administra. Por ejemplo, la Galanina administrada por vía intracerebroventricular (i.c.v.) produce un efecto ansiolítico en el test de conflicto de Vogel (Bing et al., 1993), pero cuando se



administra directamente en la amígdala produce un efecto ansiogénico en la misma prueba (Möller et al., 1999).

En relación con la ansiedad, la Galanina también se coexpresa en el hipotálamo en neuronas que secretan CRF y vasopresina, péptidos implicados en la regulación del eje HHA (Mazzocchi et al., 1992). Al administrar directamente Galanina en el hipotálamo se produce un descenso de activación del eje HHA en respuesta al estrés (Hooi et al., 1990) y además, se ha comprobado que el estrés incrementa los niveles de preprogalanina en el LC, amígdala e hipotálamo (Holmes and Picciotto, 2006; Karlsson and Holmes, 2006). En estudios electrofisiológicos se ha visto como la Galanina inhibe la frecuencia de disparo de las neuronas del LC, presumiblemente mediante la activación de los receptores GALR1 o GLAR3 y la apertura de los canales rectificadores de potasio (GIRK) (Pieribone et al., 1995; Ma et al., 2001). Al emplear concentraciones más bajas, se observó que la Galanina potencia el efecto inhibitorio de la noradrenalina mediado por los autorreceptores  $\alpha_2$  (Ma et al., 2001). La administración i.c.v. de Galanina también provocaba una reducción de los niveles de noradrenalina en el hipocampo ventral (Yoshitake et al., 2003).

Recientemente, se ha descrito también que la GAL administrada a bajas dosis (0.3 nmol) en la región caudal y no en la rostral del RD tiene efectos ansiogénicos en la prueba del laberinto elevado en T (Silote et al., 2013), siendo estos efectos replicados con el agonista de GALR1 M617 a dosis mayores y no con el agonista de GALR2 AR-M186 (Morais et al., 2016). De forma similar, la administración de GAL en la región del hipocampo dorsal también produce un efecto ansiogénico en el laberinto elevado en cruz, mientras que el antagonista de GALR2 M871 induce por si mismo efectos ansiolíticos en la misma prueba (Funck et al., 2018).

Parte de la complejidad observada en los efectos conductuales de la Galanina relativos a la ansiedad posiblemente se deba al hecho de que los receptores galaninérgicos tienen una acción tanto activadora como inhibidora (Branchek et al., 2000; O'Donnell et al. 2003). Además, la interpretación de los resultados se ve obstaculizada por el limitado conocimiento de la farmacocinética y las

concentraciones del péptido administrado, por lo que es importante emplear agonistas y/o antagonistas de los diferentes subtipos de receptores (Kuteeva et al., 2008).

En relación con el papel de la Galanina en el TDM, las interacciones entre la Galanina y el sistema serotoninérgico se conocen desde poco después del descubrimiento del péptido. La Galanina también se expresa en regiones del SNC relacionadas con el TDM, especialmente en el RD donde muchas neuronas serotoninérgicas coexpresan Galanina (Melander et al., 1986).

Las primeras evidencias farmacológicas sobre la posible implicación de la Galanina en el TDM provienen de experimentos donde la administración i.c.v. de Galanina provocaba un descenso en los niveles de serotonina en zonas de proyección serotoninérgicas como la formación hipocampal y la corteza prefrontal (Fuxe et al., 1988). Además, en preparaciones de membrana, la Galanina también reduce selectivamente la afinidad de los 5-HT<sub>1A</sub>R (Fuxe et al., 1988b).

Los efectos de la Galanina en pruebas de comportamiento como el FST ponen de manifiesto un papel pro-depresivo del péptido. De este modo, se ha observado que la administración en el ATV de Galanina produce un incremento de la inmovilidad en dicha prueba (Weiss et al., 1998) con la administración central de la Galanina, y en ambos casos, la administración de antagonistas bloquearon los efectos pro-depresivos de la Galanina (Kuteeva et al., 2007).

En experimentos electrofisiológicos tras la administración de Galanina, se observó una inhibición de la tasa de disparo de las neuronas del RD debido probablemente a la apertura de canales GIRK. A dosis bajas, la Galanina igualmente potenciaba la acción inhibitoria de la serotonina en el núcleo dorsal del rafe, presumiblemente mediante la interacción con los 5-HT<sub>1A</sub>R somatodendríticos (Xu et al., 1998).

Como se ha mencionado anteriormente la señal galaninérgica está mediada por tres subtipos de receptores acoplados a diferentes vías de señalización intracelular que

pueden provocar una activación o una inhibición neuronal. Diferentes estudios han señalado que los receptores GALR1 y GALR3 parecen tener un papel pro-depresivo. En el FST el agonista de GALR1, M617, produce un incremento de la inmovilidad similar al de la Galanina (Kuteeva et al., 2008b) y los antagonistas de GALR3 inducen comportamientos antidepresivos en la misma prueba (Swanson et al., 2005).

Por otro lado la activación del receptor GALR2 induce efectos anti-depresivos. La administración i.c.v. del agonista AR-M1869 disminuye la inmovilidad de las ratas en el FST y el antagonista específico de GALR2 M871 provoca un incremento de la inmovilidad (Kuteeva et al., 2008b).

Además de los estudios farmacológicos, modelos animales de depresión también señalan el papel de la Galanina en el TDM. En ratones modificados genéticamente para sobreexpresar Galanina se ha visto que muestran un comportamiento depresivo en el FST (Kuteeva et al., 2004). Y al contrario, ratas seleccionadas por su alto comportamiento depresivo en el FST, como la línea sensible de ratas Flinder, muestran una mayor número de sitios de unión para la Galanina en el RD y una menor inmunoreactividad por la Galanina tanto en el RD como en el hipocampo y en el hipotálamo (Bellido et al., 2002).

Las interacciones entre la Galanina y la serotonina se han estudiado a lo largo de las últimas décadas demostrando la existencia de una interacción recíproca entre ambos sistemas con implicaciones en la regulación del estado de ánimo.

En estudios de autorradiografía se muestra como la administración i.c.v. de Galanina modifica las características funcionales del 5-HT<sub>1A</sub>R *in vivo* produciendo un rápido incremento de la  $K_d$ , descenso de afinidad, a los 10 minutos tras la infusión de Galanina. Además de un incremento en el valor de  $B_{max}$  a las 2h (Razani et al., 2000). Por el contrario, la administración del agonista 5-HT<sub>1A</sub>R 8-OH-DPAT aumenta la afinidad de los receptores Galaninérgicos (Hedlund et al., 1991).

La Galanina no sólo modifica las características funcionales del 5-HT1AR. En estudios realizados con la técnica de *hibridación in situ*, la administración de Galanina o agonistas de GALR1 es capaz de reducir la expresión del ARN mensajero del 5-HT1AR en el RD. Es interesante destacar que además en este mismo estudio la administración de FLX no modificaba la expresión del ARN mensajero del 5-HT1AR (Kuteeva et al., 2008b).

Estudios de microdiálisis también han revelado que en la interacción de la **Galanina con el 5-HT1AR** puede darse un antagonismo recíproco en el RD (Kuteeva et al., 2008). Esta relación antagónica se ha puesto de manifiesto en experimentos *in vitro* con células HEK-293 más recientemente. En estos experimentos se obtuvieron las primeras evidencias de la interacción física entre GALR1 y 5-HT1AR y además se ha visto que aunque ambos receptores se acoplan a la proteína Gi/0 existe un fenómeno de transinhibición alostérica por el cual no se produce un exceso de señalización celular (Borrito-Escuela et al., 2010).

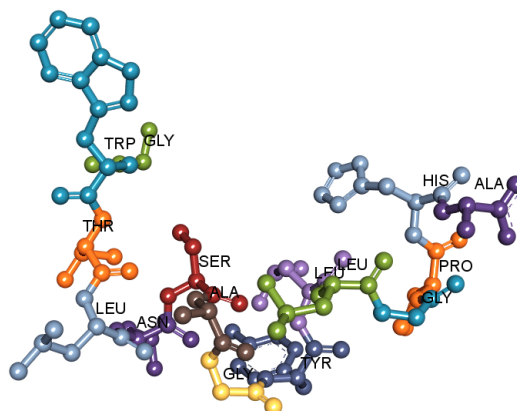
Esta capacidad de modulación mutua entre Galanina y serotonina también se manifiesta con la administración de ISRSs. La administración crónica de FLX es capaz de doblar los niveles de expresión del ARN mensajero de la Galanina e incrementar un 50% los lugares de unión de los receptores GALR2 en el RD y el LC, sin afectar a los niveles de GALR1. Esto puede producir un cambio de señalización de forma que predominen los efectos de GALR2 sobre los de GALR1 incrementándose la tasa de disparo neuronal en el RD. Así mismo, en ratas también tratadas crónicamente con FLX, la administración i.c.v. del antagonista M40 15 minutos antes del FST atenuó los efectos antidepresivos de la FLX en este test (Lu et al., 2005).

## 6.2- GAL(1-15)

Recientemente se han descubierto la presencia *in vivo* de fragmentos derivados de la Galanina en los intestinos de rata. Mediante cromatografía de alto rendimiento y espectrometría de masa se han encontrado los fragmentos peptídicos de la Galanina 1-13, 1-16, 1-20 y 6-20. Posteriores experimentos de autorradiografía en cortes de

tejido cerebral han mostrado la capacidad de desplazamiento que estos fragmentos tienen sobre la Galanina, excepto en el caso del fragmento 6-20 (Ihnatko and Theodorsson, 2017).

Pero sin duda uno de los fragmentos de Galanina más estudiado y que presenta actividad biológica es el fragmento N-terminal de la Galanina [GAL(1-15)], que constituye la secuencia común de aminoácidos entre las moléculas de Galanina de diferentes especies (Wiczek et al., 1995). Aunque el fragmento GAL(1-15) (figura 6) presenta menos afinidad por los tres receptores de Galanina que la molécula completa, experimentos realizados con el fragmento marcado con  $I^{125}$ , han revelado la presencia de sitios de unión con mucha mayor afinidad por el fragmento que por la Galanina. Estas regiones incluyen el neocortex, hipocampo dorsal, neocortado, hipotálamo y regiones del tronco encefálico como la parte dorsal del núcleo del tracto solitario (NTS) (Hedlund et al., 1992).



**Figura 6:** Representación esquemática en barras y esferas del fragmento GAL(1-15) generado mediante el software DiscoveryStudio a partir del archivo pdb: 1SMZ.

En experimentos realizados en nuestro grupo de investigación, hemos demostrado como el fragmento GAL(1-15) tiene un papel funcional diferente al de la molécula completa, tanto en la regulación del control cardiovascular (Diaz-Cabiale et al., 2005b, 2010) como en la regulación del estado de ánimo (Millón et al., 2015).

En la regulación e integración de la respuesta cardiovascular participan varios neurotransmisores y péptidos. En nuestros estudios hemos mostrado como la administración intracisternal de Galanina o GAL(1-15) provoca efectos distintos. La Galanina induce un aumento rápido y transitorio de la presión arterial seguido de un descenso prolongado de la misma, así como un aumento del ritmo cardiaco. Por el contrario, la GAL(1-15) produce un efecto vasopresor mantenido en el tiempo y también un aumento de la frecuencia cardiaca (Narváez et al., 1994). Siendo los efectos de GAL(1-15) y no los de la Galanina bloqueados por el antagonista M40 (Narváez et al., 2000). El análisis por inmunohistoquímica de la proteína c-Fos indica también que la administración de GAL(1-15) o Galanina inducen una expresión de c-Fos diferente tanto espacial como temporalmente en el NTS (Marcos et al., 2001).

Estudios posteriores profundizando en el mecanismo de acción de ambas moléculas en la integración de la respuesta cardiovascular en el NTS han mostrado que la Galanina ejerce efectos antagónicos sobre los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (Díaz-Cabiale et al., 2000) mientras que la GAL(1-15) parece tener un efecto facilitador de las acciones de Angiotensina II (Díaz-Cabiale et al., 2005a). Las diferencias funcionales entre GAL(1-15) y Galanina también se han observado en la interacción con diferentes subtipos de receptores del Neuropeptido Y (NPY) en el NTS, observándose que el fragmento y no el péptido completo es capaz de inducir efectos vasopresores mediante una interacción con el receptor Y2 del NPY (Díaz-Cabiale et al., 2010). Todos estos datos confirman un papel funcional del fragmento GAL(1-15) diferente tanto en efectos como en mecanismos al de la molécula de Galanina completa.

### **6.3- GAL(1-15) en la regulación de la ansiedad y el TDM**

Las diferencias funcionales entre la Galanina y el fragmento GAL(1-15) también se han observado en la regulación del estado de ánimo. En nuestro grupo de investigación hemos analizado las diferencias conductuales inducidas por la administración de Galanina y el fragmento GAL(1-15) en dos pruebas de

comportamiento relacionadas con la ansiedad y la depresión, el test del campo abierto (OF) y el FST.

En estos trabajos probamos varias dosis de GAL(1-15) y mostramos como la dosis de 3 nmol tiene un efecto ansiogénico en la prueba del OF, mientras que la Galanina no produce ningún efecto en esta prueba (Millón et al., 2015). Por otro lado, en el FST, la misma dosis de GAL(1-15), administrada por vía i.c.v., también induce efectos pro-depresivos con un incremento en el tiempo de inmovilidad mayor que el que produce una dosis equimolar de Galanina (Millón et al., 2015). Estos efectos se vieron bloqueados por el uso del antagonista específico de GALR2 M871 sugiriendo un papel fundamental del receptor GALR2 en el mecanismo de acción de GAL(1-15).

En estos trabajos desarrollamos también un modelo de rata knockdown, usando la tecnología de ARN interferente para reducir la expresión de GALR2 en el SNC. En este modelo de rata knockdown para GALR2 también se bloqueó el efecto de GAL(1-15) en las pruebas del OF y el FST, replicando los resultados obtenidos con el antagonista M871 y corroborando el papel de GALR2 en el mecanismo de acción de GAL(1-15). Además de GALR2, en nuestros trabajos se muestra que GALR1 también tiene un papel fundamental para la mediación de los efectos de GAL(1-15) tanto en el OF como en el FST (Millón et al., 2015).

En cuanto al mecanismo de acción de GAL(1-15), empleando la técnica del PLA (Ensayo de ligamiento por proximidad) en secciones de tejidos cerebral del rafe dorsal y del hipocampo dorsal observamos como los receptores GALR1 y GALR2 se encuentran a una proximidad suficiente para poder formar heterodímeros (Millón et al., 2015). Además, en cultivos celulares con la línea celular del rafe RN33B la administración tanto de Galanina como de GAL(1-15) reducen la inmunoreactividad por la serotonina, siendo esta reducción mayor con la GAL(1-15) (Millón et al., 2015). Estudios realizados en la línea celular HEK293T también han mostrado que GAL(1-15) induce efectos inhibitorios más potentes que la Galanina en los mecanismos de transducción de señal y que en la formación del heterodímero

GALR1-GALR2 prevalece la señalización de GALR1 sobre la de GALR2 (Millón et al., 2015; Borroto-Escuela et al., 2014).

Todos estos resultados confirman el papel funcional diferencial de GAL(1-15) respecto de la Galanina, mostrando que el fragmento GAL(1-15) tiene un efecto ansiogénico y pro-depresivo mayor que la Galanina. Por otra parte, también se ha confirmado que los mecanismos moleculares que median en estos efectos son diferentes, implicando la formación del heterodímero GALR1-GALR2 en la mediación de los efectos de GAL(1-15) (Millón et al., 2015).

Recientemente en nuestro grupo de investigación también hemos demostrado interacciones entre la **GAL(1-15)** y el **5-HT1AR**. En experimentos de comportamiento con ratas empleando el FST se observa como el fragmento GAL(1-15), administrado en dosis subumbrales (1nmol), produce una potenciación del efecto antidepresivo del agonista del 5-HT1AR 8-OH-DPAT, siendo esta potenciación mayor que la que produce la coadministración de 8-OH-DPAT y una dosis subumbral de Galanina (Millón et al., 2016).

Además, el fragmento GAL(1-15) a una dosis de 3nmol administrado por vía i.c.v. se ha visto que es capaz de modificar las características funcionales del 5-HT1AR en las regiones CA1 y GD del hipocampo, reduciendo la afinidad (incremento de  $K_d$ ) y aumentando la densidad de los 5-HT1AR ( $B_{max}$ ) a los 10 minutos después de la inyección, siendo estos efectos bloqueados por el antagonista de GALR2 M871. Estas modificaciones inducidas por GAL(1-15) se han mantenido hasta 2h después de la inyección y en el GD un incremento significativo de la  $B_{max}$  se mantiene hasta 5h después. En el RD, sin embargo, la GAL(1-15) no modifica la afinidad del 5-HT1AR pero si produce un descenso en el valor de  $B_{max}$  solo a las dos horas tras la administración (Millón et al., 2016).

GAL(1-15) también modifica los niveles de expresión del ARN mensajero de 5-HT1AR, incrementando los niveles en el GD y en el CA1 del hipocampo a las 2h



después de la administración i.c.v. de GAL(1-15) y por el contrario, en el RD produce un descenso de su expresión (Millón et al., 2016).

Estudios con la técnica del PLA indicaron también la proximidad entre los receptores GALR1-5-HT1AR y GALR2-5-HT1AR tanto en el hipocampo como en el RD. Además, en la línea celular del rafe RN33B la incubación con GAL(1-15) produce un descenso en la inmunoreactividad del 5-HT1AR y de la señal c-Fos más intensa que las que produce la Galanina (Millón et al., 2016).

Parece claro que tanto la Galanina como la GAL(1-15) interactúan con el 5-HT1AR serotoninérgico, pero en el caso de GAL(1-15) se ha visto que es capaz de potenciar de forma notable los efectos antidepresivos del agonista del 5-HT1AR y además es capaz de modificar la expresión del receptor así como sus características funcionales tanto en el RD como en el hipocampo, ambas regiones clave en el TDM y para la acción de los antidepresivos ISRSs como la FLX (Millón et al., 2016).

Dado que GAL(1-15) media sus acciones a través del heterodímero GALR1-GALR2, con la interacción GAL(1-15)-5-HT1AR hemos postulado la existencia de complejos heterotriméricos GALR1-GALR2-5-HT1AR en el RD y el hipocampo. Es interesante resaltar que la expresión y funcionalidad del 5-HT1AR se ve afectada de diferente manera por GAL(1-15) en ambas regiones. Esto puede explicarse por diferencias en las proteínas adaptadoras o subtipos de proteína G existentes entre ambas regiones que pueden afectar a las interacciones alostéricas de los tres receptores y a su vez, modificar la activación transcripcional o la funcionalidad de los receptores según la zona. En cualquier caso los efectos de GAL(1-15) sobre el 5-HT1AR pueden ser la base para el desarrollo de nuevas estrategias contra el TDM (Millón et al., 2016).

## 7- Modelización de Receptores

Como acabamos de ver, la formación de oligómeros entre los receptores galaninérgicos y serotoninérgicos tiene un papel importante en la regulación mutua

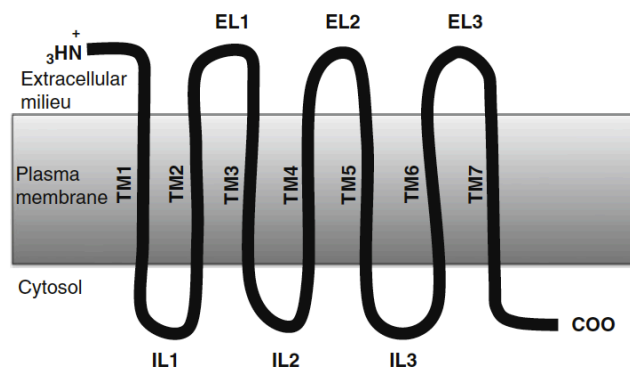
de las funciones biológicas de las respectivas moléculas (Borroto-Escuela et al., 2010; Millón et al., 2016). Además, el fragmento GAL(1-15) actúa a través de la formación del heterodímero GALR1-GALR2 (Fuxe et al., 2012; Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al., 2015). Dado que no se conoce la estructura completa de los receptores galaninérgicos implicados en la formación de estos complejos de receptores, la determinación estructural de los mismos por métodos computacionales puede ser de gran relevancia para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos (Pierce et al., 2002; Overington et al., 2006; Constanzi and Wang, 2014), así como para profundizar en los mecanismos moleculares que estén implicados en la formación del heterodímero GALR1-GALR2.

La caracterización estructural de los GPCRs, como los receptores galaninérgicos, ha sido un problema durante muchos años, aunque en la última década, y gracias a los avances en las técnicas de resolución de las estructuras tridimensionales como la difracción de los rayos-X o la resonancia magnética nuclear, la determinación estructural de proteínas miembros de la superfamilia de GPCRs se ha incrementado de forma exponencial (Constanzi and Wang, 2014). No obstante, la complejidad a la hora de poder determinar la estructura de GPCRs ha hecho que en el terreno de la modelización de proteínas por métodos computacionales se hayan realizado grandes esfuerzos para generar protocolos y algoritmos que ayuden a generar estructuras tridimensional de proteínas a partir de estructuras ya conocidas.

Hoy en día, la estructura de una proteína desconocida se puede generar a partir de proteínas con estructuras homólogas conocidas que sirven como plantillas. Esto se debe a que en proteínas homólogas, la estructura está más conservada que la secuencia. Así, en general, las proteínas homólogas con una identidad de secuencia superior al 35% tienen una estructura tridimensional similar. En el caso de los GPCRs, debido a su estructura común, con identidades de secuencias del 20% o menos, existe una fuerte conservación estructural (Gonzalez et al., 2014).

La superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) son proteínas integrales de membrana constituidas por una sola cadena de aminoácidos que

comparten una estructura común, con 7 dominios transmembrana (TM1-TM7) en conformación hélice  $\alpha$ , interconectados entre sí por 3 bucles intracelulares (IL) y 3 bucles extracelulares (EL). El extremo N-terminal se dispone hacia el exterior celular y el extremo C-terminal hacia el citosol. En muchos casos el extremo C-terminal adopta una conformación de  $\alpha$ -hélice, conocida como hélice 8, paralela a la membrana plasmática por su naturaleza hidrófoba y que parece tener un papel fundamental en la actividad de los receptores (figura 7) (Huynh et al., 2009; Contanzi and Wang, 2014; Sensoy et al., 2014).

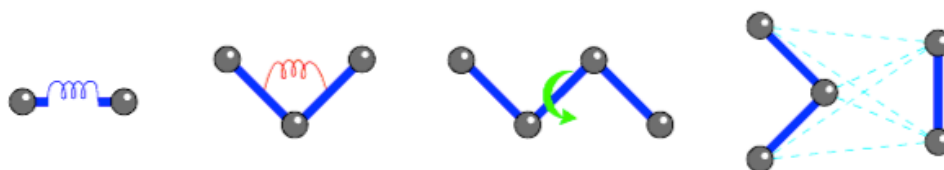


**Figura 7:** Representación bidimensional esquemática de la estructura común de los GPCRs (Contanzi and Wang, 2014).

Además de poder determinar la estructura de un determinado GPCR por métodos computacionales, se pueden predecir los comportamientos dinámicos de estas proteínas en varias situaciones por medio de simulaciones dinámicas moleculares (SDM) generadas por ordenador. Con las SDM se puede analizar el mecanismo molecular y los aminoácidos implicados durante la formación de un complejo heterodimérico o en la interacción de un ligando con su receptor (Hui et al., 2016; Filizola et al., 2006; Simpson et al., 2010; Johnston et al., 2012; Gorinski et al., 2012).

La hipótesis que subyace a la generación de modelos de homología y las SDM es que el comportamiento dinámico de los modelos informatizados puede describirse en términos de los principios físicos básicos que rigen las interacciones y movimientos

de sus constituyentes atómicos elementales (Brooks et al., 2009). La relación entre estructura y energía es un elemento esencial de muchos estudios computacionales basados en modelos atómicos detallados. Para calcular la energía potencial de un sistema a partir del conjunto de coordenadas atómicas correspondientes a la estructura o conformación, se utiliza una función de energía potencial conocida como campo de fuerzas o “force field” (figura 8). En esta función se incluyen las energías necesarias para estirar el enlace entre dos átomos, la energía necesaria para doblar el ángulo entre dos átomos enlazados, la energía de torsión para la rotación alrededor de un enlace, la energía electrostática (interacciones entre átomos debidas a la distribución de los electrones) y la energía Van der Waals (Brooks et al., 2009). De esta forma el campo de fuerzas parametriza las diferentes características de cada átomo, así como el conjunto de fuerzas que incide sobre él y que forman parte de un determinado sistema. Este sistema puede estar compuesto por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos o una combinación de diferentes macromoléculas, por ejemplo, GPCRs embebidos en membranas. El campo de fuerzas es la función que ha permitido el desarrollo programas como CHARMM (“Chemistry at HARvard Molecular Mechanics”) que incluye múltiples herramientas entre las que se incluyen la generación de SMD, realizar minimizaciones moleculares o construir de modelos de homología. (Eswar et al., 2007).



**Figura 8:** Representación esquemática de las diferentes fuerzas que pueden aparecer entre dos átomos dentro de un modelo computacional de macromoléculas. Todas estas fuerzas se incluyen en la función de energía potencial que determinará el movimiento de los átomos. De izquierda a derecha: fuerza para estirar enlaces covalentes, para doblar el ángulo del enlace entre dos átomos, para la rotación de enlaces, e interacciones entre átomos no enlazados (interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals). Adaptado de Brooks et al., 2009.

Las SDM se utilizan para evaluar las propiedades estructurales, termodinámicas y dinámicas de los sistemas biomoleculares. Dichas simulaciones requieren la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton, que determinan las

coordenadas de cada átomo de un sistema en función del tiempo (Brooks et al., 2009).

La minimización es un protocolo iterativo, que busca el mínimo de una función energética potencial determinada. Cuando se realiza un modelo de homología o se construye un sistema con varias macromoléculas distintas, al aplicar el campo de fuerzas se generan tensiones conformacionales e interacciones derivadas de estas construcciones que hacen que el sistema tenga una alta energía potencial. En el proceso de minimización, se realizan varios ciclos en los que se recalculan las posiciones atómicas de forma que se minimiza esta función de energía. De forma que a lo largo del tiempo se busca llegar al mínimo de energía que establece la función del campo de fuerzas en cada ciclo hasta encontrar la configuración más estable (Brooks et al., 2003).

A día de hoy existen modelos de homología con la estructura de los receptores GALR1 y GALR2 desarrollados para analizar la interacción entre distintos ligandos con dichos receptores, pero estos modelos no incluyen los aminoácidos de los extremos N y C-terminales (Hui et al., 2016; Jurkowski et al., 2013). Varios trabajos computacionales sobre la interacción entre los GPCRs apuntan al posible papel del extremo C-terminal en dicha interacción (Filizola et al., 2006; Simpson et al., 2010; Gorinski et al., 2012; Johnson et al., 2012). Dado que el extremo C-terminal está implicado en los mecanismos de señalización intracelular (Sensoy et al., 2014) y que en la formación del heterodímero GALR1-GALR2 se producen cambios en las vías de señalización intracelular (Millón et al., 2015; Borroto-Escuela et al., 2014), consideramos fundamental generar modelos de homología con la secuencia íntegra de los receptores GALR1 y GALR2 para poder estudiar el posible papel de los extremos N y C-terminales en la formación del heterodímero además de los dominios TM.



# OBJETIVOS





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Como se ha descrito previamente, la GAL muestra efectos ansiogénicos o ansiolíticos en distintos test de comportamiento dependiendo del lugar de administración y del estado de estrés previo del animal (Bing et al. 1993; Möller et al. 1999; Khoshbouei et al 2002; Barrera et al. 2006). En relación con sus efectos en la depresión, la GAL induce un efecto pro-depresivo en el test de natación forzada en roedores (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2008) que esta mediado por los receptores GALR1 y GALR3 (Swanson et al 2005; Kuteeva et al 2008b), mientras que la activación del receptor GALR2 induce efectos antidepresivos en este mismo test (Kuteeva et al. 2008b). Además, la GAL interacciona con la serotonina a nivel de comportamiento y a nivel de receptor produciendo una inhibición de los receptores 5-HT1A (Fuxe et al. 1988; Fuxe et al. 1990; Razani et al., 2000; Kuteeva et al., 2008; Borroto-Escuela et al., 2010).

No sólo la GAL sino también su fragmento N-terminal, GAL(1-15), desempeña un papel relevante en numerosas funciones cerebrales con efectos diferentes a los de la molécula completa e implicando, además, mecanismos de acción diferentes (Hedlund et al., 1992; Diaz-Cabiale et al., 1998; Diaz-Cabiale et al., 2005; Diaz-Cabiale et al., 2010; Ihnatko et al., 2017). En este sentido, en trabajos recientes de nuestro grupo de investigación, hemos descrito como la administración central del fragmento GAL(1-15) en ratas produce efectos pro-depresivos y ansiogénicos más potentes que los que produce la molécula completa (Millón et al., 2015). Además, hemos demostrado que el mecanismo de acción por el que actúa el fragmento GAL(1-15) depende de los receptores GALR1 y GALR2 que participan en la formación de un complejo heterodimérico GALR1-GALR2 (Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al., 2015). Sin embargo, se hace necesario profundizar en el papel del fragmento GAL(1-15) en la ansiedad y la depresión y en la formación del heterodímero GALR1-GALR2 como mecanismo de acción del fragmento.

Recientemente también hemos visto como GAL(1-15) interacciona con el sistema serotoninérgico, potenciando los efectos antidepresivos del agonista del receptor 5-HT1A 8-OH-DPAT de forma más intensa que como lo hace la GAL. El fragmento GAL(1-15) es capaz de modificar también la afinidad y expresión del receptor 5-

HT1A tanto en el núcleo dorsal del rafe como en el hipocampo, ambas regiones implicadas en la conducta depresiva. En estos trabajos postulamos además que el mecanismo de acción por el cual GAL(1-15) interacciona con el receptor 5-HT1A implica la formación de complejos de receptores GALR1-GALR2-5-HT1AR (Millón et al., 2016).

El receptor 5-HT1A es de uno de los receptores serotoninérgicos más estudiados en el relación con el trastorno depresivo mayor (Nautiyal and Hen, 2017) y es un receptor fundamental en la mediación de los efectos antidepresivos de los ISRS como la fluoxetina, tanto en su disposición como autorreceptor en el núcleo dorsal del rafe como en el hipocampo donde se localiza postsinápticamente (Estadacamarena et al., 2006; Kobayashi et al., 2008; Castro et al., 2008; Iruela et al., 2009; Bonet de Luna et al., 2011; Descarries et al., 2012; Samuels et al., 2015; Pytka et al., 2015; Ferrés-Coy et al., 2016). La terapia con ISRS presenta una efectividad limitada y en torno al 30% de pacientes presentan lo que se denomina depresión resistente al tratamiento (Fava and Davidsson, 1996; Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015). Una de las estrategias farmacológicas desarrolladas para evitar esta alta proporción de resistencia a los ISRS lo constituyen la terapias de aumentación que consisten en la administración de otras sustancias o compuestos con algún ISRS, siendo la fluoxetina uno de los fármacos de primera elección (Artigas et al., 1994; 1996; Shali et al., 2016; Nautiyal and Hen, 2017). Por tanto, las interacciones descritas entre GAL(1-15) y el receptor 5-HT1A podrían suponer la base para un tratamiento combinado entre GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina.

Basándonos en estos resultados previos, en esta tesis doctoral proponemos abordar dos **Objetivos generales**:

1- Profundizar en el papel del fragmento GAL(1-15) en la ansiedad y la depresión y desarrollar modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2 para poder estudiar la dinámica de formación de los heterodímeros GALR1-GALR2 por medios computacionales como diana molecular del fragmento GAL(1-15).

2- Estudiar los efectos de la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina en pruebas de conducta relacionadas con la depresión, analizando el papel de los receptores galaninérgicos GALR1 y GALR2 y el receptor serotoninérgico 5-HT1A en dicha interacción.

Para ello, esta tesis doctoral ha sido organizada en tres bloques experimentales independientes, cada uno de ellos con sus respectivos **objetivos específicos**, como se detalla a continuación:

**Papel del fragmento GAL(1-15) en ansiedad y depresión. Desarrollo de modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2.**

1- Estudiar los efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) en pruebas conductuales de ansiedad y depresión.

2- Desarrollar modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2 implicados en el mecanismo de acción de GAL(1-15) mediante métodos computacionales.

**Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores GALR1 y GALR2.**

1. Estudiar la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina en una prueba de comportamiento animal de depresión y determinar si esta interacción es exclusiva del fragmento o se da también con la GAL.

2. Evaluar el papel de los receptores GALR2 en la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina en una prueba de comportamiento animal de depresión, empleando el antagonista específico M871 y un modelo de silenciamiento génico para este receptor (siGalR2).

3. Evaluar el papel de los receptores GALR1 en la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina en una prueba de comportamiento animal de depresión, empleando un modelo de silenciamiento génico para este receptor (siGalR1).

**Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT1A.**

1. Evaluar el papel de los receptores 5-HT1A en la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina en un modelo animal de depresión, empleando el antagonista específico Way100635.

2. Estudiar el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y fluoxetina sobre las características funcionales y la expresión del ARNm del receptor serotoninérgico 5-HT1A en el núcleo del rafe dorsal y del hipocampo dorsal mediante experimentos de autorradiografía e *hibridación in situ*.

# MATERIAL Y MÉTODOS





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **Diseño y grupos experimentales**

En este apartado describimos, de forma simplificada, los experimentos diseñados para la consecución de los objetivos detallados anteriormente en la presente tesis. Los protocolos experimentales, así como los fundamentos de las pruebas conductuales empleadas en los distintos experimentos se desarrollan en posteriores apartados.

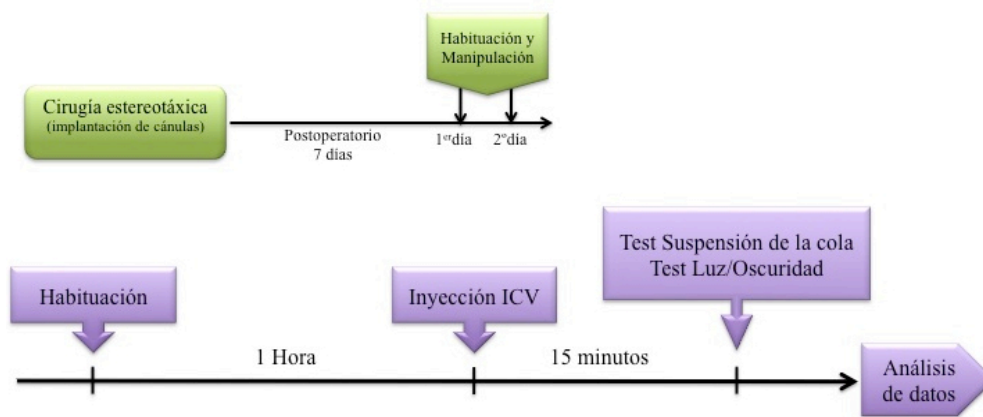
### **1- Papel del fragmento GAL(1-15) en ansiedad y depresión. Desarrollo de modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2.**

#### **1.1- Estudio de los efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) en pruebas conductuales de ansiedad y depresión.**

Para estudiar los efectos pro-depresivos y ansiogénicos de GAL(1-15) realizamos dos experimentos con grupos de animales independientes. Los procedimientos experimentales seguidos para la realización de ambos experimentos se representan esquemáticamente en la figura 1. De forma resumida, a todos los animales se les implantó una cánula fija en el ventrículo lateral derecho mediante cirugía estereotáxica para poder administrar por vía intracerebroventricular (i.c.v.) el fragmento GAL(1-15) o el líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). Tras una semana de postoperatorio, durante dos días los animales se habituaron a las condiciones de la sala de comportamiento así como a su manipulación por parte del investigador antes de iniciar los estudios comportamentales.

El día en el que se desarrollaron los experimentos, los animales se habituaron durante una hora a las condiciones ambientales de la sala experimental. Los animales se asignaron de forma aleatoria a los grupos experimentales descritos en las tabas 1 y 2 para cada experimento. De forma individual cada animal fue inyectado vía i.c.v. con GAL(1-15) a una dosis de 3nmol o LCRa en el caso de los animales control y

15 minutos (min) después realizaron el test de suspensión de la cola o el test de luz/oscuridad (figura 1).



**Figura 1:** Esquema de los procedimientos realizados en el experimento para estudiar el efecto de GAL(1-15) en el test de suspensión de la cola y del test luz/oscuridad.

En el primer experimento empleamos el test de suspensión de la cola (Steru et al., 1985), prueba ampliamente utilizada para evaluar la conducta depresiva en roedores. Para estudiar el efecto ansiogénico de GAL(1-15), realizamos un segundo experimento empleando el test de luz/oscuridad (Crawley and Goodwin, 1980), que es una de las pruebas más frecuentemente empleadas en modelos animales de ansiedad incondicionada.

Tabla 1: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para realizar el test de suspensión de la cola		
Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
Controles	LCRa (i.c.v.)	8
GAL(1-15)(3nmol)	GAL(1-15)(3nmol) (i.c.v.)	6

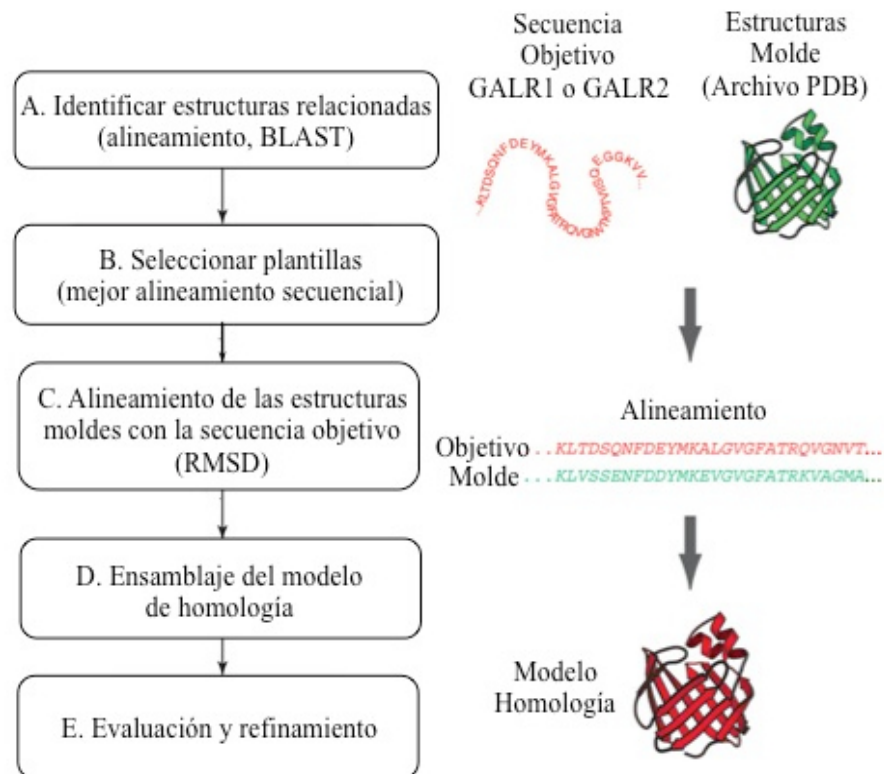
Tabla 2: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para realizar del test de Luz/Oscuridad		
Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
Controles	LCRa (i.c.v.)	5
GAL(1-15)(3nmol)	GAL(1-15)(3nmol) (i.c.v.)	6



## 1.2- Desarrollo de modelos de homología de GALR1 y GALR2

Para profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la formación del heterodímero GALR1-GALR2, necesario para la acción de GAL(1-15), desarrollamos modelos de homología para los receptores GALR1 y GALR2, empleando el software DiscoveryStudio (Accelrys, San Diego, EEUU) instalado en una estación de trabajo Dell precisión T5500. El software DiscoveryStudio incluye todas las herramientas y programas necesarios para generar los modelos de homología (BLAST, MODELLER, CHARMm).

La mayoría de métodos para realizar modelos de homología de proteínas incluyen 5 pasos secuenciales (Eswar et al., 2007) (Fiser, 2010): A- Búsqueda de proteínas con estructuras 3D conocidas relacionadas con la secuencia diana (alineamiento). B- Selección de las estructuras que se utilizarán como plantillas C- Alineamiento de las estructuras molde con la secuencia objetivo. D- Ensamblaje del modelo de homología. E- Evaluación del modelo y refinamiento.



**Figura 2:** Esquema de los procedimientos seguidos para obtener los modelos de homología de GALR1 y GALR2. Modificado de Eswar et al., 2007.

A) Búsqueda de secuencias por alineamiento:

Primero obtuvimos la secuencia de aminoácidos de los receptores GALR1 (Q62805) y GALR2 (O08726) en formato FASTA en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>). A partir de estos archivos el software realizó múltiples alineamientos con las secuencias de proteínas disponibles en la base de datos “protein data bank” (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), donde se almacenan todas las proteínas con estructura tridimensional conocida, incluidos los GPCRs. Este alineamiento se realizó mediante un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990; 1997).

B) Selección de plantillas:

Una vez obtenido el listado de proteínas que se alinearon con la secuencia de nuestra proteína objetivo, seleccionamos las más adecuadas para la fase de modelización. Esta selección se realizó considerando un índice “bit score” en el alineamiento mayor de 60 y además que dicho alineamiento tenga lugar a lo largo de toda la secuencia molde de aminoácidos para los receptores GALR1 y GALR2. “Bit score” es un parámetro normalizado que indica un mejor alineamiento cuanto mayor sea.

C) Alineamiento de las estructuras moldes con la secuencia objetivo:

Una vez seleccionadas las proteínas molde que empleamos para crear los modelos de homología, usamos la herramienta “alineamos secuencias a la plantilla” del software DiscoveryStudio. Con esta herramienta se prepararon a las proteínas molde seleccionadas del paso anterior como plantillas para construir los modelos de homología a partir de la secuencia objetivo, en este caso la de GALR1 o GALR2. Para ello empleamos el algoritmo de alineación de estructuras de MODELER (Esward et al., 2007), de forma que las diferentes plantillas se alinearon en función de una similitud estructural, y después se alineó la secuencia objetivo, GALR1 o GALR2, con el perfil estructural obtenido utilizando el programa Align123 (Thompson et al., 1994).

La alineación estructural realizada por MODELLER implicó la superimposición de las diferentes estructuras tridimensionales de las proteínas que se usaron como

plantilla. MODELLER mide la similitud entre las coordenadas atómicas superpuestas como la desviación cuadrática media de la raíz (RMSD) (Kufareva and Abagyan, 2012) que esencialmente es una medida de la distancia media entre los átomos que ocupan una misma posición.

D) Ensamblaje de los modelos de homología:

El siguiente paso consistió en la construcción en sí de los modelos de homología de GALR1 y GALR2. Usando de nuevo MODELLER, DiscoveryStudio generó hasta 20 modelos diferentes a partir de las plantillas superimpuesta en el paso “alineación de secuencias a la plantilla” descrito anteriormente.

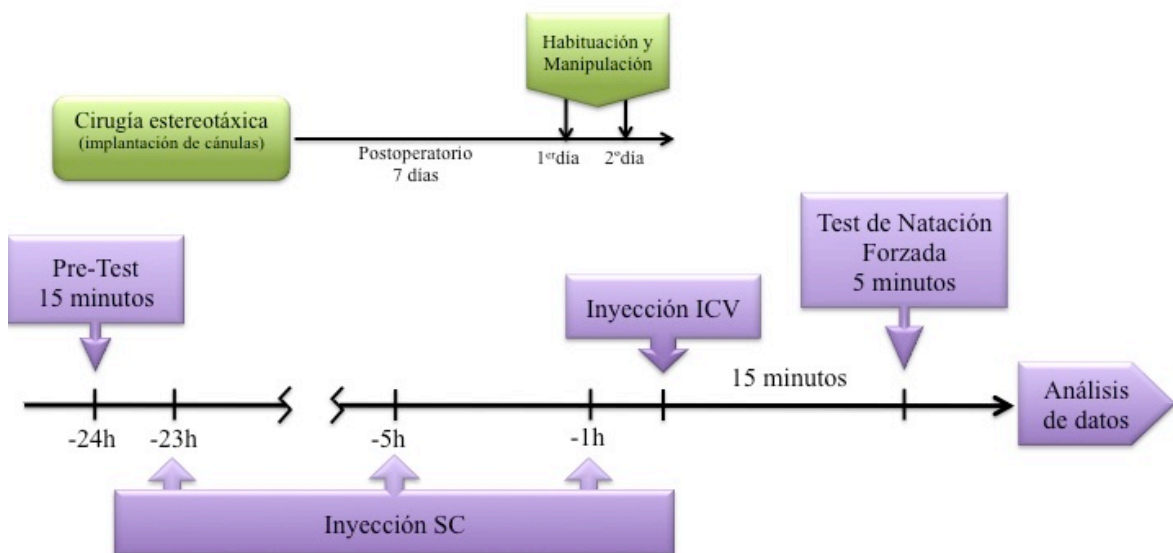
E) Evaluación del modelo y refinamiento:

Una vez generados los diferentes modelos de homología, usamos otra herramienta del software, “Verify protein”, para calcular el parámetro DOPE (Energía discreta optimizada de la proteína) de cada modelo generado. Los valores más bajos de este parámetro nos indicaron cuál fue el mejor modelo generado. DOPE es un parámetro que se basa en el estudio de perfiles energéticos que adoptan las proteínas con estructura conocida, de forma que, bajo la premisa de que las proteínas en su estado nativo adoptan las conformaciones de mínima energía, se puede establecer una función que indica cuán lejos está una estructura modelizada de su mínimo energético (Shen and Sali, 2006), siendo el modelo con valor más bajo de DOPE el que indica una conformación energéticamente más óptima.

## 2- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores GALR1 y GALR2.

### 2.1- Estudiar la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST y determinar si esta interacción es exclusiva del fragmento o se da también con la GAL.

Para evaluar la interacción entre GAL(1-15) y FLX a nivel de comportamiento empleamos el test de natación forzada (FST) (Porsolt et al., 1977) que es uno de los test de referencia para evaluar los efectos clínicos de sustancias antidepresivas (Bogdanova et al., 2013). Realizamos 3 experimentos diferentes. En todos ellos, a los animales se les implantó una cánula fija en el ventrículo lateral y tras una semana de postoperatorio, los animales se habituaron a las condiciones de la sala y a la manipulación por parte del investigador. El esquema general de los procedimientos seguidos para realizar estos experimentos se representa en la figura 3 y los grupos experimentales con los tratamientos farmacológicos para cada experimento se detallan en las tablas 3, 4 y 5.



**Figura 3:** Esquema de los procedimientos realizados en los experimentos para evaluar la interacción GAL(1-15)-FLX en el FST.

Primero realizamos un experimento para determinar las dosis subumbrales y efectiva de FLX. La FLX se administró por vía subcutánea (s.c.) con un patrón de inyección subcrónico entre las fases de pre-test y test del FST, administrando a cada animal tres inyecciones a 23, 5 y 1 hora antes del test (Detke et al., 1997; Estrada-Camarena et al., 2003).

<b>Tabla 3: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para determinar la dosis efectiva y subumbral de FLX en el FST</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nº animales (n experimental)</b>
<b>Controles</b>	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
<b>FLX(2,5mg/Kg)</b>	LCRa (i.c.v.)+ FLX 2,5mg/Kg (s.c.)	6
<b>FLX(10mg/Kg)</b>	LCRa (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	8

En el segundo experimento, para evaluar la interacción entre GAL(1-15) y FLX, coadministramos una dosis subumbral de FLX(2,5mg/Kg) determinada en el experimento anterior junto con una dosis subumbral de GAL(1-15)(1nmol), determinada en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015). La FLX se administró siguiendo el procedimiento previamente descrito y la GAL(1-15) se administró vía i.c.v. 15min antes de la prueba.

<b>Tabla 4: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para estudiar la interacción GAL(1-15)-FLX con dosis subumbrales en el FST.</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nº animales (n experimental)</b>
<b>Controles</b>	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
<b>GAL(1-15)(1nmol)</b>	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	8
<b>FLX(2,5mg/Kg)</b>	LCRa (i.c.v.)+ FLX 2,5mg/Kg (s.c.)	7
<b>FLX(2,5mg/Kg) + GAL(1-15)(1nmol)</b>	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ FLX 2,5mg/Kg (s.c.)	8

En el tercer experimento estudiamos si la dosis subumbral de GAL(1-15) era capaz de modular una dosis efectiva de FLX. Además, analizamos si la molécula completa de Galanina podía modular también los efectos de la FLX. Para ello, comparamos los efectos de coadministrar GAL(1-15) con una dosis efectiva de FLX(10mg/Kg) con los efectos de coadministrar la Galanina completa con una dosis efectiva de FLX(10mg/Kg). La FLX se administró como en el primer experimento con un patrón subcrónico y la GAL(1-15) o Galanina se administraron 15min antes de la prueba por vía i.c.v. a una dosis de 1nmol.

**Tabla 5: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para estudiar la interacción GAL(1-15)-FLX con dosis efectivas de FLX en el FST y comparativa con los efectos de la coadministración con Galanina y FLX.**

<b>Grupos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nº animales (n experimental)</b>
<b>Controles</b>	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
<b>FLX(10mg/Kg)</b>	LCRa (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	7
<b>FLX(10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)</b>	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	8
<b>FLX(10mg/Kg) + Galanina(1nmol)</b>	Galanina(1nmol) (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	8

**2.2- Evaluar el papel de los receptores GALR2 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico M871 y un modelo de silenciamiento génico siGalR2.**

Para estudiar el papel de los receptores GALR2 en la interacción GAL(1-15)-FLX en el FST realizamos dos experimentos diferentes. En el primero empleamos el antagonista específico de GALR2 M871 y en el segundo usamos un modelo de silenciamiento génico generado en nuestro laboratorio de ratas knockdown GALR2 (Millón et al., 2015).

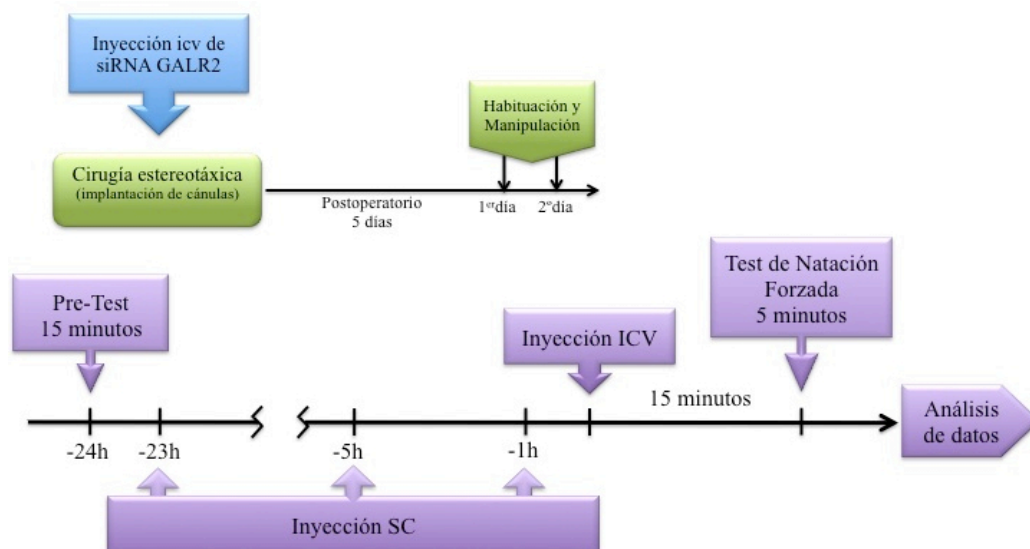
Para determinar el papel del receptor GALR2 usando el antagonista M871 en la interacción entre GAL(1-15)-FLX en el FST, realizamos los mismos procedimientos que en los experimentos anteriormente descritos empleando el FST (figura 3). A todos los animales se les implantó una cánula fija mediante cirugía estereotáxica en el ventrículo lateral y tras una semana de postoperatorio y dos días de habituación y manipulación se les administraron los diferentes tratamientos farmacológicos especificados en la tabla 6. La FLX(10mg/Kg) o el Veh. se administraron por vía s.c. con un patrón subcrónico, mientras que el LCRA, el GAL(1-15) y/o el M871 se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test.

**Tabla 6: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para estudiar el papel del receptor GALR2 usando el antagonista M871 en la interacción entre GAL(1-15)-FLX en el FST.**

<b>Grupos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nº animales (n experimental)</b>
<b>Controles</b>	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
<b>FLX(10mg/Kg)</b>	LCRa (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	8
<b>FLX(10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)</b>	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	8
<b>FLX(10mg/Kg)+[GAL(1- 15)(1nmol)+M871(3nmol)]</b>	[GAL(1-15)(1nmol)+M871(3nmol)](i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	7
<b>M871(3nmol)</b>	M871(3nmol)(i.c.v.)+ Veh.(s.c.)	7

Para generar el modelo siGalR2, empleamos la tecnología del ARN interferente. Por medio de una única inyección i.c.v. de un reactivo comercial, Acell siRNA (Dharmacon, Lafayette, EEUU), conseguimos reducir los niveles de ARN mensajero y la inmunoreactividad del receptor GALR2 a los 8 días después de la inyección hasta en un 40% (Nakajima et al., 2012; Millón et al., 2015). Este reactivo está formado por 4 oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana, en este caso el ARN mensajero de GALR2, modificados químicamente para poder incluirse específicamente en neuronas sin ser degradados (Baskin et al., 2008; Nakajima et al., 2012).

Para determinar el papel de GALR2 en la interacción GAL(1-15)-FLX empleando el modelo siGalR2, a todos los animales se les inyectó por vía i.c.v. el día de la implantación de la cánula fija 5µl de reactivo comercial Acell siRNA diseñado para interferir con el ARN mensajero de GALR2. El tiempo de postoperatorio junto con los días de habituación y manipulación fue el previamente determinado para hacer coincidir los días de mínima expresión del receptor GALR2 con la prueba del FST (figura 4).



**Figura 4:** Esquema de los procedimientos seguidos para realizar el experimento con animales siGalR2 en el test de natación forzada.





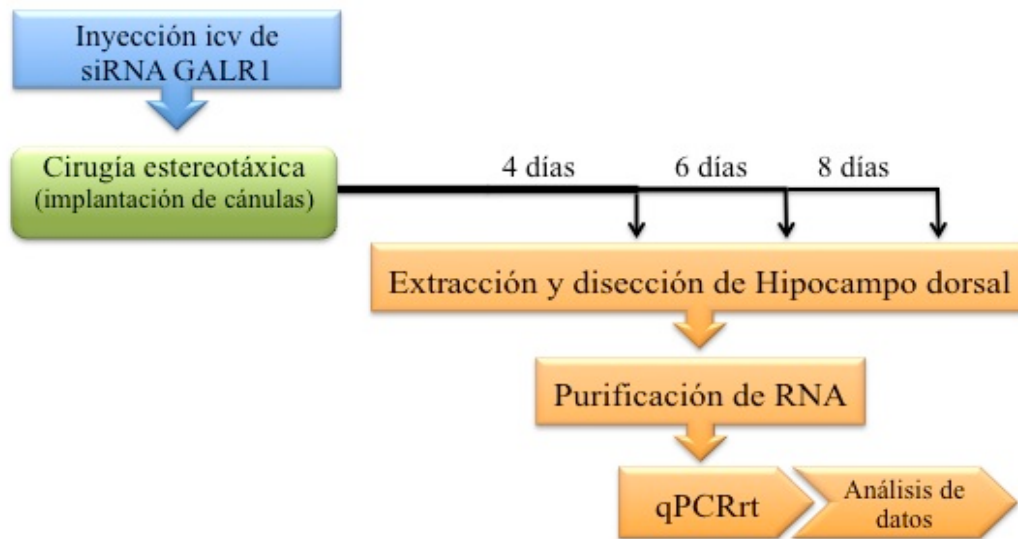
En este experimento empleamos 3 grupos experimentales (tabla 7). La FLX(10mg/Kg) o el Veh. se administraron por vía s.c. con un patrón de inyección subcrónico, mientras que el LCRA o el GAL(1-15) se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test.

<b>Tabla 7: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales siGalR2 empleados para estudiar el papel del receptor GALR2 en la interacción entre GAL(1-15)-FLX en el FST.</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nº animales (n experimental)</b>
<b>siGalR2-Controles</b>	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
<b>siGalR2-FLX(10mg/Kg)</b>	LCRa (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	6
<b>siGalR2-FLX(10mg/Kg) +GAL(1-15)(1nmol)</b>	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	8

### **2.3- Evaluar el papel de los receptores GALR1 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando un modelo de silenciamiento génico siGalR1.**

Para poder determinar el papel del receptor GALR1 y dado que no se conocen antagonistas específicos de este receptor, primero generamos el modelo de rata siGalR1 con un procedimiento equivalente al realizado para desarrollar el modelo siGalR2 (Millón et al., 2015). Para ello, efectuamos una serie de experimentos diseñados para determinar la reducción de los niveles de expresión de GALR1 empleando las técnicas de qPCR-rt e inmunohistoquímica. Los protocolos experimentales seguidos para la consecución de estos experimentos se detallan más adelante en los correspondientes apartados de esta tesis.

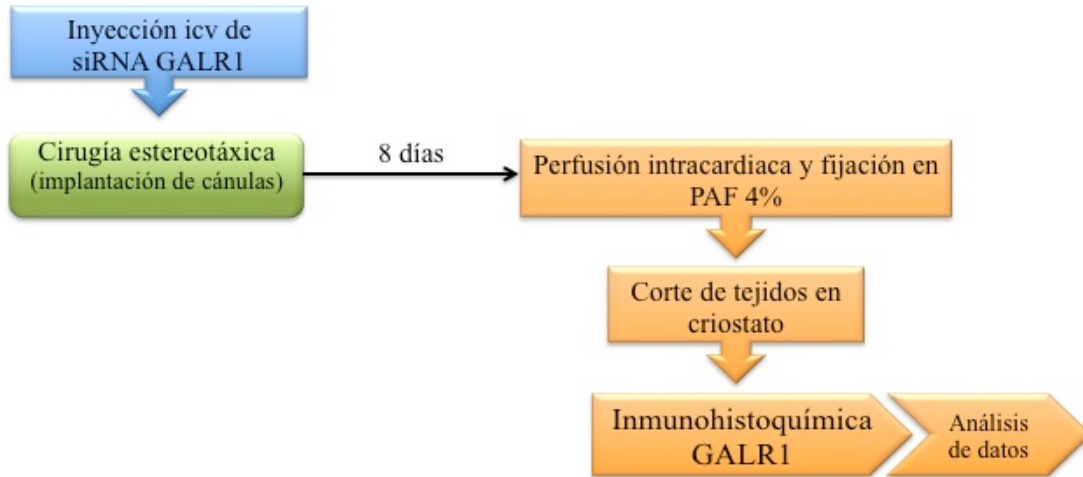
Primero, determinamos el día de máxima reducción de los niveles de ARN mensajero por medio de la técnica de qPCR-rt. Para ello, realizamos una curva temporal de expresión del ARN mensajero de GALR1 a los 4, 6 y 8 días tras la inyección i.c.v. del reactivo Acell siRNA para GALR1 (siRNA-GALR1) (figura 5, tabla 8).



**Figura 5:** Esquema de los procedimientos seguidos para determinar el día de mínima expresión del ARN mensajero de GALR1 por medio de la técnica de qPCR-rt.

Tabla 8: Grupos de animales empleados para estudiar la reducción de la expresión del ARN mensajero los días 4, 6 y 8 tras la inyección del siRNA-GALR1.		
Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
Controles	Veh. (i.c.v.)	4
siGalR1 Día 2	siRNA-GALR1 (5µg) (i.c.v.)	4
siGalR1 Día 4	siRNA-GALR1 (5µg) (i.c.v.)	4
siGalR1 Día 8	siRNA-GALR1 (5µg) (i.c.v.)	4

Una vez determinado el día de mínima expresión del ARN mensajero de GALR1, determinamos el grado de reducción del receptor GALR1 mediante inmunohistoquímica comparando animales que fueron inyectados i.c.v. con siRNA-GALR1 con animales inyectados con el Veh. (figura 6, tabla 9).

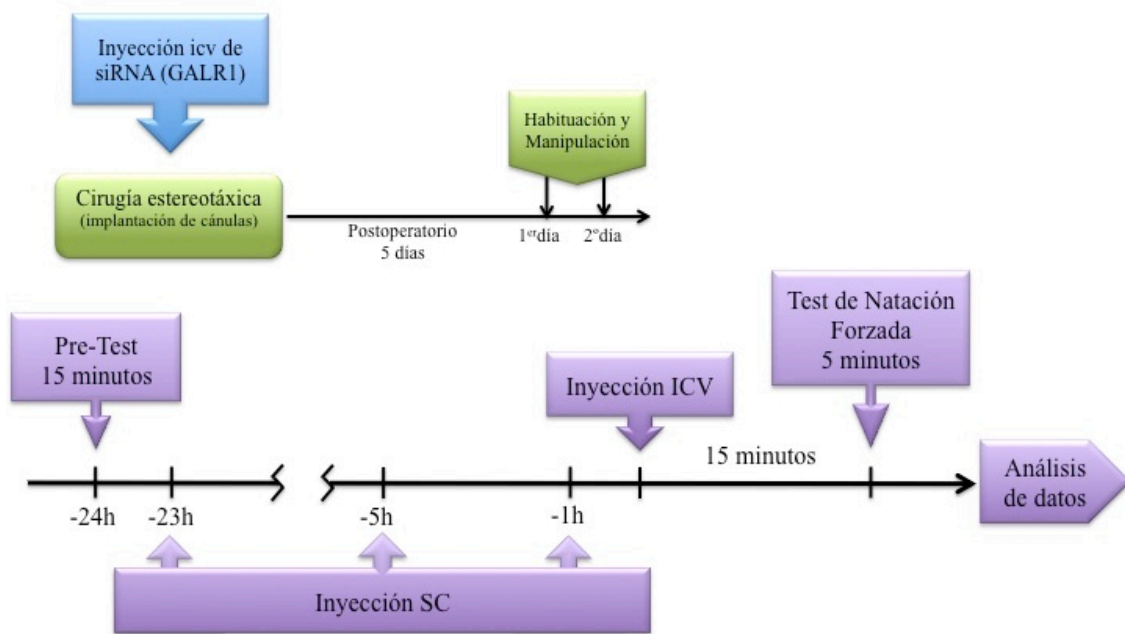


**Figura 6:** Esquema de los procedimientos seguidos para determinar el día de mínima expresión del receptor GALR1 por medio de técnica inmunohistoquímica.

**Tabla 9: Grupos de animales empleados para estudiar la reducción del receptor GALR1 mediante técnica inmunohistoquímica.**

Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
Controles	Veh. (i.c.v.)	4
siGalR1	siRNA-GALR1 (5µg) (i.c.v.)	4

Una vez desarrollado el modelo siGalR1 pudimos determinar el papel de GALR1 en la interacción GAL(1-15)-FLX en el FST. Para ello a todos los animales se les inyectó por vía i.c.v., el día de la implantación de la cánula fija, 5µl de reactivo comercial siRNA-GALR1. El tiempo de postoperatorio junto con los días de habituación y manipulación fue el adecuado para hacer coincidir los días de mínima expresión del receptor GALR1 con la prueba del FST (figura 7).



**Figura 7:** Esquema de los procedimientos seguidos para realizar el experimento con animales siGalR1 en el FST.

En este experimento empleamos 4 grupos experimentales (tabla 10). La FLX(10mg/Kg) o el Veh. se administraron por vía s.c. con un patrón de inyección subcrónico, mientras que el LCRA o el GAL(1-15) se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test.

**Tabla 10: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales siGalR1 empleados para estudiar el papel del receptor GALR1 en la interacción GAL(1-15)-FLX en el FST.**

Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
siGalR1-Controles	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
siGalR1-FLX(10mg)	LCRa (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	10
siGalR1-FLX(10mg) +GAL(1-15)(1nmol)	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	7

### **3- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel del receptor serotoninérgico 5-HT1A.**

Para determinar la implicación del 5-HT1AR realizamos dos bloques experimentales. En el primer bloque, diseñamos un experimento para estudiar el papel de este receptor a nivel de comportamiento empleando el antagonista específico del 5-HT1AR Way100635. En el segundo bloque experimental, determinamos si la coadministración de GAL(1-15)-FLX modificaba las características funcionales del 5-HT1AR mediante un experimento de autorradiografía, y los niveles de expresión de su ARN mensajero mediante un experimento de *hibridación in situ*.

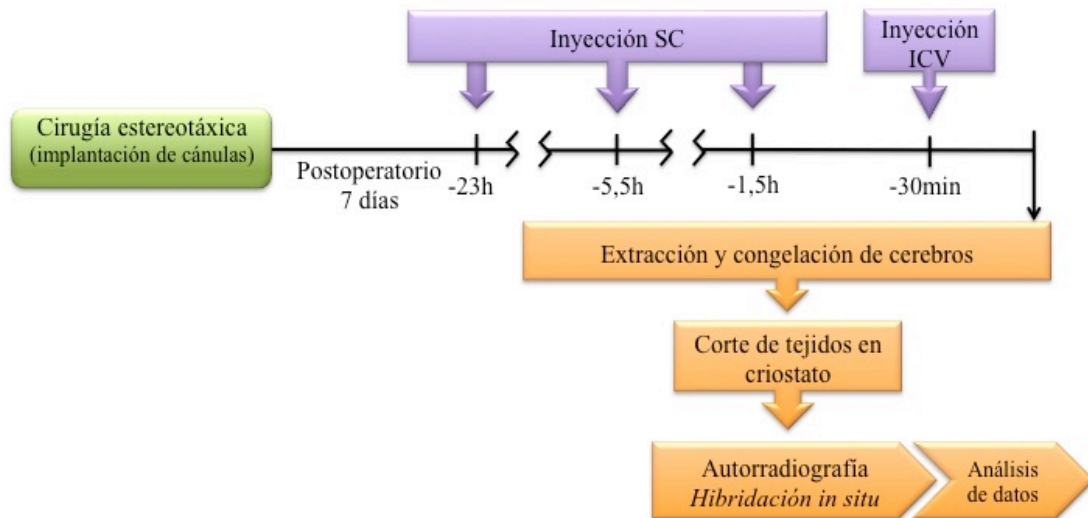
#### **3.1- Evaluar el papel del 5-HT1AR en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico Way100635**

Para estudiar el papel del 5-HT1AR en la interacción GAL(1-15)-FLX en el FST empleamos el antagonista Way100635 a una dosis de 6nmol. A los animales se les implantó una cánula fija como en los anteriores experimentos realizados en el FST y se siguieron los mismos procedimientos (figura 3). Los tratamientos farmacológicos de los grupos experimentales se especifican en la tabla 11. La FLX(10mg/Kg) se administró por vía s.c. con un patrón subcrónico, mientras que el LCRA, el GAL(1-15) y/o el Way100635 se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test.

Tabla 11: Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para estudiar el papel del 5-HT1AR con el antagonista Way100635 en la interacción entre GAL(1-15)-FLX en el FST.		
Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
Controles	LCRa(i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	9
Way100635(6nmol)	Way100635(6nmol)(i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	6
FLX(10mg/Kg)	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	10
FLX(10mg/Kg)+ Way100635(6nmol)	LCRa (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	10
FLX(10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	9
FLX(10mg/Kg)+ [GAL(1-5)(1nmol) +Way100635(6nmol)]	[GAL(1-5)(1nmol)+ Way100635(6nmol)] (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	5

### 3.2- Estudiar el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y FLX sobre las características funcionales y la expresión del ARNm del 5-HT1AR en el RD y el hipocampo dorsal.

Para estudiar el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y fluoxetina sobre las características funcionales y la expresión del ARN mensajero del 5-HT1A realizamos dos experimentos independientes. Un experimento de autorradiografía con el antagonista marcado  $[H^3]8\text{-OH-DPAT}$  y otro de *hibridación in situ*. Para la realización de ambos experimentos empleamos los mismos grupos de animales tratados como se especifica en la tabla 12. Los protocolos seguidos para realizar ambos experimentos se desarrollan más adelante. Brevemente, a los animales se les implantó una cánula fija y tras una semana de postoperatorio se les administró FLX(10mg/Kg) o Veh. por vía s.c., con un patrón de inyección subcrónico, y LCRa o GAL(1-15)(1nmol) por vía i.c.v. 30min antes del sacrificio de los animales. Una vez sacrificados por decapitación, los cerebros fueron congelados y procesados para obtener cortes seriados coronales de las regiones del RD y del hipocampo. Con este material se realizaron los experimentos independientes de autorradiografía e *hibridación in situ* (figura 8).



**Figura 8:** Esquema de procedimiento seguido por los animales usados en los experimentos de Autorradiografía e hibridación *in situ*.

Tabla 12: Grupos de animales y tratamientos farmacológicos administrados a los animales empleados para los estudios de autorradiografía e hibridación <i>in situ</i> .		
Grupos	Tratamiento	Nº animales (n experimental)
Controles	LCRa (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	6
GAL(1-15)(1nmol)	GAL(1-15)(1nmol) (i.c.v.)+ Veh. (s.c.)	6
FLX(10mg/Kg)	LCRa (i.c.v.)+ FLX 10mg/Kg (s.c.)	6
FLX(10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)	GAL(1-15) (1nmol) (i.c.v.)+ FLX10mg/Kg (s.c.)	6

## **Metodología General**

### **4- Animales de experimentación**

Para la realización de los trabajos descritos en la presente tesis doctoral se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, suministradas por Charles River Labs. (CRIFFA, Barcelona).

Los animales se recibieron en el centro de experimentación animal perteneciente a los servicios centrales de la Universidad de Málaga con un peso de 200-275 gr y una edad de unos 50 días aproximadamente. Tras una semana de cuarentena, controlando su estado sanitario, los animales se estabularon en grupos de 4-6 animales en jaulas de 55x33x20cm hasta su uso en los diferentes experimentos. La temperatura media del estabulario fue de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  con una humedad del 60-70% y un fotoperiodo de 12/12 horas de luz/oscuridad, iniciándose el periodo de luz a las 7:00 AM hora local. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a comida y bebida con una dieta estándar de mantenimiento ratón/rata (CRIFFA, Barcelona) y agua de la red general de abastecimiento, excepto en las 24h posteriores a la cirugía estereotáxica.

El cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación así como todos los procedimientos empleados se realizaron siguiendo la normativa vigente, según la directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC y 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. Los procedimientos empleados en los estudios empleados en esta tesis fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Málaga (nº expediente CEUMA: 2-2016-A).

### **5- Cirugía estereotáxica**

En los experimentos donde se requirió la implantación de una cánula guía lateral fija, para la posterior administración de sustancias por vía i.c.v., los animales se operaron en las salas de cirugía en la unidad de experimentación animal de la Universidad de

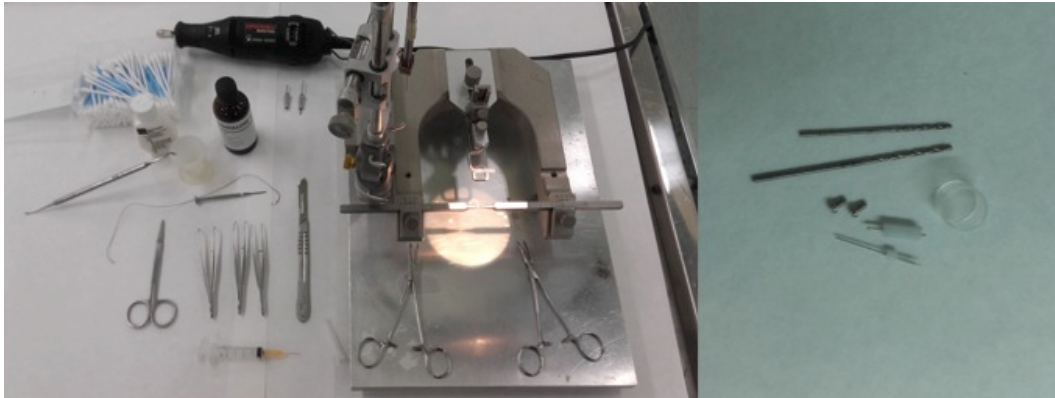


Málaga. El material quirúrgico necesario para el procedimiento fue esterilizado previamente.

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal del coctel anestésico Equitesina con una dosis inicial de ataque de 3.3ml/Kg. La composición de la Equitesina es la siguiente: Pentobarbital Sódico 0.97% (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU), Etanol Absoluto 11.5% , Hidrato de Cloral 4.25%, Propietilenglicol 42.8%, Sulfato de Magnesio 2.1% y Agua Destilada 47.7%. Todos los reactivos excepto el Pentobarbital fueron adquiridos en Panreac Química S.A., Barcelona, España. La equitesina permite la recuperación del estado normal fisiológico del animal rápidamente sin interferir significativamente en el desarrollo de los estudios comportamentales posteriores. Además, dado su amplio margen de seguridad, la equitesina ha sido empleada en numerosos procedimientos experimentales (Nielsen and Moore, 1982; Deacon and Rawlins, 1996).

Antes de iniciar el proceso quirúrgico se comprobó el plano anestésico de los animales mediante el pinzamiento palmar y de la cola por si presentaban reflejo podal y/o caudal, en tal caso, se les administraron nuevas dosis de anestésico de 0,6ml/Kg para conseguir el plano anestésico adecuado. Durante la cirugía se evaluó en todo momento el estado de los animales, administrándoles nuevas dosis de refuerzo cuando era necesario.

Una vez que los animales estuvieron completamente anestesiados, se rasuró la zona de la operación con una maquina de afeitar y se fijó la cabeza al aparato de estereotáxia (Kopf instruments, Tujunga, EEUU) (Figura 9). Primero ajustamos los conductos auditivos a las barras laterales del aparato para impedir movimientos laterales. Después, colocamos los incisivos en la barra anterior impidiendo movimientos ascendentes o descendentes de la cabeza durante la cirugía, procurando no dañar la lengua y sacándola lateralmente para evitar la asfixia del animal. A continuación, se ajustó la altura de la barra anterior de forma los puntos craneométricos Bregma y Lambda quedaron alineados en un plano horizontal.



**Figura 9:** Fotografías del aparato de estereotáxia y material quirúrgico empleado durante la cirugía. A la derecha detalle de las cánulas guía y de inyección así como de los tornillos empleados durante la cirugía.

Con la cabeza del animal inmóvil en el aparato de estereotáxia, realizamos una incisión con un bisturí desde la comisura anterior de los ojos hasta la parte posterior de la cabeza, retiramos la piel y realizamos una segunda incisión en el periostio que se retiró también con ayuda del bisturí dejando al descubierto la calota. Tanto la piel como el periostio se fijaron con pinzas forceps con la punta curvada para facilitar el trabajo. Con unos hisopos limpiamos y secamos la calota y localizamos el punto Bregma, donde se unen los huesos parietales y frontales, que usamos como punto de referencia para implantar la cánula guía en el ventrículo lateral según las coordenadas estereotáxicas: Antero-Posterior, -1mm. Lateral, 1.4mm Vertical, 3.6mm de profundidad desde la duramadre.

En el aparato de estereotáxia fijamos las coordenadas antero-posterior y lateral adecuadas y marcamos la calota suavemente. La longitud de la cánula guía es la adecuada para alcanzar la coordenada vertical. Con un taladro y las brocas adecuadas realizamos tres agujeros sin tocar la duramadre, dos para la implantación de tornillos y un tercero de diámetro más estrecho (0,8mm) adecuado al grosor de la cánula guía en el lugar donde se encuentra la marca de la calota. Los agujeros de los tornillos se realizaron en una zona donde no entorpecieran la implantación de la cánula guía.

Realizados los agujeros y limpiado el área de trabajo, implantamos los tornillos con cuidado de no rebasar el grosor del cráneo y posteriormente implantamos la cánula guía C313G/Spc Guide 22GA (Plastic One, Roanoke, EEUU). Para fijar la cánula guía y los tornillos colocamos un pequeño cilindro de plástico y lo rellenamos con cemento dental Dentalon® (Heraeus, Hanau, Alemania) sin que llegase a cubrir la cánula guía. Esperamos hasta que el cemento se secó completamente y suturamos con hilo de seda dejando libre el cilindro de plástico que contenía la cánula guía fija.

Una vez terminada la operación, los animales se retiraron del aparato de estereotáxia y se colocaron en una manta térmica para contrarrestar el efecto de bajada de temperatura de la equitesina. Posteriormente los animales se colocaron en jaulas individuales (36x22x20cm) y se devolvieron a la sala de estabulación sin comida durante 24h y con agua para evitar deshidratación por pérdida de sangre y líquidos. Todos los animales pasaron un postoperatorio de una semana de duración.

## **6- Administración de sustancias**

Las distintas sustancias empleadas durante la realización de los experimentos detallados anteriormente se administraron por dos vías: subcutánea (s.c.) e intracerebroventricular (i.c.v.)

Para administrar sustancias por vía s.c., los animales se inmovilizaron suavemente cogiendo un pliegue de piel de la parte anterior de la espalda por donde se inyectaron los diferentes tratamientos farmacológicos. Posteriormente se comprobó de forma manual la distribución subcutánea de la dosis recién inyectada. El proceso se realizó rápidamente con el fin de minimizar el estrés del animal. Todas las sustancias administradas por esta vía se ajustaron a una concentración tal que el volumen de inyección fue de 2ml/Kg usando como diluyente agua destilada.

La administración de sustancias por vía i.c.v. se realizó con animales previamente manipulados para disminuir el estrés del animal durante la administración de sustancias ya que el proceso requiere de la inmovilización del mismo. Empleamos

una jeringuilla Hamilton de 10 $\mu$ L de volumen unida a un tubo de polipropileno (P10) de unos 10cm en cuyo extremo ajustamos una cánula de inyección de acero inoxidable C313I/Spc 28GA (Plastic One, Roanoke, EEUU) con una longitud de 0.3mm mayor que la cánula guía para evitar la retrodifusión de las sustancias.

Todas las sustancias administradas por esta vía se ajustaron a una concentración adecuada para que el volumen de la inyección fuera siempre de 5 $\mu$ L, empleando para su disolución líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) ajustado a un pH de 7.4. La composición del LCRa es la siguiente: Cloruro sódico 120mM, Carbonato monosódico 20mM, Cloruro Potásico 2mM, Fosfato monopotásico 0.5mM, Cloruro cálcico 1,2mM, Cloruro magnésico 1.8mM, Sulfato bisódico 0.5mM, D-glucosa 5.8mM. Todas las sustancias fueron adquiridas a Panreac Química S.A., Barcelona, España.

Con el animal inmóvil introducimos completamente la cánula de inyección a través de la cánula guía y manualmente realizamos la microinyección de forma suave y constante para evitar la retrodifusión de la sustancia. La administración se realizó aproximadamente durante 2min y posteriormente se dejó que la sustancia difundiera durante 1min más. Retiramos la cánula de inyección y el animal fue devuelto a su jaula para continuar con el procedimiento experimental.

## **7- Test de Comportamiento Animal**

### **7.1- Condiciones de la sala y manipulación de animales**

Las diferentes pruebas de comportamiento empleadas en la presente tesis doctoral se efectuaron en salas específicamente diseñadas para tal fin en la unidad de experimentación animal de la Universidad de Málaga. Para evitar el estrés derivado del cambio de habitación, los animales se habituaron dos días antes de las pruebas de comportamiento durante una hora a las condiciones experimentales de la sala de comportamiento. Además, en esos días anteriores a las pruebas de comportamiento,

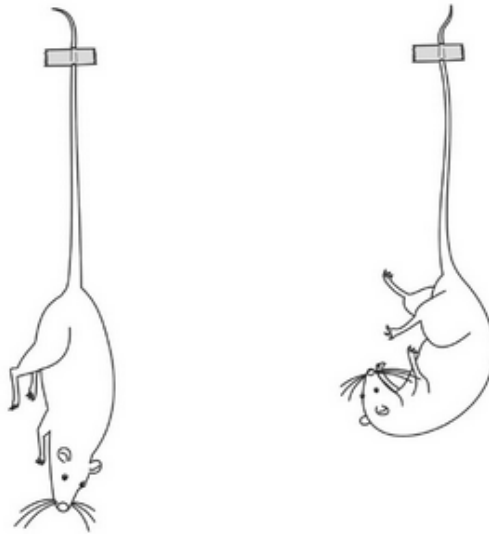
también se procedió a la manipulación del animal por parte del investigador que realizó dichas pruebas.

Las condiciones de las salas donde se realizaron las pruebas de comportamiento eran las adecuadas para no interferir en el patrón conductual de los animales (Griebel et al., 1993; Kokare et al., 2005). La temperatura ambiente fue de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  y la humedad del 60-70%. Las condiciones lumínicas se fijaron en 100lux de intensidad. Además las habitaciones de comportamiento cuentan con un sistema de presión positiva que evita la entrada de olores y se encuentran en zonas adecuadas de las instalaciones para minimizar los ruidos externos. Las pruebas de comportamiento se realizaron siempre entre las 14:00h y las 17:00h para evitar interferencias del ciclo circadiano.

### **7.2- Test de Suspensión de la Cola**

El test de suspensión de la cola está diseñado para evaluar las conductas depresivas y antidepresivas en roedores. El test se basa en la conducta de indefensión aprendida donde, ante una situación aversiva y sin escapatoria, los animales adoptan comportamientos pasivos (Steru et al., 1985; Chermat et al., 1986). La metodología del test implica idear un dispositivo mediante el cual se puedan colgar a los animales de la cola. Durante el test los animales alternan comportamientos de inmovilidad y agitación. El incremento en el tiempo de inmovilidad en este test se correlaciona con efectos pro-depresivos en este test (Steru et al., 1985; Chermat et al., 1986).

En nuestros experimentos, para la realización de este test, sujetamos una cuerda con cinta adhesiva a la cola de los animales y se colgaron de una armella a una altura de 60cm (figura 10). De forma individual, se grabó el comportamiento de los animales durante 6min con una videocámara y posteriormente los videos se analizaron con el programa informático EthoVision XT7 (Noldus, Wageningen, Holanda) para cuantificar el tiempo de la conducta de inmovilidad. Se consideró al animal inmóvil cuando no realizaba ningún movimiento de lucha, intento de morder la cinta adhesiva, torsiones del cuerpo o tirones (Hinojosa et al., 2006; Yan et al., 2014).



**Figura 10:** Imagen esquemática representativa del test de suspensión de la cola. A la izquierda un animal cuelga completamente inmóvil, a la derecha un animal intentando alcanzarse la cola. Modificado de Abelaira et al., 2013

### 7.3- Test de Luz/Oscuridad

El test de luz/oscuridad se enmarca dentro de los modelos de ansiedad incondicionada y está diseñado para evaluar la conducta de la ansiedad (Crawley and Goodwin, 1980). Este test está basado en la aversión de los roedores por los espacios intensamente iluminados y su inclinación natural a la exploración. El aparato usado para este test permite al animal desarrollar ambas conductas siendo su estado de ansiedad lo que determina que conducta prevalece (Hascoet and Bourin, 1998).

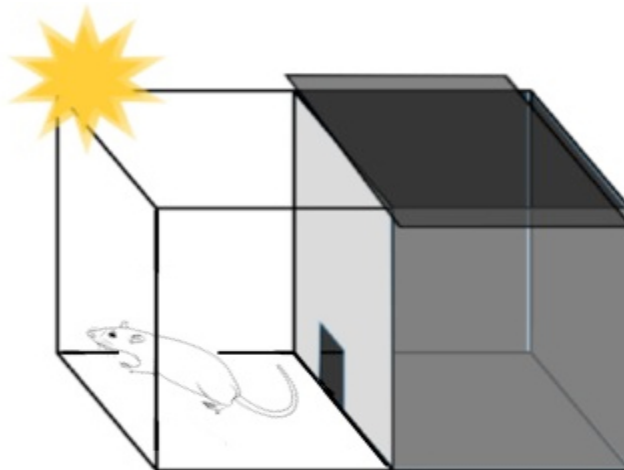
Para realizar nuestros experimentos con este test adaptamos una caja de evitación pasiva de forma que los parámetros de interés se registraban mediante el programa informático ShutAvoid (Panlab S.L., Cornellat de Llobregat, España). Este test consta de dos compartimentos de dimensiones 26x25x27cm unidos longitudinalmente y conectados entre ellos por una puerta abierta por donde los animales pueden pasar sin dificultad. Uno de los compartimentos está pintado de negro y el otro está pintado de blanco e iluminado por una bombilla de 40W por una apertura en el techo (figura 11).

Los animales de forma individual se dispusieron en el centro del compartimento iluminado y se les permitió explorar libremente durante 5min mientras se grababa su

comportamiento. Registramos las siguientes variables dependientes:

- Latencia de entrada a cámara oscura (s): Se define como el tiempo que tardó el animal en entrar por primera vez desde la cámara iluminada a la oscura con las cuatro patas.
- Tiempo en cámara iluminada (s): Tiempo total que el animal pasó en la cámara iluminada durante los 5min del test.
- Latencia de retorno (s): Se define como el tiempo que tardó el animal en volver por primera vez desde la cámara oscura a la iluminada.

Un descenso en el tiempo de latencia de entrada a la cámara oscura y del tiempo en la cámara iluminada, así como un incremento en el tiempo de la latencia de re-entrada se interpreta en este test con un efecto ansiogénico (Hascoet and Bourin, 1998).



**Figura 11:** Imagen esquemática representativa del test de luz/oscuridad. Imagen adaptada de E-physcience, Sophia Antipolis, Francia.

#### 7.4- Test de Natación Forzada

El FST es la prueba de comportamiento más ampliamente usada para ensayar la conducta depresiva y antidepresiva en roedores así como para evaluar la eficacia clínica de los antidepresivos (Porsolt et al., 1977; Detke and Lucki, 1996; Bogdanova et al., 2013). Como en el test de suspensión de la cola, la realización del test supone

un estresor para los animales que les lleva a adoptar comportamientos pasivos indicativos del grado de desesperanza (West, 1990).

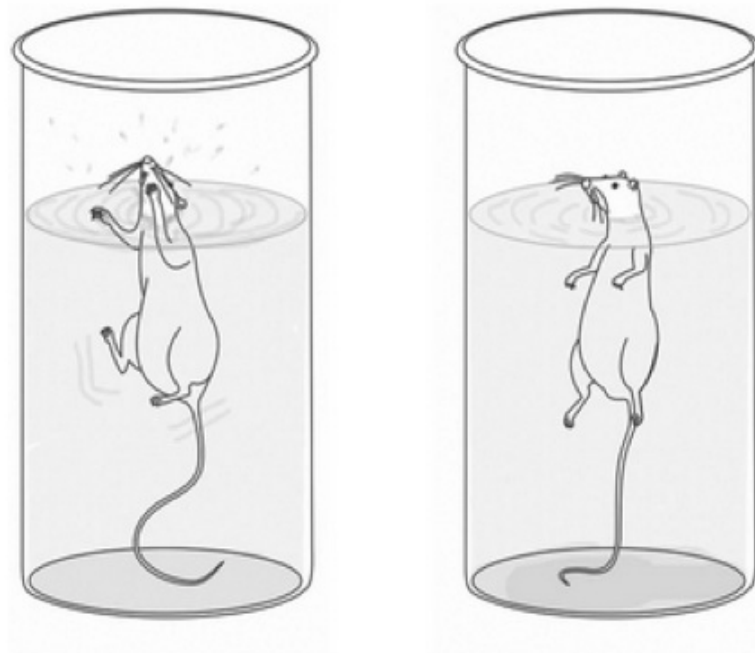
Para la realización de esta prueba empleamos un tubo de metacrilato de 50cm de altura con un diámetro de 20cm que se llenaron de agua corriente a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta una altura de 30cm (figura 12) (Detke and Lucki, 1996). La prueba constó de dos sesiones (Porlsot et al., 1977). En la primera sesión o pre-test, los animales, de forma individual, fueron introducidos suavemente en el agua y se les permitió nadar libremente durante 15min. 24h después se realizó el test, donde los animales fueron nuevamente introducidos en el agua en las mismas condiciones que durante el pre-test. Su actividad fue registrada con una videocámara durante 5min.

El comportamiento de cada animal fue evaluado con posterioridad con la ayuda del programa informático EthoVision XT7 (Noldus, Wageningen, Holanda) para la cuantificación del tiempo de cada conducta de interés. Se definieron tres conductas diferentes medidas todas en segundos (Kuteeva et al., 2007):

- Inmovilidad: El animal realizó sólo movimientos que le permitieron mantener la cabeza fuera del agua permaneciendo fundamentalmente inmóvil y flotando de forma pasiva.
- Natación: El animal nadó de forma moderada, moviendo las cuatro patas y pudiendo realizar círculos alrededor del tubo.
- Escalada: El animal realizó movimientos vigorosos de forma horizontal, habitualmente contra las paredes del tubo.
- 

Los efectos pro-depresivos en este test se correlacionan con incrementos en el tiempo de inmovilidad del animal y la disminución en el tiempo de escalada. Por el contrario, reducciones en el tiempo de inmovilidad y/o incrementos en el tiempo de natación y escalada se correlacionan con efectos antidepressivos. (Porlsot et al., 1977; Kuteeva et al., 2007; Bogdanova et al., 2013).





**Figura 12:** Imagen esquemática del FST. Se representan las conductas de escalada a la izquierda e inmovilidad a la derecha. Modificado de Abelaira et al., 2013

## 8- Procedimientos con Tejido Cerebral

### 8.1- Procesamiento de tejido cerebral

Para la realización en esta tesis de los experimentos de autorradiografía, *hibridación in situ*, inmunohistoquímica y qPCR-rt, cuyos protocolos se detallan a continuación, fue necesario realizar una serie de procedimientos previos para procesar el material biológico.

#### 8.1.1- Perfusión intracardiaca

Previamente a la realización de los experimentos de inmunohistoquímica se fijó el tejido cerebral con una solución de Paraformaldehído (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1M pH 7.4 (PAF 4%) mediante perfusión intracardiaca para conservar la estructura histológica del tejido cerebral.

Los animales se anestesiaron administrándoles Pentobarbital sódico a una concentración 50mg/Kg, a partir de la solución inyectable comercial Dolethal (FarmaHigiene S.L., Fuente Alamo, Murcia) por vía intraperitoneal (i.p.). Una vez comprobado, mediante el reflejo podal y caudal, el plano anestésico de los animales, se colocaron dentro de una campana de extracción adecuada para recoger los líquidos de lavado y fijación así como su sangre y se fijaron sus extremidades para facilitar el trabajo. Primero realizamos una incisión para separar la piel a lo largo del esternón y posteriormente se dejó expuesto el corazón con una toracotomía. Para evitar posibles coágulos que dificultasen la correcta perfusión de los líquidos se inyectó 0.1ml de Heparina al 5% (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) en el ventrículo izquierdo. Después, realizamos un pequeño corte en el ventrículo izquierdo por donde se introdujo una cánula conectada a una bomba de perfusión (Masterflex, modelo 7518. Cole Palmer Instrument, EEUU) hasta el principio de la aorta. La cánula y el corazón se fijaron con unas pinzas forceps para evitar movimientos accidentales. Inmediatamente después y casi de forma simultánea se accionó la bomba de perfusión y se abrió el circuito mediante un corte en la aurícula derecha permitiendo la salida de la sangre y líquidos.

En un primer momento se introdujeron aproximadamente unos 300ml de líquido de lavado, que consiste en una solución PBS 0.1M a pH 7.4 cuya composición es: 17.8gr/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2gr/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2gr/L y 9gr/L de NaCl. Todos los productos fueron adquiridos a Química S.A., Barcelona, España. Una vez limpiado el circuito cambiamos del líquido de lavado al de perfusión PAF 4% con cuidado de no introducir burbujas en el sistema de bombeo y se introdujo un volumen aproximadamente igual al de PBS.

### **8.1.2- Procesamiento de tejido cerebral perfundido**

Al terminar el proceso de perfusión, los cerebros se extrajeron y se realizó una post-fijación sumergiéndolos en PAF 4% durante 12-16h a 4°C. Después los cerebros se sometieron a un tratamiento de crioprotección sumergiéndolos en una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1M a 4°C hasta que el se sumergió por completo. Por



último los cerebros se congelaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  en isopentano y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado.

Para la realización de los estudios inmunohistoquímicos fue necesaria la obtención previa de secciones coronales de cerebro de rata fijado con PAF 4%. Estas secciones se obtuvieron en un criostato HM 550 (Microm International GmbH, Dreieich, Alemania) a una temperatura constante de  $-20^{\circ}\text{C}$ . El grosor de las secciones fue de  $30\mu\text{m}$  y se utilizó como guía para la recolección de núcleos cerebrales el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 1997).

Antes de realizar los cortes, los cerebros se atemperaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez a la temperatura adecuada, mediante una resina especial Tissue-Tek® (Sakura, Leiden, Holanda), los cerebros se fijaron a un soporte del criostato que permite su correcta orientación para que las secciones tisulares se realicen perpendiculares a un plano rostro-caudal. Los cortes de tejido se depositaron en placas de 24 pocillos, previamente rotuladas, que contenían cada una 1mL de la solución Hoffman, cuya composición es: 250mL de Tampón fosfato (PB) 0.4M, 300mL de Etilenglicol (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU), 300gr de Sacarosa (Panreac Química S.A., Barcelona, España), 10gr de Polovinilpirrolidona (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) y 9gr de NaCl (Panreac Química S.A., Barcelona, España). La solución se enrasó a 1L con agua destilada y quedó tamponada en PBS 0.1M. La solución Hoffman permite guardar las secciones coronales a  $-20^{\circ}\text{C}$  sin que se congelen, evitando su deterioro hasta su uso en estudios inmunohistoquímicos.

### 8.1.3- Eutanasia por decapitación

Para la extracción del tejido cerebral fresco necesario para la realización de los experimentos de qPCR-rt, autorradiografía e *hibridación in situ*, los animales se sacrificaron por decapitación. Tras la administración de los tratamientos farmacológicos indicados anteriormente en los apartados de diseño experimental y mediante una guillotina (Leica, Wetzlar, Alemania), se procedió a la decapitación de

los animales de forma rápida e indolora en las instalaciones de la unidad de experimentación animal de la Universidad de Málaga.

Los cerebros empleados en los experimentos de autorradiografía e *hibridación in situ* fueron inmediatamente extraídos y congelados enteros mediante inmersión en isopentano a  $-40^{\circ}\text{C}$  pre-enfriado con nieve carbónica. Esta forma de congelación previene la formación de cristales de hielo. Los cerebros se almacenaron convenientemente etiquetados en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En el caso de que el material fuera utilizado para realizar experimentos de qPCR-rt, los cerebros se diseccionaron rápidamente antes de su congelación para almacenar en tubos eppendorf las regiones de interés.

#### **8.1.4- Procesamiento de tejido cerebral congelado**

Para la realización de los estudios de autorradiografía funcional e hibridación *in situ* se obtuvieron secciones coronales de cerebro de rata en un criostato HM 550 (Microm International GmbH, Dreieich, Alemania) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Dichas secciones tenían un grosor de  $12\mu\text{m}$  a nivel de hipocampo-amígdala y de  $10\mu\text{m}$  a nivel de rafe dorsal, iniciándose la recolección de cortes a una distancia de  $-3.6\text{mm}$  y  $-8\text{mm}$  respectivamente tomando al punto Bregma como referencia según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1997).

Previamente a la obtención de los cortes en el criostato, los cerebros se atemperaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se fijaron mediante Tissue-Tek® (Sakura, Leiden, Holanda) a un soporte del criostato para su adecuada orientación. Las secciones coronales recién cortadas se depositaron directamente sobre portaobjetos previamente tratados SuperFrost®Plus  $25\times 75\times 1\text{ mm}$  (Menzel-Glaser, Radnor, EEUU) y se fijaron con calor con el fin de evitar que los cortes de tejido se desprendieran en los posteriores procedimientos. Los portaobjetos con las secciones adheridas se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En cada portaobjetos se dispusieron secciones de 6 cerebros distintos con los mismos tratamientos.

## 8.2- Protocolo de Autorradiografía: curva de saturación

Los estudios de autorradiografía funcional se realizaron mediante experimentos de saturación usando el agonista tritiado de 5-HT<sub>1A</sub>R [<sup>3</sup>H]-8-OH-DAPT (Perkin Elmer, EEUU) en el Servicio de Radioisótopos de la Universidad de Málaga. El protocolo seguido se basó en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Díaz-Cabiale, et al., 2000; Millón et al., 2015).

Antes de realizar el experimento y en el mismo día se prepararon los tampones de lavado y de incubación necesarios. El tampón de lavado consiste de una dilución de Tris Clorhídrico (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) en agua destilada a una concentración de 50mM a pH 7.6. A partir del tampón de lavado se preparó el tampón de incubación cuya composición es: Tris-HCl 50nM, Cloruro Cálcico 4mM (Panreac Química S.A., Barcelona, España), Pargilina 10μM (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) y 0.01% de ácido ascórbico (Panreac Química S.A., Barcelona, España). Los tampones se usaron a 4°C.

A partir del tampón de incubación preparamos 10 diluciones decrecientes de agonista tritiado para obtener 10 puntos de la curva de saturación. Las diluciones fueron desde 10nM hasta 0.26nM, con un factor de dilución de 1:3 entre cada dilución. Por cada dilución además preparamos una segunda dilución a la que añadimos serotonina (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) a 10μM para estudiar las uniones no específicas.

Para la realización del experimento se escogieron 20 portaobjetos con secciones coronales de cerebro por cada grupo experimental y zona de estudio. Los portaobjetos se organizan en 10 parejas, una por cada punto de la curva de saturación. Por cada pareja, uno de los portaobjetos se incubó con el agonista tritiado y el otro, no específico, se incubó con la misma dilución de agonista tritiado + serotonina 10μM, así cada punto de la curva tenía su propio control.

Una vez preparadas las diluciones del agonista marcado, las secciones se preincubaron 30min a temperatura ambiente con el tampón de incubación, añadiendo 1mL a cada uno de los portaobjetos de forma que cubriera toda la superficie. Pasados los 30min se retiró el tampón de preincubación y se añadió 1ml a cada portaobjetos con la concentración adecuada de agonista marcado o las disoluciones de no específico, las secciones se incubaron durante 60min. Posteriormente las secciones se lavaron dos veces durante 5min con el tampón de lavado por inmersión y se aclararon con agua destilada a 4°C. Los portaobjetos se dejaron secar bajo una corriente de aire frío. Todo el proceso se realizó minimizando la formación de residuos radiactivos tanto líquidos como sólidos.

Una vez secos, los portaobjetos se ordenaron según la concentración de agonista y se expusieron a una película sensible de tritio (Kodak Biomax MR1, EEUU) durante 6 semanas que posteriormente fueron reveladas en un laboratorio fotográfico.

Para el posterior análisis de los resultados se realizó la determinación precisa de la actividad de cada una de las disoluciones empleadas en la incubación del radioligando midiendo las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo líquido Beckman, LS6500 (GMI, Ramsey, EEUU) instalado en el Servicio de Radioisótopos.

### **8.3- Protocolo de Hibridación *In Situ***

Los experimentos de hibridación *in situ* se realizaron siguiendo protocolos descritos en trabajos previos (Mengod et al., 2015). Los portaobjetos con las secciones coronales de tejido se obtuvieron como se describe anteriormente y se atemperaron al aire. Primero, los tejidos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 20min. La composición del PBS 1X fue la siguiente: 1.4gr/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4gr/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.8gr/L NaCl, 0.2gr/L KCl. Los reactivos fueron adquiridos en (Panreac Química S.A., Barcelona, España). Posteriormente, se lavaron los tejidos con PBS 3X durante 5min y luego 5min más con PBS 1X. Los tejidos se incubaron posteriormente con una dilución de Pronasa (Calbiochem, San Diego, USA) a una concentración de 24U/ml en Tris Clorhídrico (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU)



50mM a pH 7.5 y 5mM de EDTA (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU). La actividad proteolítica se detuvo por inmersión de los portaobjetos 30s en una dilución de 2mg/mL de glicina en PBS 1X. Las secciones se enjuagaron con PBS 1X y luego se deshidrataron con una batería de disoluciones de etanol. Los portaobjetos con las secciones coronales fueron posteriormente secados al aire.

Los oligonucleótidos empleados en la hibridación fueron adquiridos a byIsogen Bioscience (Maarsden, Holanda) y eran complementarios a las regiones de ARN mensajero de 5-HT<sub>1A</sub>R (NM\_012585.1) 1-48, 763-810 y 1219-1266. Los oligonucleotidos se marcaron en su extremo 3 terminal con [<sup>33</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol) y se purificaron con columnas MicroSpin G-50 (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU).

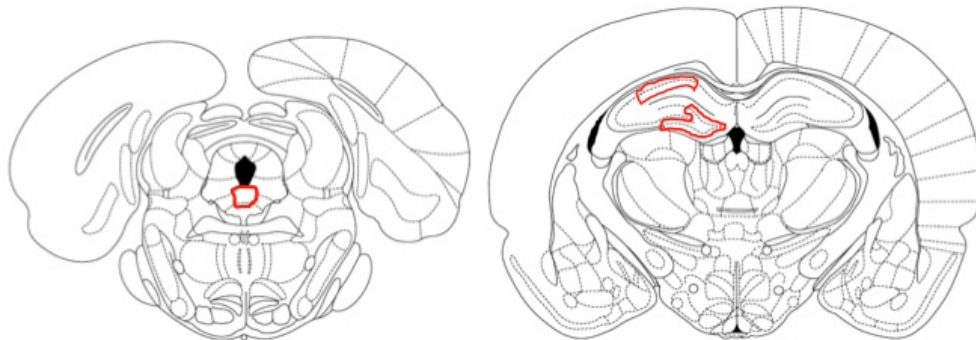
La hibridación de las sondas marcadas se realizó a una concentración de 20<sup>6</sup> cpm/ml en una solución de 50% de formamida, 10% dextran sulfato, 1% de sarkosyl, SSC 4x, solución de Denhardt a 1X, 20 nM de tampón fosfato pH 7, 250µg de tRNA de levadura y 500µg/ml de esperma de salmón. Composición del SSC 1x: 150mM de NaCl, 15mM de Citrato sódico. Composición de la solución de Denhart 1X: 0.02% de ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona y 0.02% de albúmina sérica bovina .

Se incubaron los tejidos con 80 µl de la solución de hibridación a 42°C una noche y se recubrieron los portas con Nescofilm (Bando Chemical Inc., Kobe, Japan) para prevenir la evaporación. Posteriormente se lavaron 4 veces durante 45min en una solución de NaCl 600mM, Tris Clorhídrico 10mM a pH 7.5 y 1 mM EDTA a 60°C. Por último se realizó un lavado con la misma solución a temperatura ambiente durante 30min. Las secciones se expusieron a films Kodak BIOMAX-MR (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) durante 10 días a 70°C con pantallas intensificadoras.

#### 8.4- Análisis de films

Tanto para los estudios de autorradiografía como para los de *hibridación in situ* los films obtenidos se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH, EEUU), obteniéndose medidas de densidades ópticas de las regiones del hipocampo dorsal y del rafe dorsal (figura 13).

En el caso de los estudios autorradiográficos, las densidades ópticas se transformaron posteriormente en unidades de fmol/mg de proteína mediante estándares prefabricados con polímeros marcados con  $H^3$  (Amersham Microscale, Bucks, Reino Unido) y se obtuvieron curvas de saturación que permitieron el cálculo de los parámetros  $K_d$  (constante de disociación) y  $B_{max}$  (número de sitios de unión) mediante el software estadístico GraphPad Prism v 6.0 (GraphPad Software, San Diego, EEUU).



**Figura 13:** Esquema de las secciones coronales de cerebro de rata indicando las regiones de análisis en los films de autorradiografía e *hibridación in situ*. A la izquierda el rafe dorsal ( $0,09 \text{ mm}^2$ ) y la derecha el GD ( $0,8 \text{ mm}^2$ ) y CA1 ( $0,4 \text{ mm}^2$ ) del hipocampo dorsal. Modificado del Atlas de Paxinos y Watson, 1997.

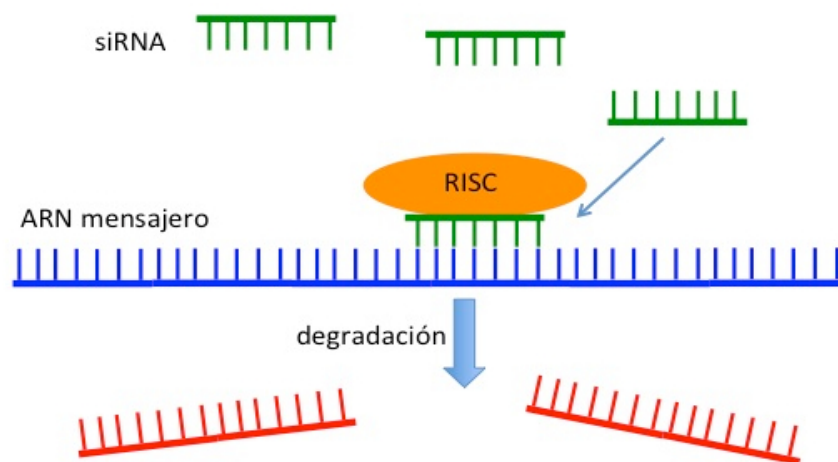
#### 9- Desarrollo de ratas siGalR1

En la realización de algunos experimentos de esta tesis doctoral hemos empleado modelos siGalR1 y siGalR2 en pruebas de comportamiento. En este apartado describimos en detalle el proceso de obtención de este modelo animal y las técnicas empleadas para comprobar la reducción de los niveles de ARN mensajero y niveles



de proteína de GALR1. La obtención y comprobación del modelo siGalR2 ya ha sido previamente descrito en trabajos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015).

La obtención de estos modelos animales se basa en el fenómeno de interferencia del ARN según el cual pequeñas moléculas de ARN, de unos 20 nucleótidos, tienen la capacidad de unirse por complementariedad a moléculas de ARN mensajero y activar mecanismos moleculares (RISC) que degradan los ARNs de doble cadena en el citoplasma (figura 14) (Akhtar and Benter, 2007; Kole et al., 2012).



**Figura 14:** Esquema del mecanismo molecular de interferencia de ARN donde pequeños oligonucleótidos provocan la degradación de ARN mensajeros activando mecanismos moleculares de degradación intracelular. (Flores-Burgess et al., 2018)

Siguiendo procedimientos ya descritos (Nakajima et al., 2012; Millón et al, 2015), la reducción del receptor GALR1 se consiguió inyectando un reactivo comercial, el siRNA-GALR1 (Dharmacon, Lafayette, EEUU), por vía i.c.v. Dicho reactivo consistía en una mezcla de 4 secuencias cortas de ARN complementarias a la secuencia del ARN mensajero del receptor GALR1. La administración i.c.v. de los oligonucleótidos se realizó como se ha descrito previamente en apartados anteriores de esta tesis durante el procedimiento de implantación de la cánula fija. Una vez

terminado el procedimiento quirúrgico y con el animal aún anestesiado se inyectó 5µg (0.35nmol) de siRNA-GALR1 (Dharmacon, Lafayette, EEUU), utilizando como Veh. el medio de cultivo Acell siRNA Delivery Media (DM) (Dharmacon, Lafayette, EEUU). El sistema Acell presenta una serie de modificaciones químicas que permite a los oligonucleótidos entrar en neuronas maduras sin ser degradados por las endonucleasas, pudiendo alcanzar así a los ARN mensajeros objetivos (Baskin et al., 2008; Nakajima et al., 2012).

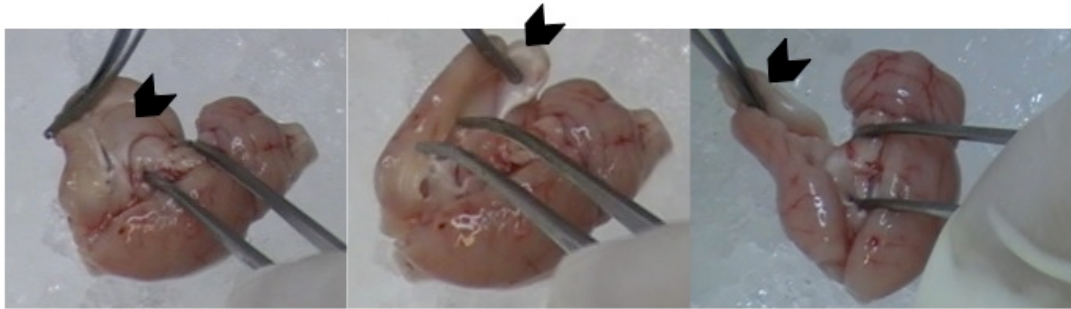
Los 4 oligonucleótidos tenían como diana las siguientes secuencias del receptor GALR1:

1-UCUGCAAGUUUAUACACUA. 2-GCACUUUCGUCUUUGGUUA.  
3-UGUUUGGCCUUAUUUUCGC. 4-UGCUCAUCUGCUUUUGCUA.

Para la comprobación en la reducción de los niveles de ARN mensajero y niveles de proteína en animales siGalR1 realizamos experimentos de qPCR-rt e inmunohistoquímica que describimos a continuación. Además, para comprobar que el sistema de interferencia para GALR1 no afectaba a los niveles de expresión de GALR2 también medimos los niveles de ARN mensajero de este receptor mediante qPCR-rt.

### 9.1- qPCR-rt

Se inyectaron animales con siRNA-GALR1 por vía i.c.v. y al cuarto, sexto y octavo día después de la inyección fueron sacrificados por decapitación. Inmediatamente después se realizó la disección de los cerebros para aislar el hipocampo dorsal lo más rápidamente posible y evitar la degradación del ARN por parte de las ribonucleasas (Figura 15). Los tejidos fueron guardados en eppendorfs y congelados rápidamente en hielo seco, almacenándose a -80°C hasta su uso.



**Figura 15:** Imágenes del proceso de disección manual del hipocampo de cerebro de rata. Las flechas negras indican la localización del hipocampo durante la disección.

La obtención del ARN de las distintas muestras se obtuvo mediante el empleo del kit de purificación "RNeasy Lipid Tissue Kit Mini Kit" (Qiagen, Hilde, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y con especial cuidado de que las muestras estuvieran siempre a 4°C para evitar la degradación del ARN. La pureza y cantidad del ARN obtenido se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) mediante la medida de los ratio de absorbancia a 260/280nm y 260/230nm. El ARN fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta su uso.

Posteriormente, generamos el cDNA que sirvió de molde durante la qPCR-rt. Empleamos para ello el kit de retrotranscripción Reverse Transcriptase Core kit (Eurogentec, Lieja, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante y con un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystem, California, EEUU) programado con la siguiente secuencia de tiempos y temperaturas: 10min a 25°C para la hibridación de las sondas, 30min a 48°C para la actuación de la retrotranscriptasa y 5min a 95°C para la inactivación enzimática.

La qPCR-rt se realizó en un termociclador 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, California, EEUU) disponible en los servicios centralizados de apoyo a la investigación de la Universidad de Málaga. En placas de 96 pocillos medimos por triplicado los niveles de expresión en cada muestra biológica del ARN mensajero de GALR1, GALR2 o de GAPDH como gen de referencia. La cantidad inicial de cDNA

por pocillo fue de 40ng y el volumen final de 25 $\mu$ l. Empleamos el kit comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, EEUU) para detectar los niveles de amplificación del cDNA en cada ciclo de la PCR. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 2min a 50°C y 10min a 95°C. 40 ciclos de 15s a 95°C y 1 minuto a 60°C. Al terminar los 40 ciclos se obtuvo una curva de fusión para comprobar que la presencia de un solo producto de amplificación por pocillo y que la temperatura de fusión de los productos amplificados correspondían a la temperatura teórica del fragmento de cDNA amplificado. En cada placa también se realizaron dos tipos de controles. Un control sin cDNA para descartar contaminaciones del kit Master Mix y posible emparejamientos no deseados de los primers y un control con muestras de ARN previas al paso de retrotranscripción para descartar la contaminación de ADN genómico.

Los datos se analizaron con el programa informático 7500 SDS v1.4.1 (Applied Biosystems, California, EEUU) por el método comparativo de Ct ( $\Delta\Delta$ Ct), realizando una curva de cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes GALR1 o GALR2 respecto del gen de referencia GAPDH en los días 4, 6 y 8 tras la inyección del siRNA-GALR1 y normalizando las medidas a la expresión de GALR1 o GALR2 en animales tratados con Veh.

Las secuencias de primers empleadas para este experimento fueron las siguientes:

-GALR1 Sentido: 5'-AAAACCTGGACAAAACCTTAG

-GALR1 Antisentido: 5'-GGATACCTTTGTCTTTGCTC

-GALR2 Sentido: 5'-AACAGGAATCCACAGACC

-GALR2 Antisentido: 5'-CCCTTTGGTCCTTTAACAAG

-GAPDH Sentido: 5'-GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTC

-GAPDH Antisentido: 5'-GAGGCTGGCACTGCACA

## 9.2- Protocolo de Inmunohistoquímica

Animales inyectados por vía i.c.v. con siRNA-GALR1 o DM se perfundieron a los 8 días tras la inyección y el tejido cerebral fue procesado y cortado como se explica en apartados anteriores. Seleccionamos el octavo día por ser el de menor expresión en el experimento de qPCR-rt. Seleccionamos secciones coronales del hipocampo dorsal, ya que es la región donde estudiamos los niveles de ARN mensajero, a nivel de -3.6mm respecto Bregma (Paxinos y Watson, 1997). El protocolo de inmunohistoquímica seguido y los anticuerpos usados han sido previamente empleados en trabajos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2016).

Las secciones coronales de tejido y los tampones, se atemperaron durante media hora. Primero se realizó un paso de recuperación antígenos, calentando los cortes durante 30min a 80°C en tampón citrato a pH 6. Luego, con PBS 0.01M a pH 7.4 los cortes se lavaron 3 veces durante 10min en agitación continua. Posteriormente, los tejidos se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.6% en agua destilada durante 20min en oscuridad para inactivar las peroxidasas endógenas. Se realizaron dos lavados más de 10min con PBS y antes de la incubación con el anticuerpo primario se realizó una preincubación de 10min con una dilución de Tritón al 0.3% y albúmina sérica bovina al 2% en PBS (PBS\*) con objeto de permeabilizar el tejido y bloquear posibles uniones inespecíficas. Posteriormente se incubaron las distintas secciones con un anticuerpo primario anti-GALR1 producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, USA), a una concentración 1/250 en PBS\* durante 1h a temperatura ambiente y en agitación. Las muestras con el anticuerpo se dejaron toda la noche a 4°C en la nevera.

Al día siguiente se atemperaron las secciones de tejido en agitación con el anticuerpo primario así como los tampones durante 1h. Luego se realizaron 3 lavados de 10min con PBS. Después de una preincubación 10min con PBS\*, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, anti-goat biotinilado (Vector laboratories, California, EEUU), diluido a una concentración de 1/200 en PBS\* durante 1h en agitación y a

temperatura ambiente. Luego se realizaron 2 nuevos lavados de 10min con PBS. Tras pre-incubar los tejidos durante 10min con PBS\*, se trataron las secciones durante 1h con un complejo Avidina-Biotina unido a Peroxidasa (ABC) (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) también diluido en PBS\* a 1/200.

Después, se lavaron los cortes 3 veces 10min con PBS y se procedió al revelado, para lo cual se añadió a cada tubo 500µl de una solución de 3-3´Diaminobenzidina (DAB) al 0.03% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en PBS 0.01M pH 7.4. En el revelado, la peroxidasa unida al complejo ABC reacciona con los compuestos de la solución y la DAB precipita, dándole una tonalidad marrón a las células. Esta reacción se mantuvo durante 5min y se detuvo al añadir 2ml de PBS. Por último, se lavaron los tejidos 3 veces en PBS durante 10min.

Las secciones cerebrales se colocaron sobre portas tratados convenientemente rotulados y se deshidrataron por inmersión durante 3min en la siguiente batería de líquidos: agua destilada, etanol al 60%, etanol al 90%, dos pasos de etanol absoluto y un último paso de xileno. Una vez deshidratado los tejidos se usó medio de montaje DPX (Panreac Química S.A., Barcelona, España) y un cubreobjetos para preservar las preparaciones inmunohistoquímicas hasta su estudio.

El análisis de inmunoreactividad de GALR1 se realizó sobre fotografías de distintas secciones de tejido capturadas con un microscopio óptico (Nikon Optiphot-2) dotado de una cámara de video Olympus UC30. La inmunoreactividad se cuantificó por densidad óptica utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, NIH, EEUU).

## **10- Análisis estadísticos**

Cuando se compararon dos grupos experimentales se utilizó el test de la t de Student de una cola, considerando los grados de significación de  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ . En el caso de que en un experimento se compraron tres o más grupos experimentales se utilizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguida del test pos hoc de Newman-Keuls (nk), estableciéndose también los grados de significación estadística en  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ .

Los datos obtenidos en los experimentos de saturación de autorradiografía se analizaron generando una curva de regresión no lineal para determinar la constante de disociación (Kd) y el número total de sitios de unión (Bmax) por cada tratamiento. Posteriormente los valores de Kd y Bmax se analizan con un ANOVA seguido del test Newman-Keuls como post hoc.

Todos estos análisis se realizaron usando del software de GraphPad PRISM 6.0. (GraphPad Software, California, EEUU).





# RESULTADOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

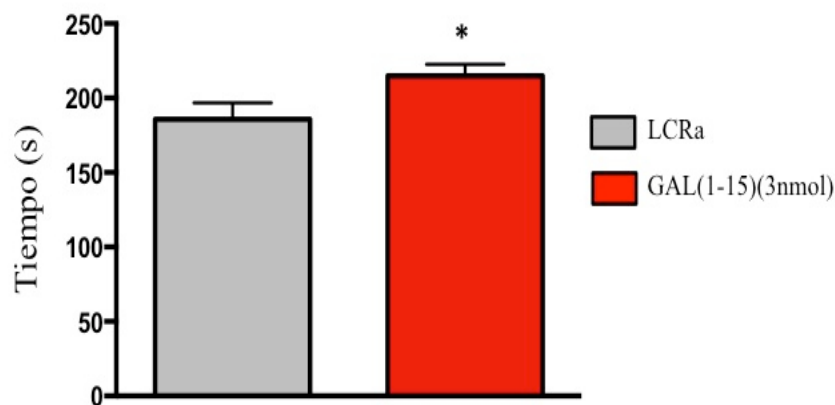


## 1- Papel del fragmento GAL(1-15) en ansiedad y depresión. Desarrollo de modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2

### 1.1- Efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) en pruebas conductuales de ansiedad y depresión.

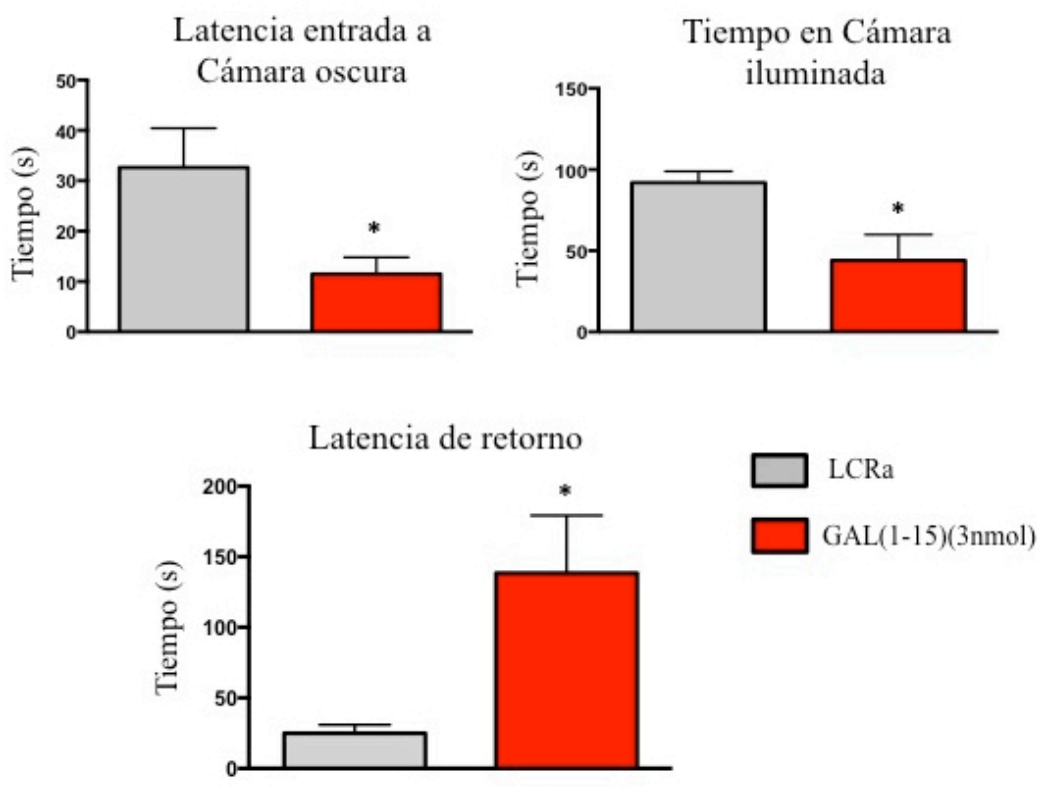
En el test de suspensión de la cola analizamos el efecto de la GAL(1-15) a una dosis de 3nmol. La GAL(1-15) o el líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) se administraron por vía intracerebroventricular (i.c.v.) 15 minutos antes de realizar el test.

Se observó como la GAL(1-15) produjo un aumento significativo del tiempo total de inmovilidad (figura 1) ( $t_{12}=2.02$ ,  $p<0.05$ ). En este test la inmovilidad se considera cuando el animal no realiza ningún movimiento, permaneciendo completamente inerte colgando boca abajo. El incremento en el tiempo de inmovilidad constituye un indicador del potencial prodepresivo de un tratamiento en este test, por tanto, los resultados sugieren un efecto prodepresivo de la GAL(1-15) administrados a una dosis de 3nmol



**Figura 1:** Representación gráfica del tiempo de inmovilidad en el test de suspensión de la cola tras la administración i.c.v. de GAL(1-15)(3nmol) 15min antes de la prueba. A los animales control se les inyectó líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p<0.05$  según test de T-Student respecto controles.  $n= 6-8$  animales por grupo.

En la figura 2 se muestran los efectos de la administración por vía i.c.v. de GAL(1-15) a una dosis de 3nmol en el comportamiento observado en el test de Luz/Oscuridad. Los resultados muestran que la dosis de 3nmol de GAL(1-15) produjo una disminución significativa ( $t_9=2.66$ ,  $p<0.05$ ) del tiempo de entrada en la cámara oscura (Latencia entrada a cámara oscura) de hasta un 65% y del tiempo total empleado por los animales en explorar la cámara iluminada (Tiempo en cámara iluminada) del 50% ( $t_9=2.56$ ,  $p<0.05$ ). Además también se observó un incremento de más de 5 veces en el tiempo de primer retorno a la cámara iluminada desde la cámara oscura (Latencia de retorno) ( $t_8=2.74$ ,  $p<0.05$ ). Todos los parámetros analizados en este test sugieren un efecto ansiogénico de la GAL(1-15) administrado por vía i.c.v.



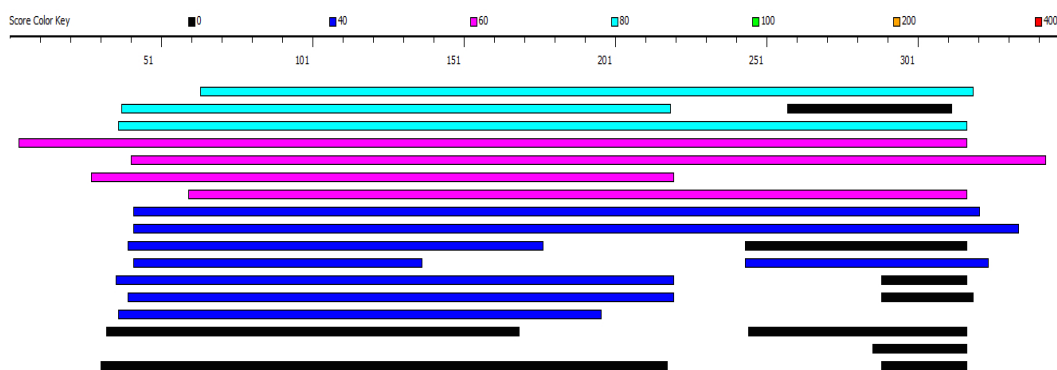
**Figura 2:** Representación gráfica de los parámetros de latencia, tiempo en cámara iluminada y latencia de retorno analizados en el test de luz/oscuridad tras la administración i.c.v. de GAL(1-15)(3nmol) 15min antes de la prueba. A los animales control se les inyectó líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p<0.05$  según test de T-Student respecto controles. N= 5-6 animales por grupo.

## 1.2- Desarrollo de los modelos de homología de GALR1 y GALR2

### Alineamiento BLAST y selección de plantillas

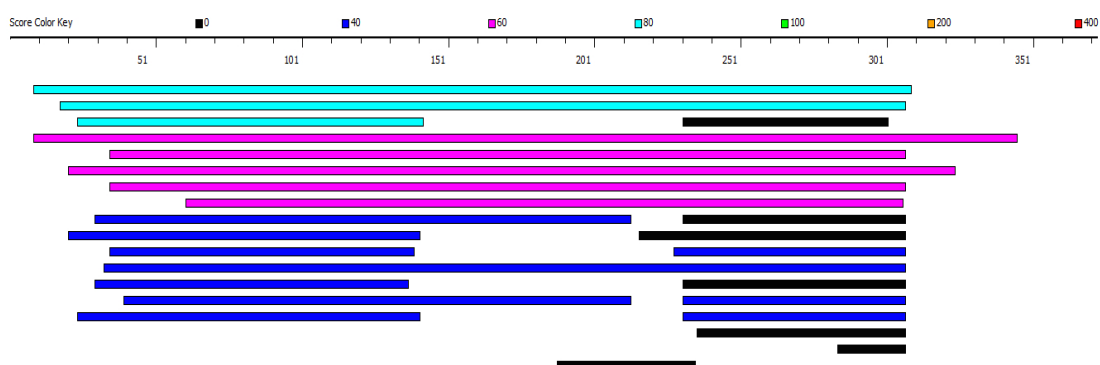
El resultado de los alineamientos se muestra en las figuras 3 y 4. Se representan las regiones donde se produjeron los alineamientos entre GALR1 (figura 3) y GALR2 (figura 4) y las proteínas seleccionadas de la base de datos PDB.

En las tablas 5 y 6 se muestran las proteínas que tras el alineamiento fueron utilizadas para la modelización de los receptores, su código de entrada en PDB y los parámetros “bit score” e identidad que indican la adecuación del alineamiento. La identidad indica el porcentaje de aminoácidos coincidentes entre dos secuencias de aminoácidos. Las proteínas con un índice de identidad superior al 20% en el alineamiento fueron seleccionadas para la siguiente fase.



**Figura 3:** Esquemas del alineamiento realizado entre la secuencia de GALR1 y las diferentes proteínas encontradas en la base de datos PDB. La barra negra superior representa la secuencia de aminoácidos de GALR1 con sus 346 aminoácidos. Las barras de colores representan a distintas proteínas alineadas. Los colores indican una escala de valores del parámetro “bit score”.

Tabla 1: Resultados del alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de GALR1 y las secuencias de diferentes las proteínas automáticamente seleccionadas por el software de la base de datos PDB. Se muestra el código de entrada en la base de datos PDB de dichas proteínas (“PDB entry”), los valores de “bit score” y la identidad como indicadores del alineamiento.							
PDB entry	3ODU	2KS9	2Y00	3SN6	2RH1	1U19	2Z73
Bit score	86	85	81	72	68	68	62
Identidad	32%	26%	25%	23%	27%	23%	22%



**Figura 4:** Esquemas del alineamiento realizado entre la secuencia de GALR2 y las diferentes proteínas encontradas en la base de datos PDB. La barra negra superior representa la secuencia de aminoácidos de GALR2 con sus 372 aminoácidos. Las barras de colores representan a distintas proteínas alineadas. Los colores indican una escala de valores del parámetro “bit score”.

Tabla 2: Resultados del alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de GALR2 y las secuencias de diferentes proteínas automáticamente seleccionadas por el software de la base de datos PDB. Se muestra el código de entrada en la base de datos PDB de dichas proteínas (“PDB entry”), los valores de “bit score” y la identidad como indicadores del alineamiento								
PDB entry	2Y00	3SN6	3ODU	2KS9	2YDV	3VG9	1U19	2Z73
Bit score	95	92	81	79	72	72	71	62
Identidad	27%	25%	38%	26%	28%	28%	20%	22%

### Alineamiento estructural de las plantillas

Con las proteínas seleccionadas del apartado anterior se continuó con el procedimiento de “alinear secuencias a la plantilla”. Los resultados de este procedimiento se expresan como valores de RMSD obtenidos tras el alineamiento estructural de las diferentes plantillas usadas para modelizar GALR1 y GALR2 en las tablas 3 y 4 respectivamente. Además en dichas tablas se muestra el número de aminoácidos totales solapados entre las diferentes plantillas.

RMSD de la cadena principal (angstrom) por debajo de la diagonal y Número de residuos superpuestos por encima de la diagonal							
Proteína	3ODUA	2Y00B	3SN6R	1U19A	2Z73B	3VG9A	2YDVA
3ODUA		67	67	76	73	71	73
2Y00B	5.717		279	261	273	280	280
3SN6R	5.712	2.604		250	259	264	270
1U19A	5.709	2.957	3.142		307	265	265
2Z73B	5.758	3.271	3.314	2.998		276	269
3VG9A	5.954	3.289	3.393	3.004	3.337		289
2YDVA	5.893	3.445	3.109	3.471	3.384	2.281	

**Tabla 3:** Captura de pantalla de DiscoveryStudio donde se muestra por debajo de la diagonal de una matriz simétrica los valores de RMSD de comparar cada plantilla con el resto. Por encima de la diagonal, se indican el número de residuos totales que se superponen espacialmente entre las proteína usada para modelizar GALR1.

RMSD de la cadena principal (angstrom) por debajo de la diagonal y Número de residuos superpuestos por encima de la diagonal								
Proteína	2Y00B	3SN6R	3ODUA	2KS9A	2YDVA	3VG9A	1U19A	2Z73B
2Y00B		271	64	263	280	280	264	275
3SN6R	2.314		64	252	266	260	253	260
3ODUA	5.782	5.838		74	70	68	74	71
2KS9A	2.079	2.567	5.777		261	264	339	310
2YDVA	3.115	2.825	6.208	2.841		289	262	268
3VG9A	2.766	2.965	6.291	2.444	2.13		265	275
1U19A	2.693	2.883	5.973	1.525	3.307	2.946		307
2Z73B	2.91	3.024	5.917	2.829	3.303	2.944	2.748	

**Tabla 4:** Captura de pantalla de DiscoveryStudio donde se muestra por debajo de la diagonal de una matriz simétrica los valores de RMSD de comparar cada plantilla con el resto. Por encima de la diagonal, se indican el número de residuos totales que se superponen espacialmente entre las proteína usada para modelizar GALR2.

### Puntuaciones DOPE de los modelos generados

El último proceso consistió en la construcción de varios modelos de homología. En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados de puntuación DOPE obtenidos en los 20 modelos generados de GALR1 y GALR2 respectivamente.

Model Scores	
Name	DOPE Score
Q62805.M0018	-41553.468750
Q62805.M0010	-41690.937500
Q62805.M0003	-42127.011719
Q62805.M0008	-40805.929688
Q62805.M0006	-41501.546875
Q62805.M0020	-40807.710938
Q62805.M0013	-40982.742188
Q62805.M0012	-41334.808594
Q62805.M0019	-40371.097656
Q62805.M0004	-40301.371094
Q62805.M0009	-40586.292969
Q62805.M0005	-39803.746094
Q62805.M0017	-39518.273438
Q62805.M0007	-40087.085938
Q62805.M0014	-40414.710938
Q62805.M0002	-40808.683594
Q62805.M0011	-40087.414063
Q62805.M0001	-40667.136719
Q62805.M0015	-40114.062500
Q62805.M0016	-40567.777344

**Tabla 5:** Resultados de la puntuación DOPE obtenido en cada uno de los 20 modelos de GALR1 generados en DiscoveryStudio. El modelo seleccionado fue el que tuvo la menor puntuación DOPE (-40087.08).

Model Scores	
Nombre	Puntuación DOPE
O08726.M0005	-40113.089844
O08726.M0002	-40359.359375
O08726.M0015	-39769.523438
O08726.M0014	-39023.035156
O08726.M0016	-38666.679688
O08726.M0006	-39064.207031
O08726.M0011	-39166.402344
O08726.M0012	-38692.796875
O08726.M0001	-38516.371094
O08726.M0017	-38638.835938
O08726.M0009	-38740.906250
O08726.M0013	-38759.460938
O08726.M0010	-38652.726563
O08726.M0020	-38234.882813
O08726.M0007	-38758.785156
O08726.M0008	-38601.699219
O08726.M0004	-38624.285156
O08726.M0018	-39021.191406
O08726.M0019	-38964.429688
O08726.M0003	-38181.089844

**Tabla 6:** Resultados de la puntuación DOPE obtenida en cada uno de los 20 modelos de GALR2 generados en DiscoveryStudio. El modelo seleccionado fue el que tuvo la menor puntuación DOPE (-38181.08).



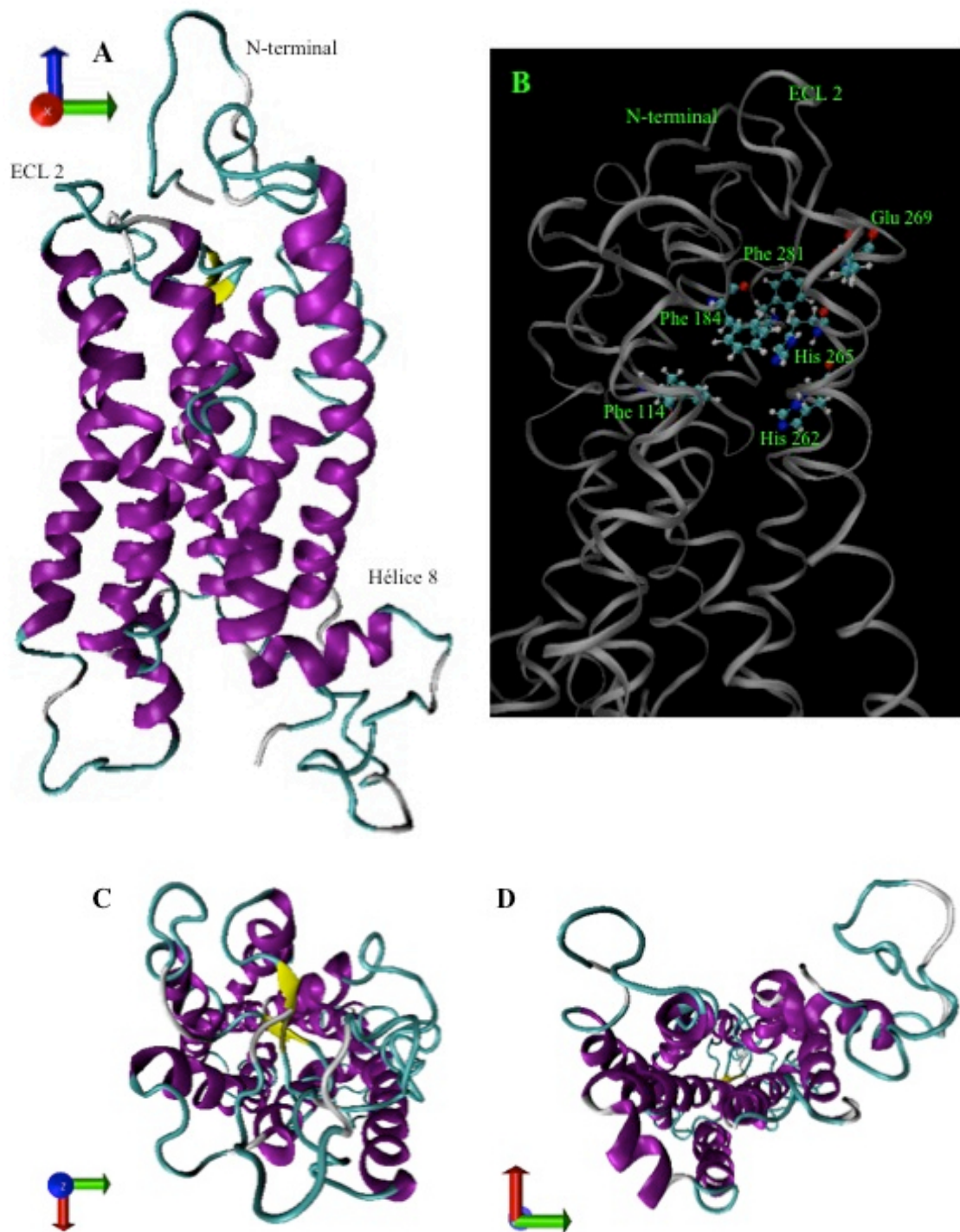
### **Modelos de homología GALR1 y GALR2**

Tras el refinamiento de los modelos seleccionados mediante la ionización de residuos y la aplicación del protocolo de minimización obtuvimos dos archivos en formato pdb con las estructuras tridimensionales de los receptores GALR1 (figura 5) y GALR2 (figura 6).

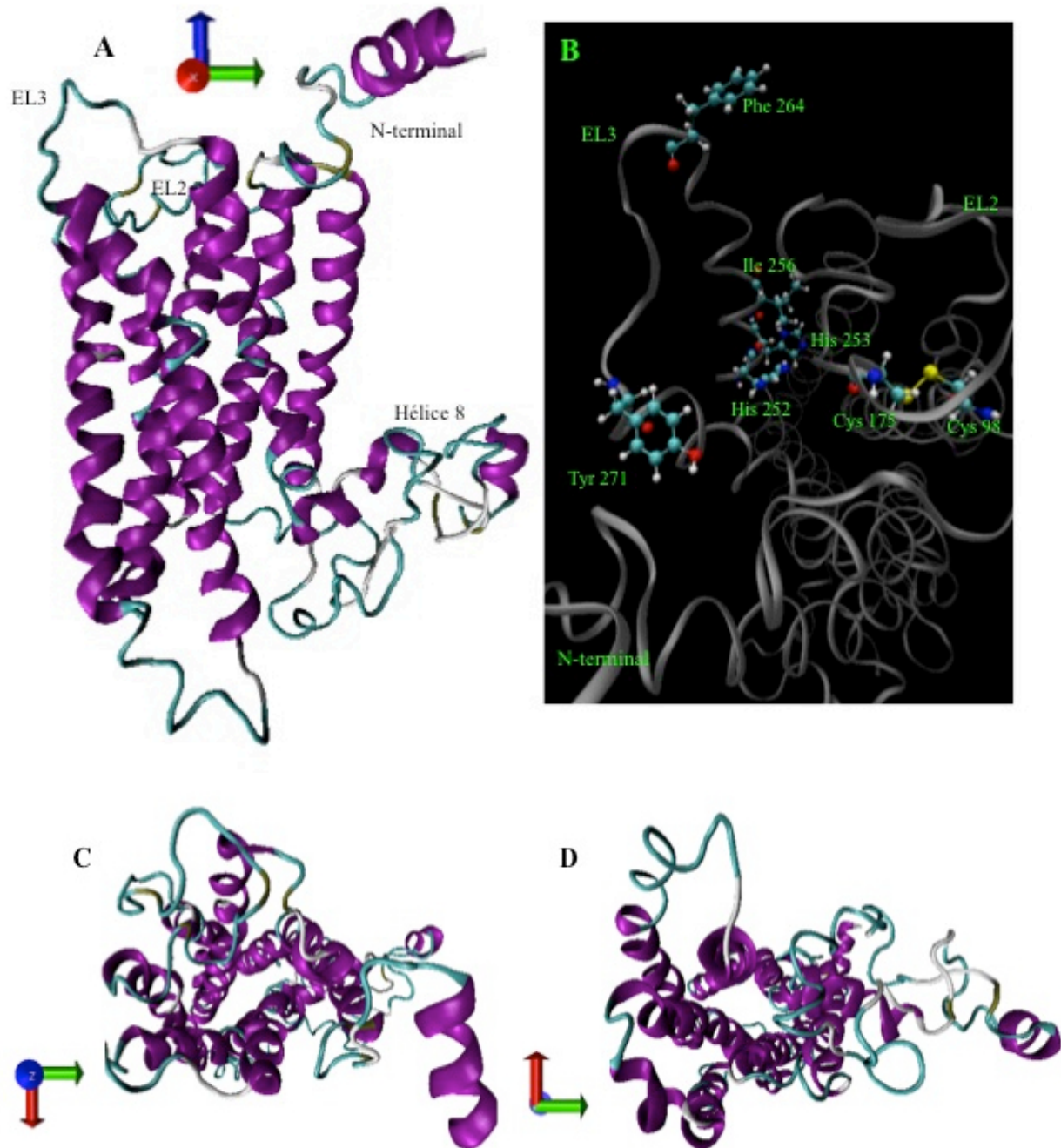
Además para controlar la calidad de los modelos, inspeccionamos visualmente los modelos generados para comprobar si los residuos específicos de los receptores GALR1 y GALR2 implicados en la unión de la GAL se disponían orientándose de forma que tuvieran acceso a la cavidad del hipotético sitio de unión entre la GAL y los receptores. La implicación de estos residuos en la interacción entre GAL y receptor han sido previamente determinados en estudios de mutagénesis.

Para GALR1 estos residuos son: Fenilalanina (Phe) 114, Phe 184, Phe 280; Histidina (His) 262, His 265, Glutamina (Glu) 269 (Kask et al., 1998; Berthold et al., 1997; Church et al., 2002)

Para GALR2 los residuos son: His 252, His 253, Ile 256, Phe 264, Tyr 271 (Lundstrom et al., 2007). En el caso de GALR2 también se señala la formación de un puente disulfuro en el bucle extracelular 2 (EL2) que en nuestro caso se generó en el proceso de modelado de forma automática (Hui et al., 2016).



**Figura 5:** Imágenes del modelo de homología de GALR1 obtenido en DiscoveryStudio. **A:** vista desde el plano de la membrana, **C:** vista desde el extremo N-terminal y **D:** vista desde el extremo C-terminal. **B:** representación donde se resaltan los Aa implicados en la interacción con GAL.



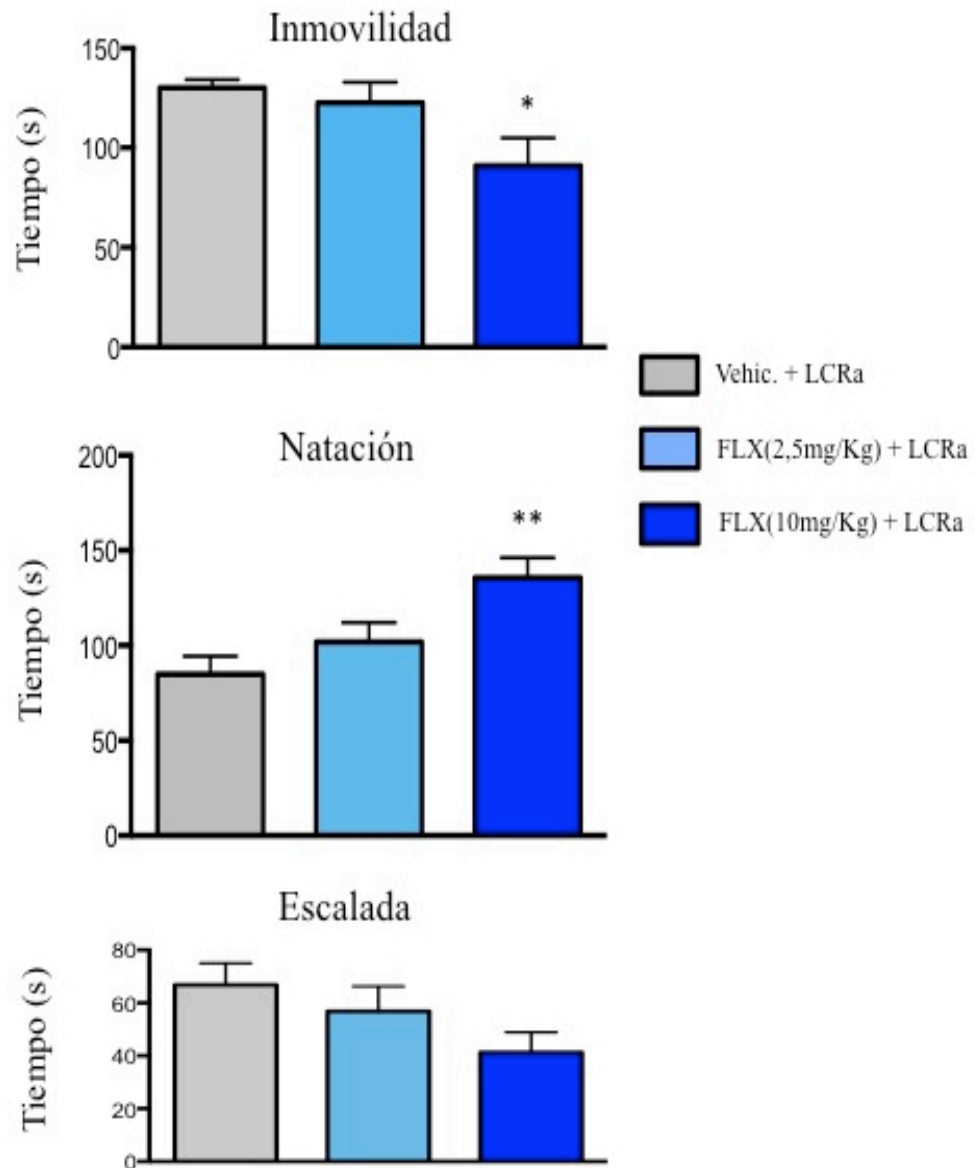
**Figura 6:** Imágenes del modelo de homología de GALR2 obtenido en DiscoveryStudio. A: vista desde el plano de la membrana, C: vista desde el extremo N-terminal y D: vista desde el extremo C-terminal. B: representación donde se resaltan los Aa implicados en la interacción con GAL.

## **2- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores GALR1 y GALR2**

### **2.1- Estudio de la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST y comparación de la interacción GAL(1-15)-FLX con GAL-FLX.**

Primero se determinó las dosis efectiva y subumbral de FLX en el FST. La FLX se administró por vía s.c. 23, 5 y 1h antes de la realización del test y LCRA por vía i.c.v. 15min antes de la prueba. Al grupo control se le administró vehículo (Veh.) y LCRA a los tiempos indicados. Estos patrones de administración de sustancias, tanto por vía s.c. como i.c.v., se utilizaron en todos los experimentos de comportamiento presentados en esta tesis.

Acorde con los resultados de estudios previos en el FST (Estrada-Camarena et al., 2003), se observó como la dosis de FLX(10mg/Kg) produjo una reducción estadísticamente significativa en el tiempo de inmovilidad ( $F_{2,20}=4.628$ ,  $p<0.05$ ) y un incremento en el tiempo de natación ( $F_{2,20}=7.044$ ,  $p<0.01$ ) en comparación con el resto de grupos (post hoc Newman-Keuls (nk):  $p<0.05$ ) sin afectar al tiempo de escalada ( $F_{2,20}=2.569$ ,  $p=0.102$ ) (figura 7). La dosis de FLX(2.5mg/Kg) no produjo ningún efecto en los tres parámetros analizados en comparación con el grupo control. Según estos resultados se consideró a la dosis de FLX(10mg/Kg) como efectiva y la de FLX(2.5mg/Kg) como subumbral en el test de natación forzada con este patrón de inyecciones.

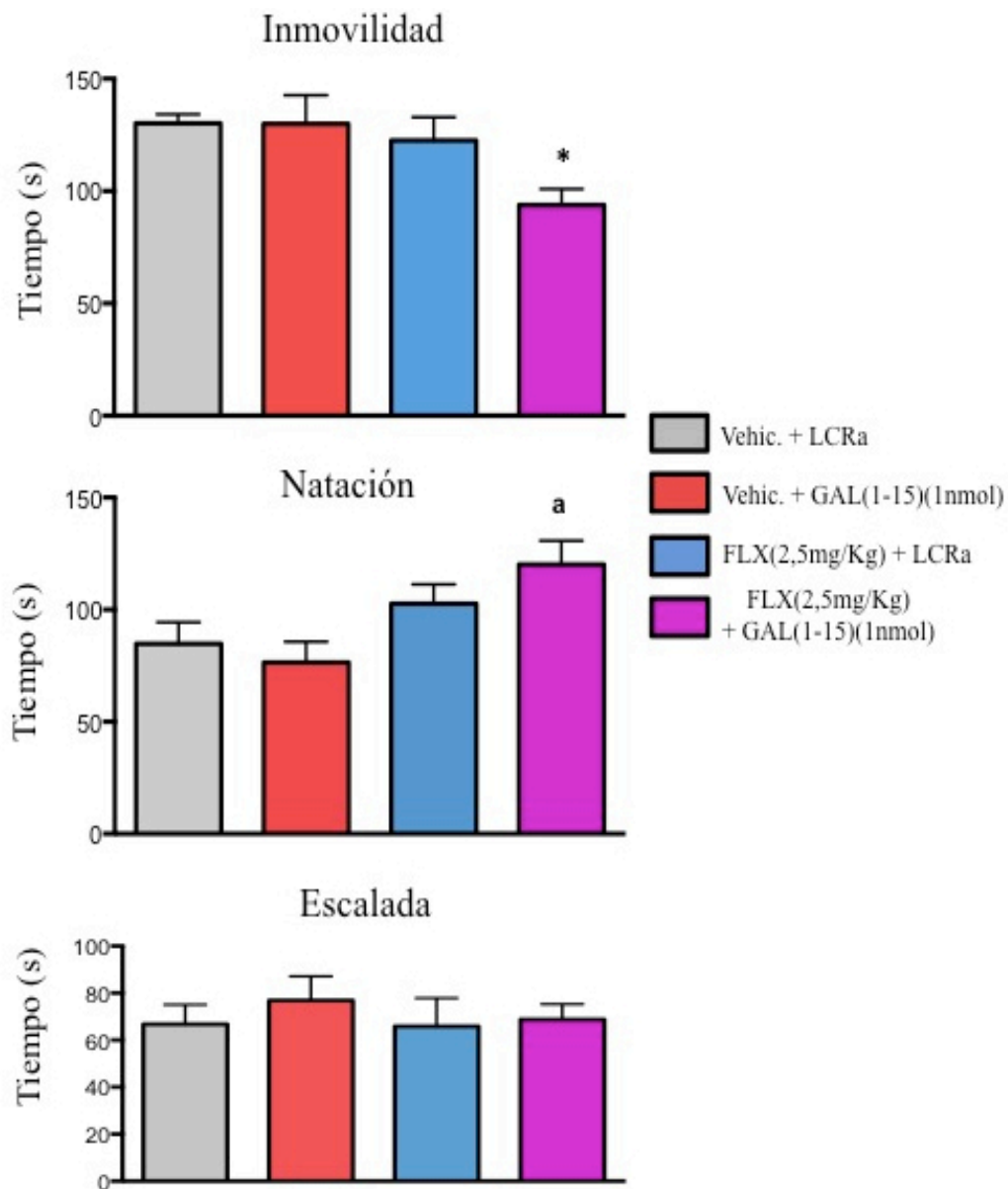


**Figura 7:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada analizados en el FST tras la administración s.c. de una dosis no efectiva de FLX(2,5mg/Kg), una dosis efectiva de FLX(10mg/Kg) o Veh. a las 23, 5 y 1h antes de realizar el test de 5min. A todos los grupos se les administró LCRA por vía i.c.v. 15min antes del test. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0.05$  frente al resto de grupos, \*\* $p < 0.05$  frente a FLX(2,5mg/Kg) y  $p < 0.01$  frente a Control según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori  $n = 6-9$  ratas por grupo.

Posteriormente, y para determinar la existencia de una interacción entre el fragmento GAL(1-15) y la FLX, coadministramos GAL(1-15)(1nmol) y FLX(2.5mg/Kg) y comparamos los efectos de la coadministración con los efectos de ambas sustancias de forma aislada. La FLX o el Veh. se administraron con el patrón de inyecciones previamente descrito y la GAL(1-15) o el LCRa se inyectó por vía i.c.v. 15min antes del test.

Los resultados representados en la figura 8 muestran como la coadministración de FLX(2.5mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) produjo una reducción de casi un 30% en el tiempo de inmovilidad ( $F_{3,27}= 3.973$ ,  $p<0.05$ ) respecto a los demás grupos (nk:  $p<0.05$ ), y un incremento en el tiempo de natación del 40% ( $F_{3,28}=4.137$ ,  $p<0.05$ ; nk:  $p<0.05$ ), sin modificar el tiempo de escalada ( $F_{3,28}=4.137$ ,  $p=0.83$ ).

Según estos resultados la coadministración de ambas sustancias produjo un potente efecto anti-depresivo. Dado que la administración i.c.v. del fragmento GAL(1-15) induce efectos pro-depresivos podemos sugerir que existe una interacción entre GAL(1-15) y FLX en la que se favorecen los efectos de la FLX.



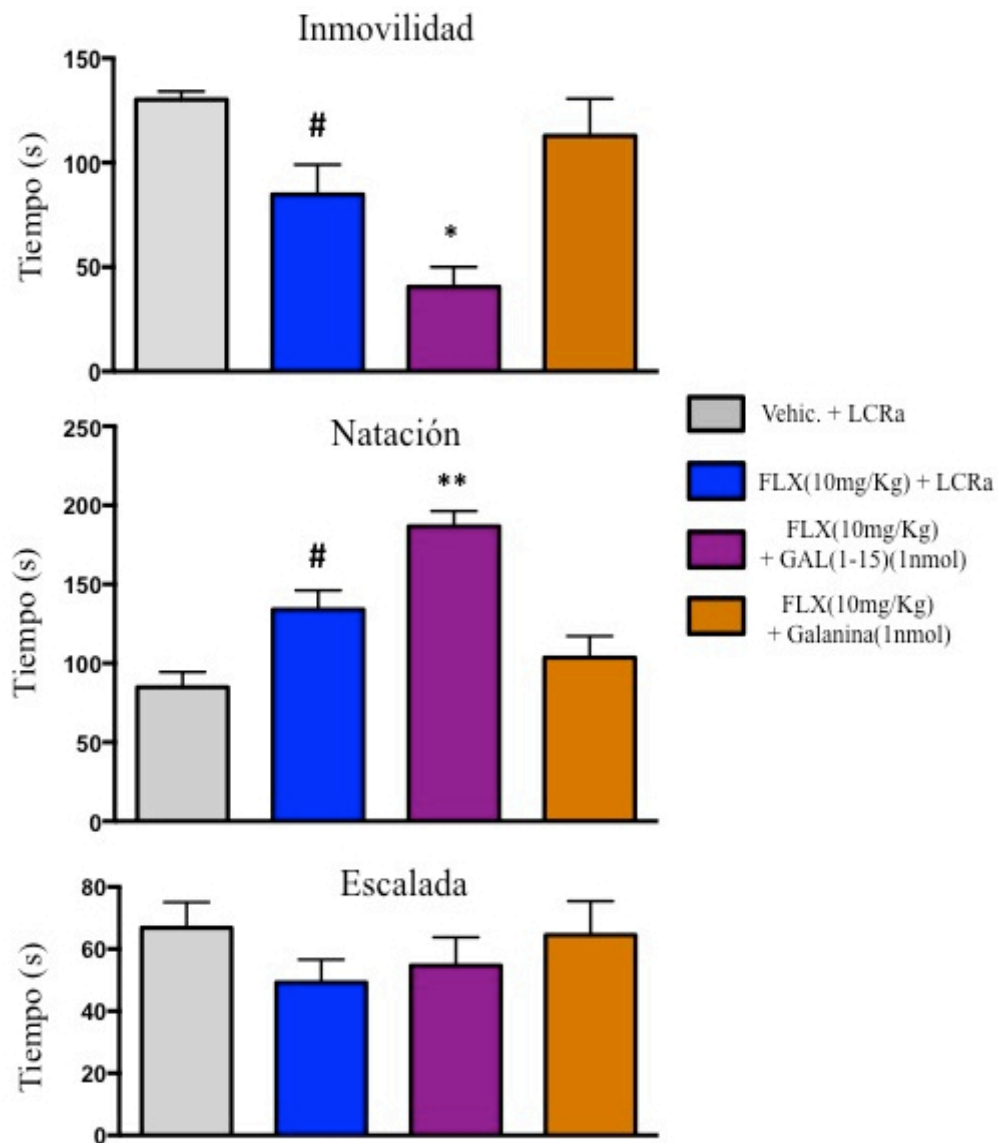
**Figura 8:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada analizados en el FST tras la coadministración de una dosis no efectiva de FLX(2,5mg/Kg) y una dosis subumbral de GAL(1-15)(1nmol). La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. mediante un patrón de inyección subagudo a las 23, 5 y 1h antes de realizar el test de 5min y la GAL(1-15) o el LCRA se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test. El grupo de Veh.+ LCRA fue usado como control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0.05$  frente al resto de grupos, a:  $p < 0.05$  frente a Control y GAL(1-15)(1nmol) según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori  $n = 7-9$  ratas por grupo.

Una vez determinada la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX, estudiamos si la misma dosis de GAL(1-15) era capaz de modificar los efectos de la FLX a una dosis efectiva. En este experimento también comparamos los efectos en animales de la coadministración de GAL(1-15) y FLX a dosis efectivas con animales coadministrados con Galanina(1nmol) y FLX también a dosis efectiva para determinar si la interacción era exclusiva del fragmento. Grupos de animales recibieron la dosis subumbral de GAL(1-15)(1nmol), la dosis efectiva de FLX(10mg/Kg) o la combinación de ambas sustancias y, además, a un grupo de animales fue administrado con Galanina(1nmol) por vía i.c.v. junto con FLX(10mg/Kg).

En la figura 9 se representa como la coadministración de FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) indujo un fuerte descenso de más del 50% en el tiempo de inmovilidad ( $F_{3,28}=10.96$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.05$ ) así como un incremento del 40% en el tiempo de natación ( $F_{3,28}=16.46$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.01$ ) comparado con el grupo inyectado sólo con FLX(10mg/Kg), sin producirse ninguna modificación en el tiempo de escalada ( $F_{3,27}=0.7554$ ,  $p=0.5289$ ). Estos efectos ponen de manifiesto la intensidad de esta interacción potenciando el efecto de la FLX a dosis efectivas.

En la figura 9 también se observa los efectos del grupo de animales a los que se les administró Galanina(1nmol) por vía i.c.v. en vez de GAL(1-15) para determinar si la interacción con la FLX es exclusiva del fragmento o también se produce con la molécula completa. Se observó como la Galanina(1nmol) no modificó ningún parámetro analizado en comparación con el grupo de FLX(10mg/Kg). Estos resultados confirman el efecto de potenciación de la GAL(1-15) también sobre una dosis efectiva de FLX y además, indican que la interacción es exclusiva del fragmento.





**Figura 9:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada analizados en el FST tras la coadministración de una dosis de FLX(10mg/Kg) y una dosis de GAL(1-15)(1nmol) o Galanina(1nmol). La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. a las 23, 5 y 1h antes del test de 5min y la GAL(1-15), Galanina o el LCRA se administraron por vía i.c.v. 15min antes. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  frente al resto de grupos; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  frente a Control y GAL(1-15)(1nmol) según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori.  $n = 7-8$  ratas por grupo.

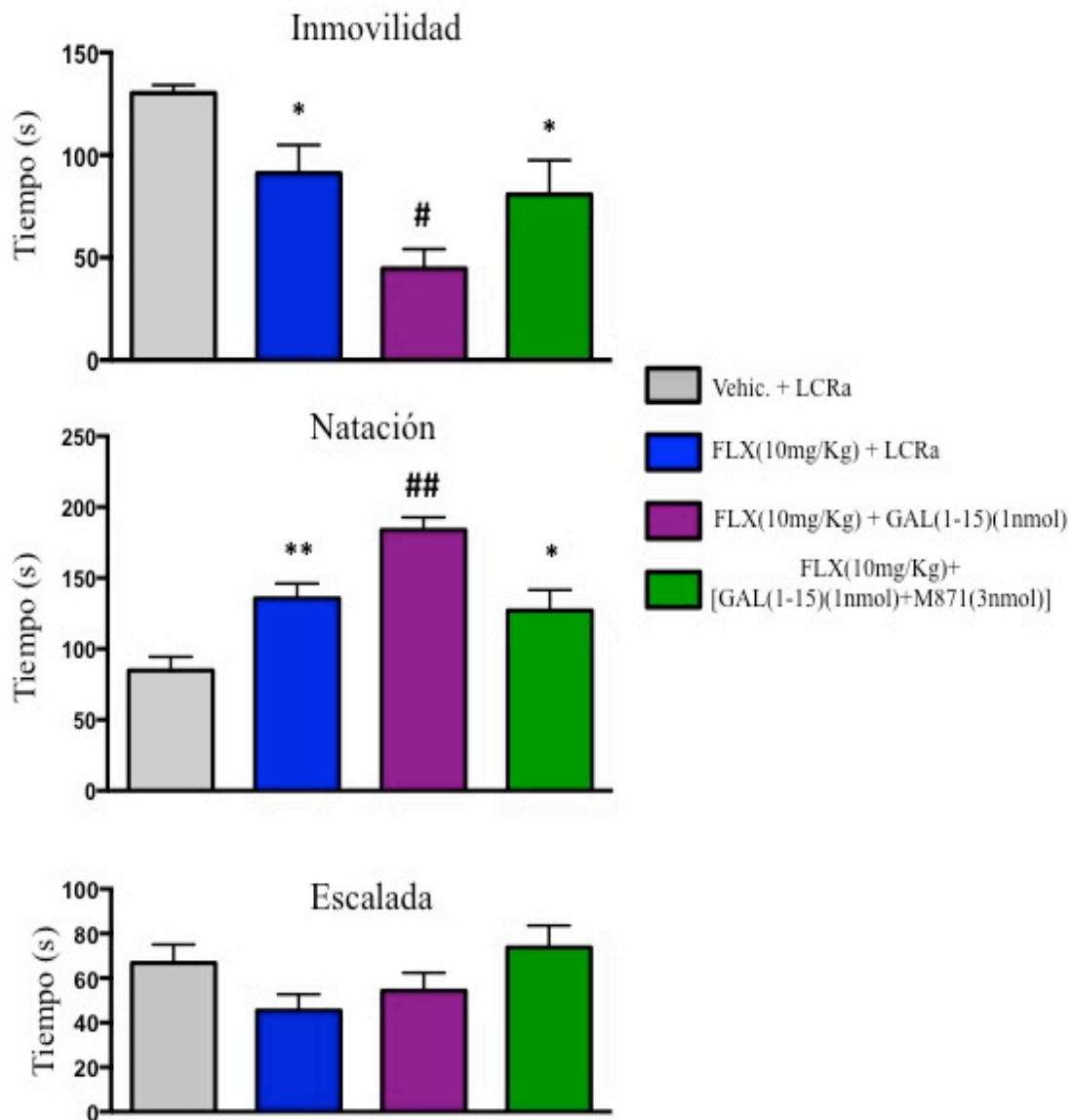
**2.2- Evaluación del papel de los receptores GALR2 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico M871 y un modelo de silenciamiento génico siGalR2.**

En la figura 10, se muestra como la administración del antagonista GALR2 M871(3nmol) bloqueó la potenciación que GAL(1-15)(1nmol) produjo sobre los efectos antidepresivos de la FLX a una dosis efectiva.

La presencia de M871(3nmol) en el grupo de animales administrados con FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol) + M871(3nmol) bloqueó tanto la reducción del tiempo de inmovilidad ( $F_{3,28}=10.20$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.05$ ) como en el incremento del tiempo de natación ( $F_{3,29}=15.75$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.01$ ) inducida por la coadministración de FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol).

Dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos administrados con FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol) + M871(3nmol) y el grupo administrado solo con FLX(10mg/Kg) se sugiere que el M871 no bloquea los efectos de la FLX (figura 10). Además, la administración del antagonista M871(3nmol) por vía i.c.v. 15min antes del test tampoco produjo efectos significativos respecto al grupo control en el FST (tabla 7).

Estos resultados sugieren un papel fundamental del receptor GALR2 en el efecto potenciador de GAL(1-15) sobre los efectos antidepresivos de la FLX en este test.



**Figura 10:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada analizados en el FST tras la coadministración de FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol) sola o en combinación con el antagonista de GALR2 M871(3nmol). La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. a las 23, 5 y 1h antes del test. GAL(1-15), GAL(1-15)+M871 o el LCRA se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test. El grupo de Vehic.+LCRA fue usado como control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  frente a FLX(10mg/Kg)+LCRA y FLX(10mg/Kg)+[GAL(1-15)(1nmol)+M871(3nmol)]; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  frente al resto de grupos según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori  $n = 7-9$  ratas por grupo.

<b>Tabla 7: Parámetros de inmovilidad, natación y escalada analizados en el FST tras la administración de M871(3nmol).</b>			
	<b>Inmovilidad</b>	<b>Natación</b>	<b>Escalada</b>
<b>Control</b>	128±3,5 (seg)	87±10 (seg)	66±9 (seg)
<b>M871(3nmol)</b>	141±12 (seg)	68±9 (seg)	73±11 (seg)

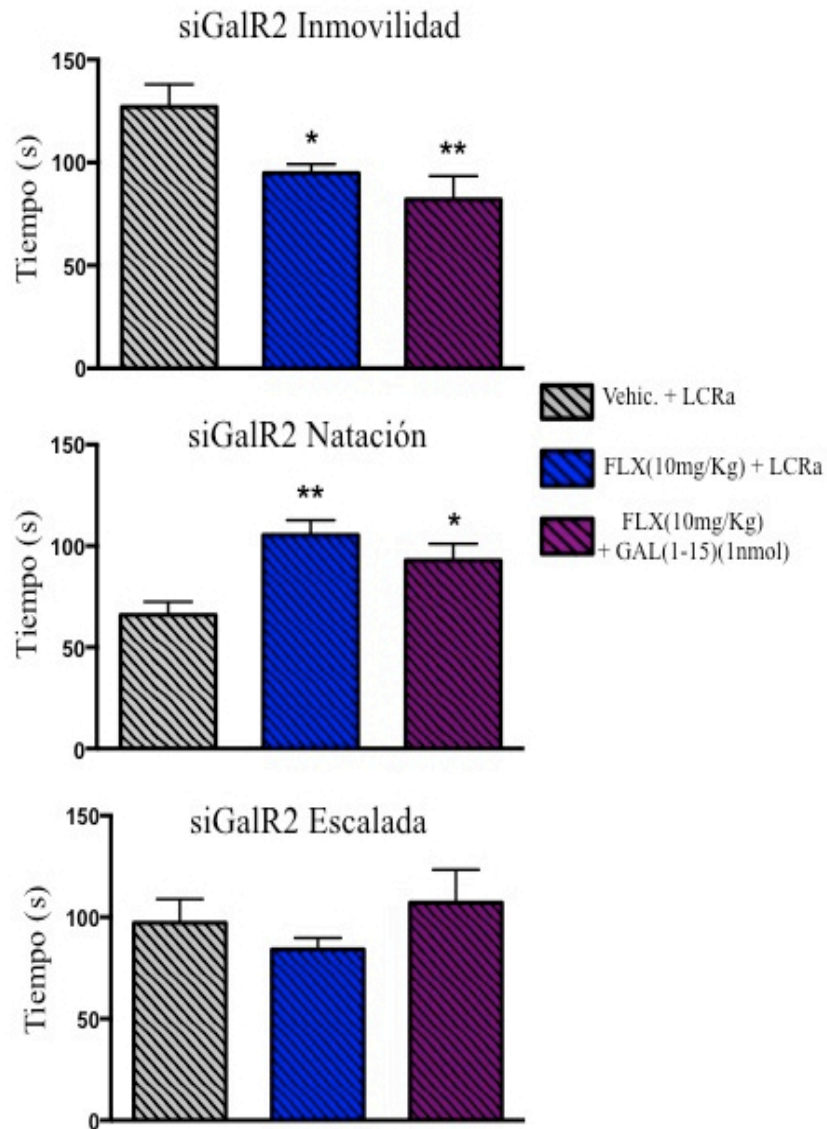
El M871(3nmol) o LCRA se administró por vía i.c.v. 15min antes del test. Todos los animales recibieron inyecciones s.c. de Veh. a las 23, 5 y 1h antes del test. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. No hay ningún efecto estadísticamente significativo según test de T-Student respecto controles. n= 7-8 animales por grupo.

Una vez determinado el papel fundamental del receptor GALR2 en la interacción GAL(1-15)-FLX por medio del antagonista M871, verificamos la implicación de dicho receptor mediante el uso de animales siGalR2 en el test de natación forzada. Al igual que en los experimentos anteriores, la GAL(1-15) o LCRA se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test y la FLX o el Veh. se inyectaron por vía s.c. con un patrón de inyecciones subcrónico.

En la figura 11 se observó como la coadministración de FLX(10mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) en ratas siGalR2 no produjo diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados en comparación con el grupo inyectado solo con FLX(10mg/Kg), lo que indica que en este modelo la GAL(1-15) no potenció los efectos de la FLX en el FST.

Además, en ratas siGalR2, la administración de FLX(10mg/Kg) indujo un descenso en el tiempo de inmovilidad ( $F_{2,17}=5.932$ ,  $p<0.05$ ; nk:  $p<0.05$ ) y un incremento en el tiempo de natación ( $F_{2,17}=5.932$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.01$ ) respecto al grupo control. Este efecto se reprodujo en el grupo tratado con FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol) donde se observó un descenso en el tiempo de inmovilidad ( $F_{2,17}=5.932$ ,  $p<0.05$ ; nk:  $p<0.01$ ) y un incremento en el tiempo de natación ( $F_{2,17}=5.932$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.05$ ) también comparado con el grupo control de ratas siGalR2. En conjunto estos resultados indican que el efecto de la FLX en este test es independiente de los receptores GALR2 y que el fragmento GAL(1-15) deja de tener un efecto potenciador sobre la dosis efectiva de la FLX en los animales siGalR2. Se sugiere

por tanto que el receptor GALR2 tiene un papel fundamental en la interacción GAL(1-15)-FLX.



**Figura 11:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada en ratas siGalR2 tras la coadministración de una dosis efectiva de FLX(10mg/Kg) sola o con GAL(1-15)(1nmol). La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. a las 23, 5 y 1h antes del test. La GAL(1-15) o el LCRA se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test. El grupo de Veh.+ LCRA fue usado como control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  respecto al grupo control según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori  $n = 7-9$  ratas por grupo.

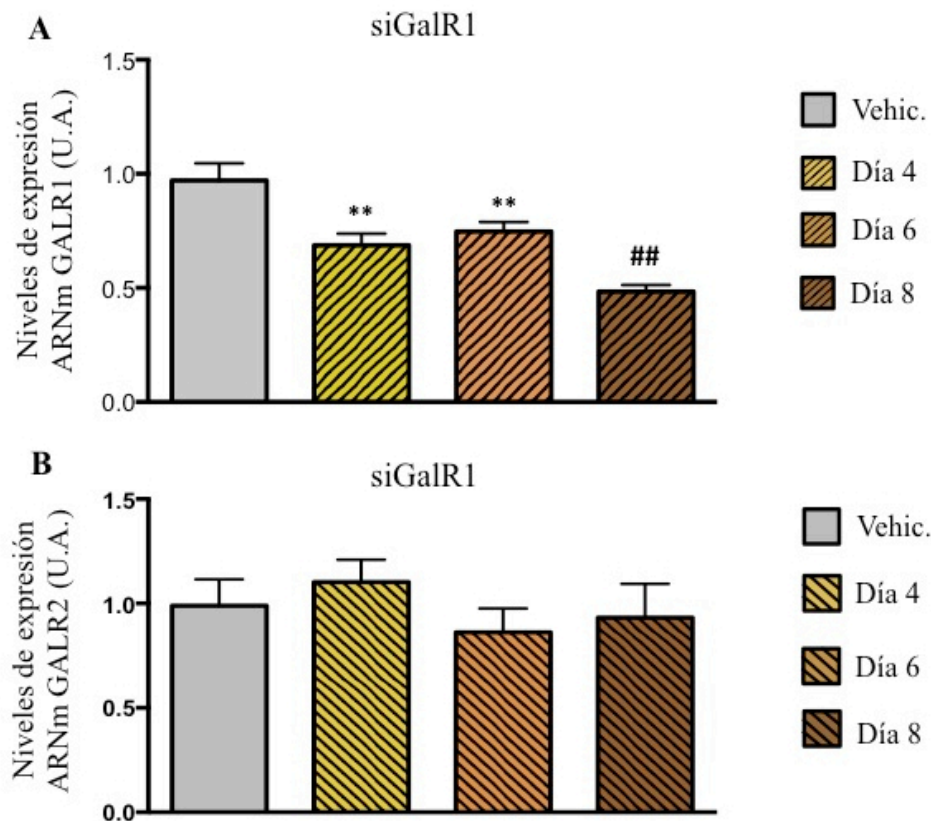
### **2.3- Evaluación del papel de los receptores GALR1 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando un modelo de silenciamiento génico siGalR1.**

Primero se realizaron los experimentos de qPCR-rt e inmunohistoquímica para determinar la reducción de los niveles de expresión del receptor GALR1 tras la administración i.c.v. del reactivo comercial siRNA-GALR1.

En la figura 12 se muestran los niveles de expresión de los ARN mensajeros de los receptores GALR1 **A)** y GALR2 **B)** tras la administración de 5µg del reactivo siRNA-GALR1. Los animales recibieron por vía i.c.v. el siRNA-GALR1 a los 4, 6 y 8 días antes de la obtención del hipocampo dorsal. Al grupo control se le administró Veh. por vía i.c.v. 8 días antes del sacrificio.

Se observó que en el cuarto y sexto día tras la administración de siRNA-GALR1 había una reducción en torno al 30% en los niveles de ARN mensajero de GALR1 ( $F_{3,26}=15.72$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.01$ ) respecto al grupo control. Esta reducción alcanzó el 50% al octavo día, con una diferencia significativa respecto a los días 4 y 6 ( $F_{3,26}=15.72$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.01$ ) (figura 12A). Al mismo tiempo, los niveles de expresión del ARN mensajero de GALR2 no se vieron modificados por la administración de siRNA-GALR1 (figura 12B).

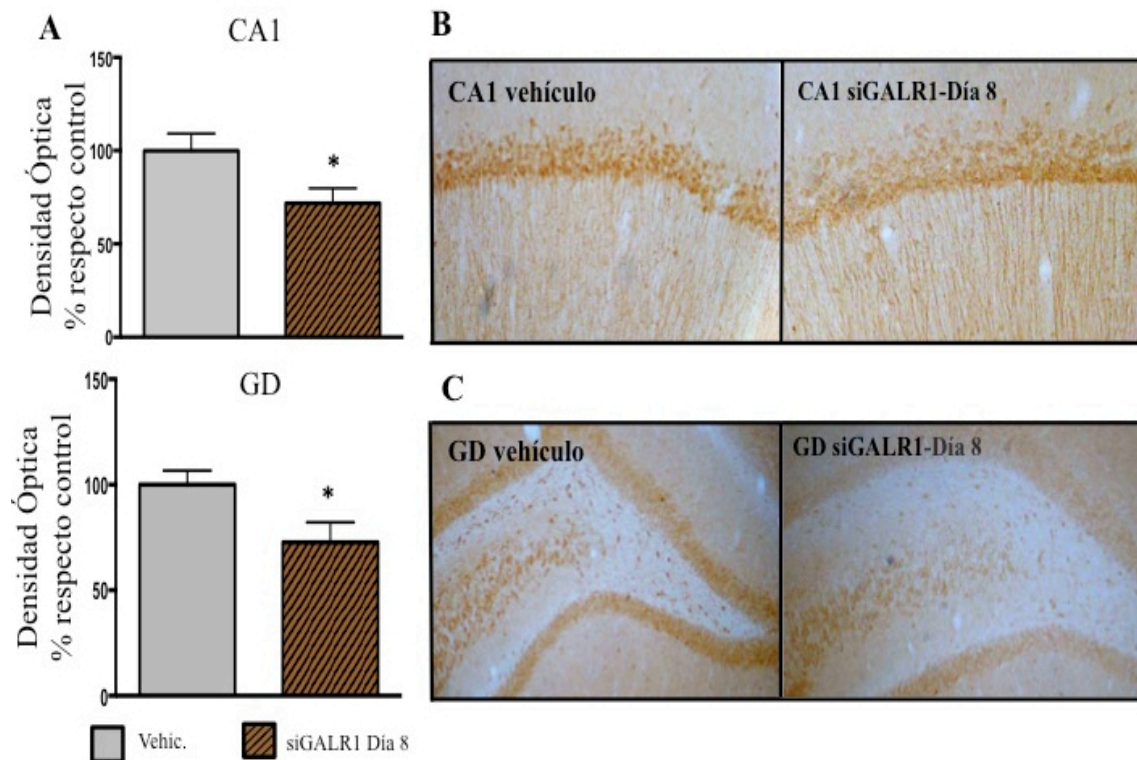
Estos resultados sugieren que al octavo día tras la administración i.c.v. de siRNA-GALR1, los niveles de expresión del ARN mensajero de GALR1 alcanzan su mínima expresión sin alterar los niveles de ARN mensajero de GALR2.



**Figura 12:** Representación gráfica de los niveles de expresión del ARN mensajero obtenido en el hipocampo dorsal medidos por qPCR-rt de los receptores GALR1 **A**) y GALR2 **B**) respecto al gen de referencia GAPDH en ratas siGalR1 sacrificadas a los 4, 6 y 8 días tras la inyección de siRNA-GALR1 por vía i.c.v. Los niveles de los respectivos ARN mensajeros están normalizados respecto la expresión del ARN mensajero correspondiente en animales inyectados con Veh. (Delivery media). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \*\* $p < 0.01$  frente al grupo Control; ### $p < 0.01$  frente a los días 4 y 6 según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori  $n=4$  ratas por grupo.

Una vez determinado el día de menor expresión del ARN mensajero del receptor GALR1, mediante inmunohistoquímica cuantificamos la expresión del receptor GALR1 en el giro dentado (GD) y la región CA1 del hipocampo dorsal de ratas siGalR1 al octavo día tras la administración i.c.v. de  $5\mu\text{g}$  de siRNA-GALR1. Se observó que tanto en el GD ( $t_{14}=2.359$ ,  $p < 0.05$ ) como en CA1 ( $t_{14}=2.317$ ,  $p < 0.05$ ) la administración de siRNA-GALR1 provocaba una reducción del 30% en relación al grupo control.

Los resultados obtenidos en los experimentos de qPCR-rt e inmunohistoquímica indicaron que al octavo día tras la administración del siRNA-GALR1 se observaba la máxima reducción en la expresión del receptor GALR1.



**Figura 13:** A) Representación gráfica de la expresión del receptor GALR1 en las regiones CA1 y GD del hipocampo dorsal estimada mediante la cuantificación de la densidad óptica (D.O.) de la señal obtenida por inmunohistoquímica a los 4, 6 y 8 días tras la inyección i.c.v. de 5µg siRNA-GALR1. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media \* $p < 0.05$  según test de T-Student respecto al grupo control.  $n = 7-8$  animales por grupo. Microfotografías de las regiones de CA1 **B**) y el GD **C**) representativas de la inmunohistoquímica realizada en animales inyectados con Veh. y animales 8 días después de la inyección i.c.v. de siRNA-GALR1.

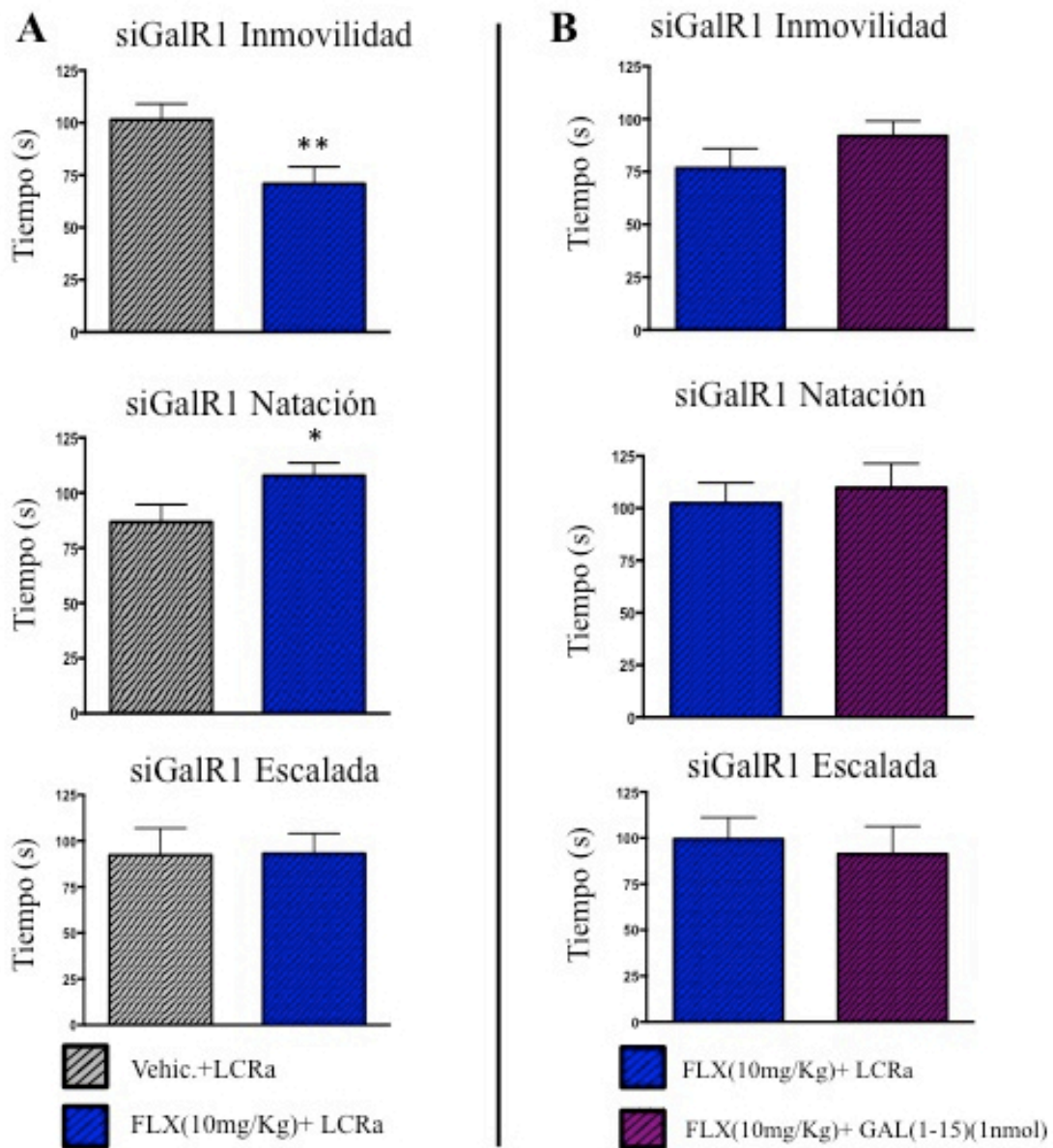


Para poder estudiar el papel de GALR1 en la interacción GAL(1-15)-FLX empleamos animales siGalR1 obtenidos como se describe en apartados anteriores. En la figura 14 se muestran los efectos de la administración de **A)** FLX(10mg/Kg) y **B)** de la coadministración de FLX(10mg/Kg) junto con GAL(1-15)(1nmol) en animales siGalR1.

En primer lugar se observó como la administración de FLX(10mg/Kg) en ratas siGalR1 produjo un descenso en el tiempo de inmovilidad ( $t_{16}=2.778$ ,  $p<0.01$ ) y un incremento en el tiempo de natación ( $t_{16}=2.041$ ,  $p<0.05$ ) en relación con el grupo control de ratas siGalR1. Estos resultados indican que la reducción del receptor GALR1 no afecta a la acción antidepresiva de la FLX en el FST.

Sin embargo, en los animales siGalR1, el fragmento GAL(1-15)(1nmol) coadministrado junto con FLX(10mg/Kg) no produjo diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados en comparación con la FLX(10mg/Kg).

Estos resultados indican que en el modelo de ratas siGalR1 la FLX conserva el efecto antidepresivo en el test de natación forzada, pero el fragmento GAL(1-15) deja de tener un efecto potenciador sobre el efecto de la FLX, sugiriendo un papel fundamental del receptor GALR1 en la interacción de GAL(1-15)-FLX.



**Figura 14:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada en ratas siGalR1 tras la administración de **A)** una dosis efectiva de FLX(10mg/Kg) o Veh. **B)** una dosis efectiva de FLX(10mg/Kg) sola o con GAL(1-15)(1nmol). La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. mediante un patrón de inyección subagudo a las 23, 5 y 1h antes de realizar el test de 5min y la GAL(1-15) o el LCRa se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  según test de T-Student respecto a control.  $n = 7-9$  ratas por grupo.

### **3- Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores serotoninérgicos 5-HT1A**

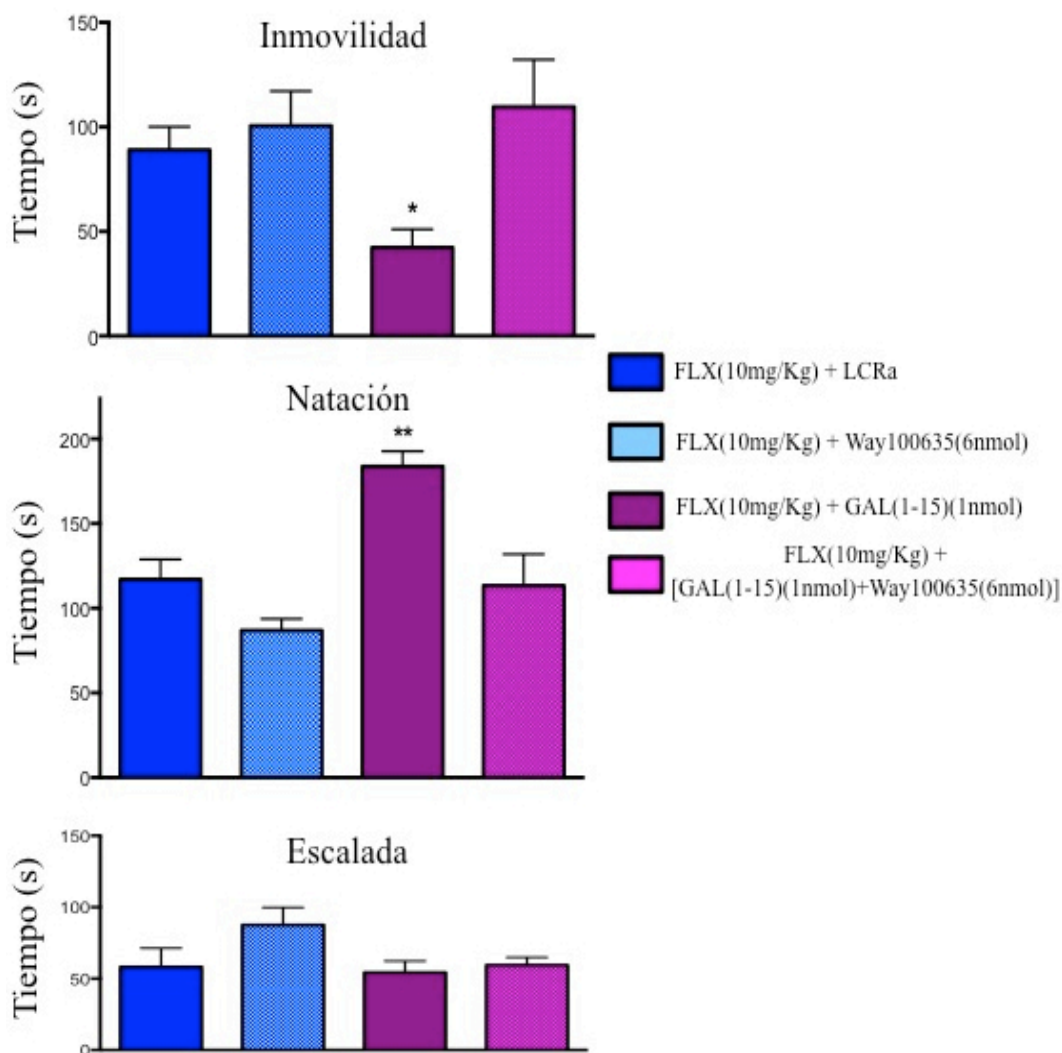
#### **3.1- Evaluación del papel del 5-HT1AR en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST, empleando el antagonista específico Way100635.**

Para estudiar la implicación de 5-HT1AR en la interacción GAL(1-15)-FLX empleamos el antagonista del 5-HT1AR Way100635. Los patrones de inyección fueron iguales a los descritos en experimentos anteriores. El Way100635, el fragmento GAL(1-15) o el LCRA se administraron solos o en combinación por vía i.c.v. 15min antes del test. En la figura 15 se muestra como la administración i.c.v. de Way100635 a una dosis de 6 nmol bloquea el efecto potenciador de GAL(1-15)(1nmol) sobre la FLX(10mg/Kg). Se observó como la administración con FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol) + Way100635(6nmol) produjo un bloqueo del efecto potenciador de GAL(1-15) sobre la FLX, ya que indujo un descenso en el tiempo de inmovilidad ( $F_{3,30}=4.243$ ,  $p<0.05$ ; nk:  $p<0.05$ ) y un incremento en el tiempo de natación ( $F_{3,29}=16.83$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.01$ ) comparado con el grupo tratado con FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol).

La presencia de Way100635(6nmol) no modificó la acción de la FLX(10mg/Kg) en ninguno de los parámetros observados, lo que sugiere que el antagonista del 5-HT1AR Way100635, con este patrón de administración, no interfiere en los efectos de la FLX.

En la tabla 8 se muestran los resultados del efecto del antagonista Way100635(6nmol) comparados con un grupo control. El Way100635 indujo un descenso en el tiempo de inmovilidad ( $t_{13}=2.671$ ,  $p<0.01$ ) y un incremento en el tiempo de escalada ( $t_{13}=2.2$ ,  $p<0.05$ ) comparado con el grupo control, sin afectar al tiempo de natación ( $t_{13}=0.213$ ,  $p=0.4171$ ).

En conjunto los resultados obtenidos sugieren la participación del 5-HT<sub>1A</sub>R en la potenciación del efecto de GAL(1-15) sobre la FLX. Además, aunque el antagonista Way100635 parece tener un efecto en el comportamiento *per se*, no parece que interfiera en el efecto de la FLX administrada a la dosis y tiempos indicados.



**Figura 15:** Representación gráfica de los parámetros de inmovilidad, natación y escalada tras la administración de FLX(10mg/Kg) sola o en combinación con Way100635(6nmol) y la administración de FLX(10mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) o GAL(1-15)(1nmol)+Way100635(6nmol). La FLX se administró por vía s.c. a las 23, 5 y 1h antes de realizar el test de 5min. La GAL(1-15) y/o el Way100635 o el LCRA se administraron por vía i.c.v. 15min antes del test. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  frente al resto de grupos según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori  $n = 7-9$  ratas por grupo.

<b>Tabla 8: Parámetros de inmovilidad, natación y escalada analizados en el FST tras la administración de Way100635(6nmol).</b>			
	<b>Inmovilidad</b>	<b>Natación</b>	<b>Escalada</b>
<b>Control</b>	130±4 (seg)	84±9 (seg)	67±8 (seg)
<b>Way100635(6nmol)</b>	101±12 (seg)**	87±5 (seg)	95±10 (seg)*

El Way100635 o LCRA se administró por vía i.c.v. 15min antes del test. Todos los animales recibieron inyecciones s.c. de Veh. a las 23, 5 y 1h antes del test. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. \*p<0.05, \*\*p<0.01 según test de T-Student respecto controles. n= 7-8 animales por grupo.

### 3.2- Estudio del efecto de la coadministración de GAL(1-15) y FLX sobre las características funcionales y la expresión del ARNm del 5-HT1AR en el RD y el hipocampo dorsal.

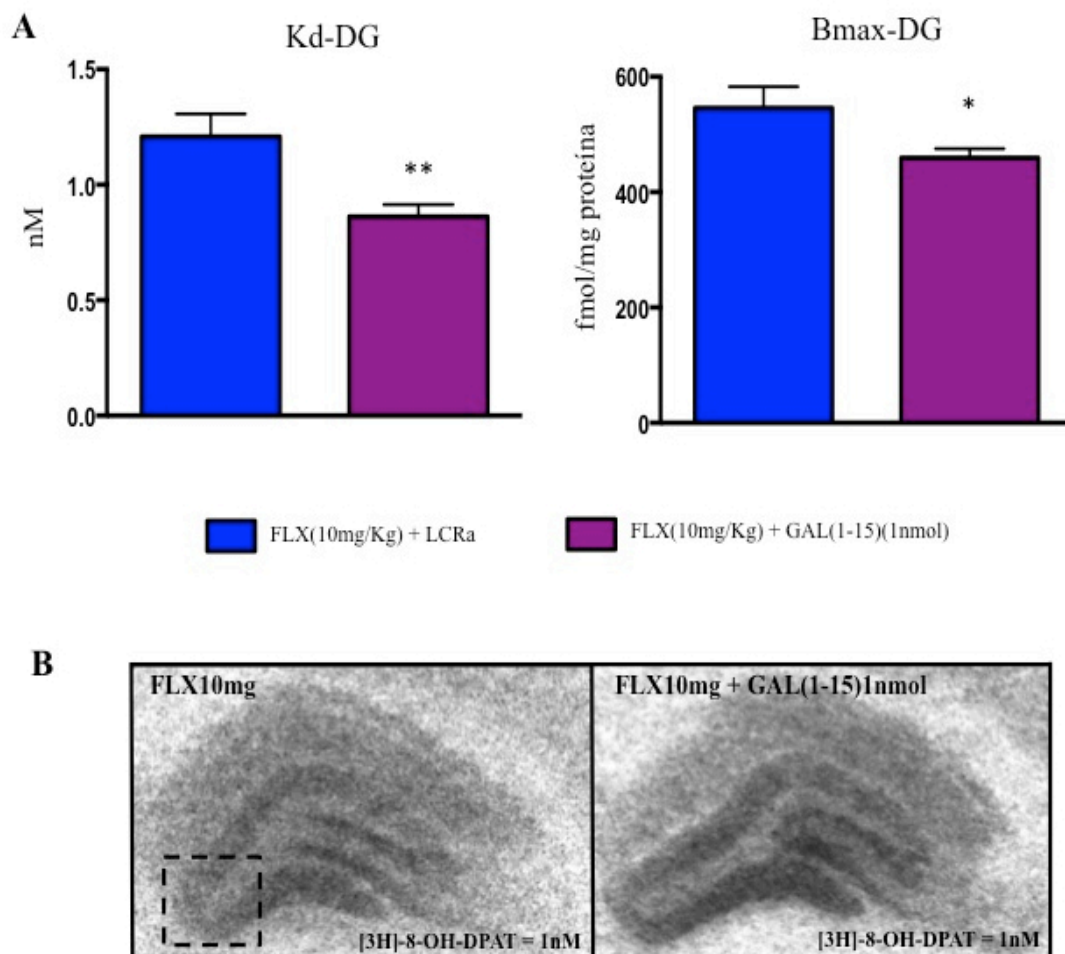
Para estudiar si la interacción observada en los experimentos de comportamiento producía alguna modificación en las características del 5-HT1AR, analizamos la afinidad (Kd) y el número de sitios de unión (Bmax) del 5-HT1AR en el GD, en la región CA1 del hipocampo dorsal y en el RD mediante un experimento de saturación empleando el agonista del 5-HT1AR 8-OH-DPAT marcado con <sup>3</sup>H. La FLX se administró por vía s.c. a las 23, 5 y 1,25h antes de sacrificar los animales y la GAL(1-15) o el LCRA se administraron por vía i.c.v. 30min antes del sacrificio.

En la figura 16 se observa que, en la región del GD del hipocampo, la coadministración de FLX(10mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) produjo un descenso de entorno al 30% en el valor de la Kd ( $t_9=2.916$ ,  $p<0.01$ ) y de un 15% en la Bmax ( $t_9=2.277$ ,  $p<0.05$ ) comparado con el grupo de animales inyectados con la dosis efectiva de FLX(10mg/Kg). En la figura 16 también se muestran imágenes representativas de los autorradiograma obtenidos en el experimento de autorradiografía con secciones de tejido incubadas con [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT a una concentración de 1nM.

Sin embargo, en el resto de regiones analizadas, la región CA1 del hipocampo y el RD (tabla 9), la administración de FLX(10mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) no

produjo ningún efecto significativo ni en la Kd ni en la Bmax comparado con el grupo de animales inyectados solo con FLX(10mg/Kg).

Los resultados sugieren que la coadministración de FLX(10mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) modificó los parámetros Kd y la Bmax del 5-HT<sub>1A</sub>R específicamente en la región del GD del hipocampo.



**Figura 16:** **A)** Representación gráfica de la Kd (afinidad) y la Bmax (densidad) de los 5-HT<sub>1A</sub>R en el GD tras la administración de FLX(10mg/Kg) sola o junto con GAL(1-15)(1nmol). La FLX se administró por vía s.c. a las 23, 5 y 1,25h antes de sacrificar los animales y la GAL(1-15) o el LCRa se administraron por vía i.c.v. 30min antes. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media \*p<0.05, \*\*p<0.01 según el test de T-Student respecto a FLX(10mg/Kg). n= 6 animales por grupo. **B)** Autorradiogramas representativos del aumento de afinidad del 5-HT<sub>1A</sub>R por el radioligando [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (1nM) obtenido en el GD por la coadministración de FLX con GAL(1-15).

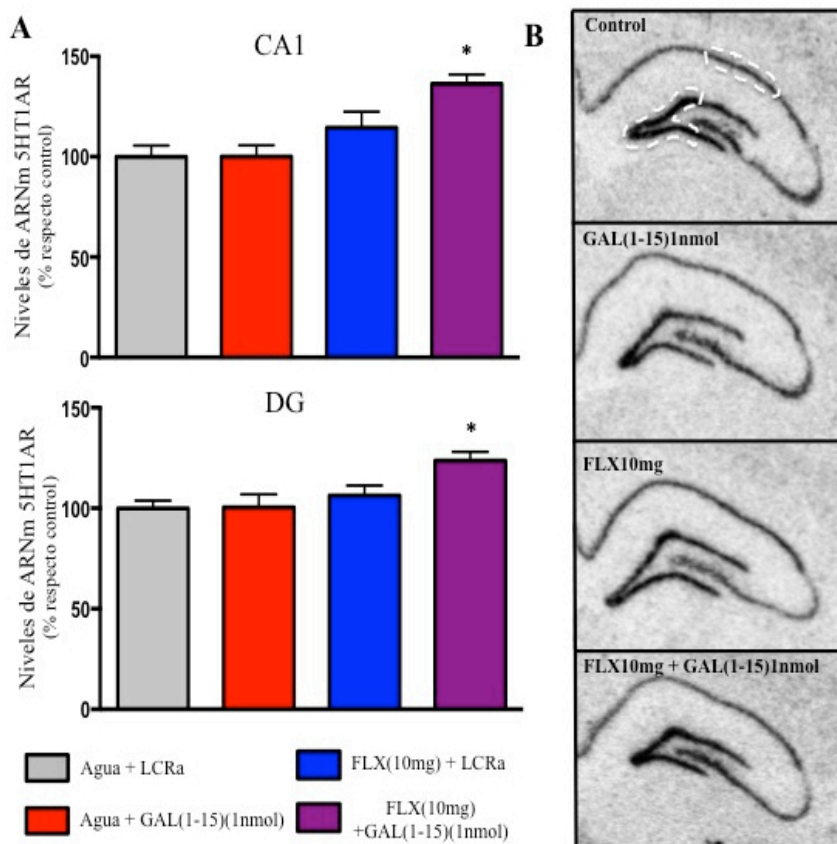
<b>Tabla 9: Resultados obtenidos en la Kd y Bmax en el RD y en CA1 tras la administración de FLX(10mg/Kg) sola o junto con GAL(1-15)(1nmol).</b>				
	<b>RD</b>		<b>CA1</b>	
	<b>Kd(nM)</b>	<b>Bmax (fm/mg prot)</b>	<b>Kd(nM)</b>	<b>Bmax (fm/mg prot)</b>
<b>FLX(10mg/Kg) +LCRa</b>	4940±1240	14,5±6	438,8±17	1,4±0,2
<b>FLX(10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)</b>	7781±2794	29,1	455,2±26	1,4±0,2

La FLX se administró por vía s.c. a las 23, 5 y 1,25h antes de sacrificar los animales y la GAL(1-15) o el LCRa se administraron por vía i.c.v. 30min antes. Los resultados se expresan como la media ± error estándar de la media. No se observa ningún efecto estadísticamente significativo según test de T-Student. n= 6 animales por grupo.

Además de estudiar las posibles modificaciones de las características del 5-HT1AR en la interacción GAL(1-15)-FLX, analizamos la expresión del ARN mensajero del 5-HT1AR en las mismas regiones mediante un experimento de *hibridación in situ*. La FLX se administró por vía s.c. a las 23, 5 y 1,25h antes de sacrificar los animales y la GAL(1-15) o el LCRa se administraron por vía i.c.v. 30min antes del sacrificio.

En la figura 17 se observa que la coadministración de FLX(10mg/Kg) con GAL(1-15)(1nmol) indujo un incremento significativo de los niveles de ARN mensajero del 5-HT1AR en las regiones del GD ( $F_{3,17}=5.033$ ,  $p<0.05$ ; nk:  $p<0.05$ ) y del CA1 ( $F_{3,18}=8.803$ ,  $p<0.01$ ; nk:  $p<0.05$ ) del hipocampo dorsal en comparación con el resto de grupos. Este efecto no se observó en el RD (tabla 10).

Los resultados sugieren que la coadministración de FLX(10mg/Kg) junto con GAL(1-15)(1nmol) induce un aumento de la expresión del ARN mensajero del 5-HT1AR en las regiones del CA1 y del GD en el hipocampo dorsal y no en el RD tras la administración de las sustancias con el patrón de inyecciones descrito.



**Figura 13:** A) Representación gráfica de los niveles de expresión del ARN mensajero del 5-HT1AR en las regiones del hipocampo dorsal del GD y CA1 tras la administración de FLX(10mg/Kg) sola o junto con GAL(1-15)(1nmol). La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. a las 23, 5 y 1,25h antes de sacrificar los animales y la GAL(1-15) o el Veh. se administraron por vía i.c.v. 30min antes. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  error estándar de la media de densidades ópticas expresadas en porcentaje respecto control. \* $p < 0.05$  frente al resto de grupos según un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls para las comparaciones a posteriori.  $n = 6$  ratas por grupo. B) Autorradiogramas representativos del GD mostrando el aumento en los niveles de expresión de ARN mensajero para 5-HT1AR tras la coadministración de FLX(10mg/Kg) y GAL(1-15)(1nmol).

**Tabla 10: Resultado de los niveles de expresión del ARN mensajero del 5-HT1AR en el rafe dorsal tras la administración de FLX(10mg/Kg) sola o junto con GAL(1-15)(1nmol).**

	Control	GAL(1-15) (1nmol)	FLX (10mg/Kg)	GAL(1-15)(1nmol) +FLX(10mg/Kg)
<b>5-HT1AR mRNA levels (%respecto control)</b>	100 $\pm$ 4	95,7 $\pm$ 5	98,2 $\pm$ 5	108,3 $\pm$ 7
La FLX o el Veh. se administraron por vía s.c. a las 23, 5 y 1,25h antes de sacrificar los animales y la GAL(1-15) o el Veh. se administraron por vía i.c.v. 30min antes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de porcentajes respecto control. No se observa ningún efecto estadísticamente significativo ( $F_{3,19} = 0,4128$ ; $p = 0,98$ ), $n = 6$ animales por grupo, según un ANOVA de una vía. $n = 6$ animales por grupo.				



# DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**Papel del fragmento GAL(1-15) en ansiedad y depresión. Desarrollo de modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2.**

Para estudiar los efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) realizamos experimentos empleando dos **pruebas conductuales de ansiedad y depresión** en animales de experimentación. El uso de modelos animales para investigar los trastornos del estado de ánimo, como el TDM, presenta limitaciones evidentes considerando la complejidad de la sintomatología asociado a dichos trastornos (DSM-V, 2013; McGonigle, 2014). Una de las principales limitaciones consiste en la traslación de algunos de estos síntomas característicos a los modelos animales, como por ejemplo la ideación suicida o los sentimientos de culpa (Deussing, 2006). Sin embargo, algunos de los síntomas más característicos asociados a los trastornos depresivos o de ansiedad se pueden estudiar de forma aislada en modelos animales. Así por ejemplo, el comportamiento de desesperanza puede ser evaluado de forma independiente en modelos animales (Hasler et al., 2004; Deussing, 2006), lo que permite el uso de estos animales de experimentación para estudiar el TDM. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se muestran los efectos de la administración central del fragmento GAL(1-15) en las pruebas de conducta animal del OF y el FST (Millón et 2015). Aunque ambas pruebas tienen una probada validez para determinar los efectos de distintas sustancias en relación con la ansiedad y la depresión, en la presente tesis hemos profundizado en los efectos del fragmento en dos pruebas de comportamiento diferentes como son el test de suspensión de la cola (Steru et al., 1985; Hinojosa et al 2005) y el test de luz/oscuridad (Crawley and Goodwin 1980; Hascoet and Bourin, 1998; Grivas et al., 2013; Desikan et al., 2014). Dichas pruebas han sido también ampliamente usadas para el estudiar la conducta relacionada con la depresión y ansiedad y presentan una excelente validez predictiva o farmacológica (Cryan et al., 2005; Hascoet and Bourin, 1998).

El **test de suspensión de la cola** es una de las pruebas de comportamiento más ampliamente utilizada para valorar la conducta depresiva y antidepresiva (Steru et al., 1985; Chermat et al., 1986). Este test está basado en la hipótesis de que un

animal normal sometido a una situación inescapable y aversiva alterna entre dos tipos de comportamientos, una conducta de escape o agitación y una conducta de parálisis o inmovilidad. El comportamiento de inmovilidad en este tipo de test se considera como una conducta de desesperanza indicadora de un efecto prodepresivo (Steru et al., 1985; Chermat et al., 1986). En el test, el animal permanece suspendido de la cola durante 6min a una altura suficiente como para que no pueda apoyarse. Durante el tiempo de realización del test las conductas de inmovilidad y los comportamientos activos, incluyendo los movimientos de lucha, mordisqueo del sistema de fijación de la cola y torsiones del cuerpo o tirones son registrados y analizados posteriormente (Hinojosa et al., 2005; Yan et al., 2014).

Este test tiene una probada validez farmacológica para analizar el posible efecto de un compuesto sobre la conducta de los animales ya que numerosos antidepresivos han mostrado una reducción en la conducta de inmovilidad en dicho test. Algunos ejemplos de fármacos antidepresivos probados en el test de suspensión de la cola son los de tipo tricíclicos como la despiramina o la desipramina y los antidepresivos inhibidores de la recaptación de serotonina Citalopran y Fluoxetina (Cryan et al., 2005).

Los resultados presentados en esta tesis muestran como en el test de suspensión de la cola, la administración i.c.v. de GAL(1-15) a una dosis de 3nmol produce un aumento en el tiempo de inmovilidad, sugiriendo un efecto prodepresivo de la GAL(1-15) en esta prueba. El hecho de que encontremos este efecto, demuestra la importancia del fragmento GAL(1-15) en la regulación de la conducta relacionada con la depresión al favorecer la aparición de conductas indicativas de estados depresivos. Los resultados presentados en esta tesis junto con los trabajos previos de nuestro grupo, donde se muestran un efecto prodepresivo de GAL(1-15) en el FST, indican claramente que la administración exógena de GAL(1-15) induce la aparición de conductas consistentemente asociadas con la depresión, al menos en dos test de desesperanza en animales de experimentación como son el FST y el test de suspensión de la cola.

Por otro lado, trabajos previos muestran que existen zonas específicas de unión para GAL(1-15) en el RD y el hipocampo, regiones consistentemente asociadas con la sintomatología depresiva y con los efectos beneficiosos de los antidepresivos (Dean and Keshavan, 2017; Descarries and Riad, 2012; Bortolozzi et al., 2012), por lo que estas regiones podrían estar involucradas en el efecto observado (Hedlund et al., 1992). Además, el efecto del fragmento GAL(1-15) se comparó con los efectos de la molécula completa a una dosis equimolar, obteniéndose unos efectos prodepresivos mucho más potentes en el FST con la administración del fragmento que con la administración del péptido completo (Millón et al., 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, una de las principales funciones asociadas a la GAL es la regulación del estado de ánimo. En relación con su papel en el TDM es relevante el hecho de que la GAL se sintetiza en regiones del SNC muy relacionadas con el TDM como el RD donde se coexpresa en las neuronas serotoninérgicas junto con la serotonina (Melander et al., 1986) y que su administración i.c.v. induce un descenso en los niveles de serotonina en zonas de proyección serotoninérgicas como la formación hipocampal y la corteza prefrontal (Fuxe et al., 1988). A nivel de comportamiento, estudios realizados empleando el FST muestran que la GAL produce un efecto prodepresivo en esta prueba cuando se administra en núcleos como el ATV (Weiss et al., 1998) o por vía i.c.v. (Kuteeva et al., 2007). Estos efectos prodepresivos han sido reproducidos en trabajos de nuestro grupo de investigación donde la administración de GAL a una dosis de 3nmol por vía i.c.v induce un aumento del tiempo de inmovilidad y una reducción en el tiempo de natación en el FST en ratas (Millón et al., 2015). Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la importancia de los efectos del fragmento en comparación con los de la molécula completa de GAL, ya que amplían los efectos del fragmento a otra tarea de comportamiento animal como es la del test de la cola.

En relación a los modelos animales desarrollados para estudiar las conductas relacionadas con la ansiedad, los más frecuentes son los modelos de ansiedad incondicionada, como el empleado en esta tesis doctoral, el **test de luz/oscuridad** (Crawley and Goodwin, 1980). Este test se basa en la aversión natural de los

roedores por las zonas iluminadas y en su tendencia a explorar nuevos entornos (Hascoet and Bourin, 1998). El test consiste en situar a los animales en un compartimento pintado de blanco e iluminado por una bombilla de 40W. El compartimento está conectado, por medio de una compuerta, a otro de iguales dimensiones pero pintado de negro y sin iluminación, permitiéndose la libre exploración del animal entre ambos compartimentos durante 5min (Grivas et al., 2013).

De los parámetros analizados en este test que nos permiten evaluar el estado de ansiedad del animal, el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado es el indicador más válido de un comportamiento ansiolítico o ansiogénico (Hascoet and Bourin, 1998). Por su parte, el tiempo de latencia de entrada por primera vez en el compartimento oscuro (latencia) así como el tiempo del primer retorno al compartimento iluminado (latencia de retorno) puede indicar un aumento general en la locomoción, un incremento de la desinhibición o considerarse un comportamiento indicativo de ansiedad (Desikan et al., 2014).

El test de luz/oscuridad ha demostrado ser muy útil en el estudio del comportamiento de ansiedad y es una de las pruebas más ampliamente utilizadas para evaluar los efectos ansiolíticos y ansiogénicos de distintas sustancias en roedores (Hascoet and Bourin, 1998). En este sentido, se ha demostrado que la administración de fármacos ansiolíticos clínicamente efectivos como el fenobarbital y el clordiazepóxido producen un descenso en el tiempo que pasan los roedores en el compartimento oscuro en este test, aumentando el tiempo en el comportamiento iluminado. Por el contrario, la administración de sustancias ansiogénicas como la  $\beta$ -carbolina FG-7142 reduce significativamente el tiempo que los animales pasan en el compartimento iluminado (Kilfoil et al., 1989).

En el test de luz/oscuridad la administración i.c.v. de GAL(1-15) a una dosis de 3nmol produce un incremento en el tiempo de permanencia en el compartimento oscuro así como un descenso en la latencia de entrada en el compartimento oscuro y un incremento en el tiempo de latencia de retorno al compartimento iluminado. Estos

resultados en conjunto sugieren que la administración exógena de GAL(1-15) induce una conducta ansiogénica en este test.

Es interesante destacar la intensidad del efecto ansiogénico de la GAL(1-15) en los resultados presentados en esta tesis en el test de luz/oscuridad, ya que son comparable con los efectos de fármacos con efectos ansiolíticos como el FG-7142 o el pentilenotetrazol (Kilfoil et al., 1989). Los resultados presentados en esta tesis son consistentes con los obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo empleando la prueba del OF (Millón et al., 2015), donde además determinamos que GAL(1-15) no provoca alteraciones locomotoras. Podemos concluir, por tanto, que la administración exógena de GAL(1-15) induce la aparición de conductas consistentemente asociadas con la ansiedad al menos en las pruebas de ansiedad incondicionada empleadas.

En relación a la molécula completa de GAL, su papel en la regulación de la ansiedad en roedores también es bien conocido y complejo. La GAL se sintetiza junto con la NA en el LC y en neuronas del hipotálamo que secretan CRF y vasopresina además de en otros núcleos relacionados con el comportamiento ansioso (Melander et al., 1986; Mazzocchi et al., 1992). Los efectos de la GAL sobre la ansiedad varían dependiendo del lugar de administración. Por ejemplo, la GAL administrada por vía i.c.v. produce un efecto ansiolítico en el test de conflicto de Vogel (Bing et al., 1993), pero cuando se administra directamente en la amígdala produce un efecto ansiogénico en la misma prueba (Möller et al., 1999). Además del lugar de administración, son varios los autores que indican que los efectos de la GAL dependen de las condiciones de estrés previas a las prueba de comportamiento (Holmes and Picciotto, 2006). Así se ha demostrado que los efectos ansiolíticos de la GAL solo se observan en animales testados bajo condiciones estresantes (Morilak., et al., 2003; Barrera et al., 2005).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Narváez et al., 2014; Millón et al., 2015) donde empleamos una prueba para evaluar la ansiedad incondicionada como el OF (Walsh, 1976), la administración i.c.v. de GAL a una dosis de 3nmol en

ratas no produjo ningún efecto modulador del comportamiento ansioso (Narváez et al., 2014; Millón et al., 2015). Sin embargo, como acabamos de mencionar, la administración del fragmento GAL(1-15) en la misma prueba por vía i.c.v. a una dosis equimolar, si produce una respuesta ansiogénica en este test, ya que se observó un descenso del tiempo de permanencia y número de entradas en la zona central (Millón et al., 2015), resultados indicativos de un comportamiento ansiogénico en el OF (Prut y Belzung, 2003). La prueba del OF también permite valorar los posibles efectos locomotores que pudiera tener la administración de diferentes sustancias sobre la conducta de los animales y que pudieran enmascarar la explicación de los resultados en relación a la ansiedad (Campos et al., 2013). La administración de GAL(1-15) 3nmol por vía i.c.v. no modifica la velocidad media de los animales ni la distancia total recorrida por los mismos durante el desarrollo de la prueba (Millón et al., 2015).

Los estudios conductuales realizados en esta tesis con el fragmento GAL(1-15) nos permiten concluir que este péptido induce un potente efecto ansiogénico y prodepresivo, contribuyendo a clarificar la implicación y el papel que juega el fragmento GAL(1-15) en los trastornos del estado de ánimo.

Los efectos diferenciales del fragmento GAL(1-15) respecto a la molécula completa de GAL, a nivel conductual, en la regulación del estado de ánimo se suman a otros efectos fisiológicos previamente demostrados en el SNC y confirman un papel específico de este péptido en la comunicación neuronal. Así por ejemplo, en la regulación e integración de la respuesta cardiovascular la administración intracisternal de GAL o GAL(1-15) induce efectos diferentes en la presión arterial y el ritmo cardiaco (Narváez et al., 1994; Narváez et al., 2000). Los estudios realizados para profundizar en los mecanismos subyacentes implicados en la mediación de estos efectos cardiovasculares también mostraron que ambos péptidos interactúan de forma distinta con receptores implicados en la regulación e integración de la respuesta cardiovascular como son los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos y de angiotensina II (Díaz-Cabiale et al., 2000; Díaz-Cabiale et al., 2005a) así como con los receptores de NPY en el NTS (Díaz-Cabiale et al., 2010).



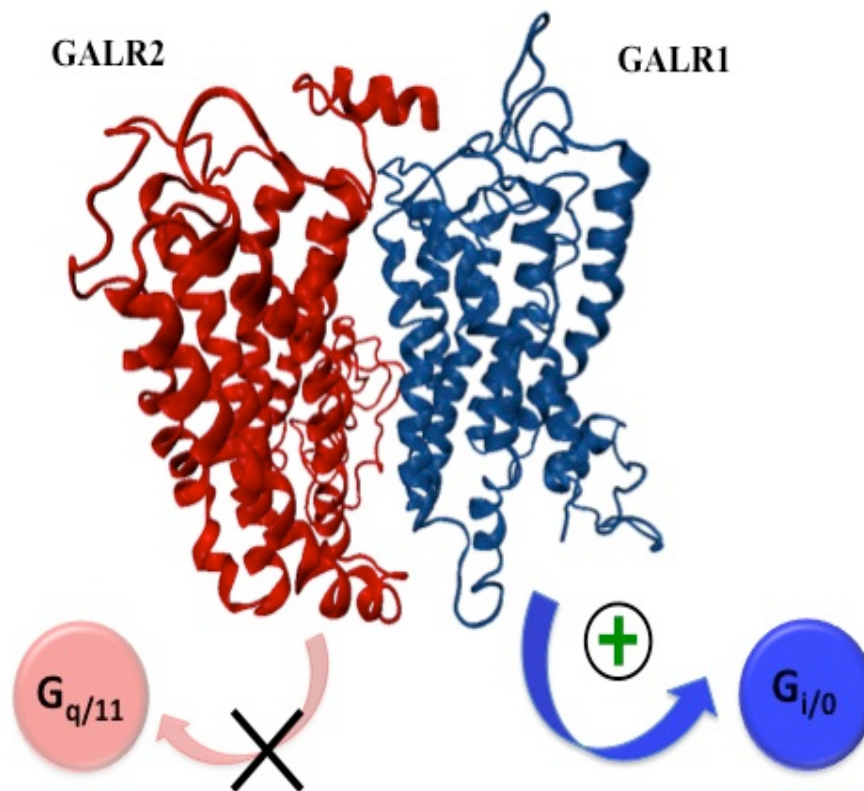
Los distintos mecanismos moleculares que median las acciones de GAL(1-15) en comparación con la GAL también se han puesto de manifiesto en experimentos de autorradiografía realizados con el fragmento marcado radiactivamente con  $I^{125}$ , que han revelado la presencia de sitios de unión con mucha mayor afinidad por el fragmento GAL(1-15) que por la molécula completa en regiones muy relacionadas con las funciones fisiológicas asociadas a GAL(1-15) como la corteza cerebral, el hipocampo dorsal, el cuerpo estriado, el hipotálamo y algunas regiones del tronco encefálico como la porción dorsal del núcleo del tracto solitario (NTS) (Hedlund et al., 1992). Estudios más recientes realizados con la técnica del PLA en secciones de tejido del RD y del hipocampo, así como estudios celulares realizados con la técnica del BRET (Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al., 2015), revelan además que es necesaria la formación de heterodímeros GALR1-GALR2 en estas regiones para que el fragmento pueda tener efecto.

Los resultados presentados en esta tesis confirman el papel relevante de GAL(1-15) en distintas funciones del SNC en ratas y en concreto, asociado a las alteraciones del estado de ánimo como los comportamientos de ansiedad y depresión. Es interesante destacar que desde un punto de vista clínico, además del conjunto de síntomas asociados al TDM, en los manuales diagnósticos la angustia ansiosa es un especificador que en el TDM se ha asociado con un mayor riesgo de suicidio, una mayor duración de la enfermedad y una mayor probabilidad de falta de respuesta al tratamiento (DSM-V, 2013). El perfil de comportamiento observado con la administración de GAL(1-15) nos permite sugerir la importancia de este neuropéptido como diana farmacológica para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del TDM, especialmente cuando presenta una sintomatología de angustia ansiosa.

Como acabamos de mencionar, estudios desarrollados en nuestro grupo de investigación han descrito que el fragmento GAL(1-15) actúa a través de la formación del complejo heteroreceptor GALR1-GALR2 (Fuxe et al., 2008, 2012; Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al., 2015). Estos heteroreceptores se han localizado en regiones cerebrales clave para el TDM como son el hipocampo dorsal



y el RD (Millón et al., 2015). Los mecanismos de acción involucrados en la formación de estos complejos de heteroreceptores GALR1-GALR2 implican fenómenos de cambio de señalización intracelular donde se inhiben las vías de señalización mediadas por Gq/11 de los protómeros GALR2 y se potencian las vías mediadas por Gi/0 de los protómeros GALR1 (figura 1) (Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al. 2015).



**Figura 1:** Esquema representativo del cambio de señalización intracelular que se produce en la formación del heterodímero GALR1-GALR2, donde el protómero GALR2 deja de activar la vía mediada por Gq/11 y se potencia la vía Gi/0. Modificado de Borroto-Escuela et al., 2014 y empleando los modelos de homología generados en esta tesis.

Por otro lado, la determinación estructural de los receptores implicados en la formación de los heterodímeros puede ser de gran relevancia para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos (Pierce et al., 2002; Overington et al., 2006;

Constanzi and Wang, 2014) así como para profundizar en los mecanismos moleculares que median en la formación del heterodímero GALR1-GALR2.

Hasta la fecha no existen estructuras tridimensionales disponibles de los receptores GALR1 y GALR2 y los modelos computacionales desarrollados, no incluyen la secuencia completa de los receptores, excluyéndose parte o todos los aminoácidos de los extremos N y C-terminales (Jurkowski et al., 2013; Hui et al., 2016). Estos modelos computacionales se han usado para el estudio de la interacción entre distintos ligandos, como la GAL y algunos antagonistas, y los receptores galaninérgicos, señalando algunos residuos de los receptores que pueden ser claves para la activación de los receptores (Hui et al., 2016).

En esta tesis, dado que estamos interesados en estudiar no solo los mecanismos moleculares implicados en la interacción entre ligandos y receptores sino también en los mecanismos implicados en la formación de los heterodímeros GALR1-GALR2, desarrollamos por primera vez modelos de homología que sí incluyen la secuencia completa de los receptores, incluyendo los extremos N y C-terminales completos.

Son varios los trabajos computacionales dedicados al análisis de la interacción entre GPCRs que señalan que además del papel de los segmentos transmembrana en la formación de los heterodímeros también es importante la participación de la hélice 8, situada en el extremo C-terminal de los GPCRs, en la formación de los complejos de receptores (Filizola et al., 2006; Simpson et al., 2010; Gorinski et al., 2012; Johnson et al., 2012). Además, como acabamos de mencionar, en el caso particular de la formación del heterodímero GALR1-GALR2 se produce un cambio de señalización intracelular de forma que se inhibe la vía Gq/11 y se potencia la Gi/0. Dado que la hélice 8, situada en el extremo C-terminal, está implicada en los mecanismos de señalización intracelular (Sensoy, 2014) y puede, además, interactuar con la fosfolipasa C (Huynh et al., 2009) activada por Gq/11, podemos suponer que el extremo C-terminal de GALR2 sufre algún tipo de modificación o interacción en la formación del heterodímero clave para este cambio de señalización. Estos datos y el hecho de no poder descartar el papel del extremo N-terminal en la formación del

heterodímero GALR1-GALR2 nos llevaron a desarrollar modelos de homología que incluyeran la secuencia completa de aminoácidos de los receptores GALR1 y GALR2.

**El desarrollo de los modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2** se llevó a cabo empleando varias herramientas informáticas integradas en el software DiscoveryStudio siguiendo 5 pasos secuenciales: A- Búsqueda de proteínas con estructuras 3D conocidas relacionadas con la secuencia diana (alineamiento). B- Selección de las estructuras que se utilizarán como plantillas C- Alineamiento de las estructuras de las plantillas con la secuencia modelo. D- Ensamblaje del modelo de homología. E- Evaluación del modelo y refinamiento (Eswar et al., 2007; Fiser, 2010).

Así, tanto para GALR1 como para GALR2 se buscaron y seleccionaron las secuencias de proteínas cristalizadas en la base de datos PDB que tuvieran una identidad secuencial superior al 20% comparado con las secuencias de ambos receptores. En el caso de los GPCRs este porcentaje de similitud de secuencia es suficiente debido a la fuerte conservación estructural de este tipo de receptores (Gonzalez et al., 2014). Además, las proteínas seleccionadas en esta fase, también se eligieron considerando un emparejamiento que cubriera lo máximo posible de la secuencia de GALR1 y casi toda la secuencia de GALR2, incluyendo los extremos N y C-terminales. Mediante los programas MODELLER (Eswar et al., 2007) y Align123 (Thompson et al., 1994), ambos integrados en el software DiscoveryStudio, se procedió a realizar el alineamiento estructural de los receptores seleccionados mediante la superimposición de las regiones estructuralmente equivalentes (Kufareva and Abagyan, 2012). Posteriormente se generaron 20 modelos de homología para cada receptor a partir de la secuencia de los receptores y la estructura superpuesta de las proteínas usadas como moldes. De estos modelos, escogimos uno por cada receptor según el parámetro DOPE (Shen and Sali, 2006). Por último, los modelos se refinaron aplicando una herramienta de predicción de ionización de los residuos considerando un pH fisiológico (Spasov and Yan, 2008)

y una posterior minimización para relajar las tensiones derivadas de la aparición de cargas en las estructuras modeladas tras la ionización de los residuos.

Las estructuras obtenidas en el proceso de modelización realizado con el software DiscoveryStudio se ajustan a la estructura general de los GPCRs (Costanzi and Wang, 2014), consistente en un extremo N-terminal extracelular, 7 hélices transmembrana conectadas por 3 bucles extracelulares y 3 bucles citosólicos y una octava hélice en el extremo C-terminal citosólico que se dispone paralelo al plano de la membrana plasmática. Estos modelos incluyen la secuencia completa de aminoácidos de ambos receptores.

En el caso de GALR2, nuestro modelo de homología incluye un puente disulfuro característico de algunos tipos de GPCR que se forma entre una cisteína del tercer segmento transmembrana y una cisteína del segundo bucle extracelular (Baldwin, 1994). Esta característica estructural en nuestro modelo se ha generado de forma automática, mientras que en otros modelos previos tuvo que ser incluida manualmente (Hui et al., 2016).

El análisis visual de nuestros modelos muestra, además, como los residuos de aminoácidos implicados en la interacción entre distintos ligandos con los receptores galaninérgicos se disponen hacia la cavidad interna que forman los segmentos transmembrana, confirmando una orientación adecuada de dichos residuos respecto un hipotético lugar de unión con la GAL. Dicha cavidad, determinaría el lugar de interacción entre ligandos y receptores. La importancia de estos aminoácidos ha sido determinada en varios trabajos de mutagénesis (Kask et al., 1998; Lundstrom et al., 2007; Runesson et al., 2010).

En conclusión, en esta tesis presentamos los primeros modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2 completos. A falta de estudios que determinen la estructura precisa de estos receptores, estos modelos cumplen los requisitos estructurales adecuados para poder estudiar los mecanismos implicados en la formación del heterodímero GALR1-GALR2 y determinar así posibles aminoácidos

claves en dicha interacción. Además, dado que el fragmento GAL(1-15) presenta una mayor afinidad por el heterodímero que la molécula completa de GAL, con estos modelos podemos estudiar también las diferencias estructurales en los lugares de unión entre ligando y receptores y explicar estas diferencias de afinidades.

El desarrollo de estos modelos de homología podrían también ser la base para poder diseñar fármacos bivalentes que puedan actuar como agonista del complejo heterodimérico GALR1-GALR2. Desde hace algunos años este tipo de fármacos se desarrollan como sondas moleculares para el estudio de dímeros de receptores. Los fármacos bivalentes constan de dos fármacos, cada uno de ellos con afinidades y actividades específicas para cada uno de los protómero integrantes del dímero, unidos por espaciador diseñado específicamente (Kührom et al., 2011; Gomes et al., 2016; Bonifazi et al., 2017). El desarrollo de este tipo de fármacos bivalentes tiene un gran interés comercial y potencial uso clínico debido al creciente número de evidencias de la participación de complejos de receptores en diversas patologías.

### **Interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo fluoxetina: papel de los receptores GALR1, GALR2 y del receptor serotoninérgico 5-HT1A.**

Una vez descrito el papel del fragmento GAL(1-15) en la depresión y la ansiedad y acorde con los objetivos especificados anteriormente, estudiamos el uso del fragmento GAL(1-15) como posible herramienta de potenciación del efecto antidepresivo de la FLX.

Como se ha dicho en apartados anteriores de esta tesis. La hipótesis más antigua sobre la patofisiología del TDM postula que el descenso en los niveles de las monoaminas subyace como la principal causa de la enfermedad (Krishnan and Nestler, 2008). Los primeros tratamientos farmacológicos desarrollados a partir de los años 50, y desde entonces los más utilizados, se basan principalmente en fármacos que elevan la actividad serotoninérgica (Wong and Licinio, 2004; Khun et al., 2017). Específicamente los fármacos de tipo ISRSs son los más comúnmente utilizados para el tratamiento del TDM y en particular la FLX es uno de los fármacos

de primera elección debido a su alta efectividad, la buena tolerancia mostrada por los pacientes y la elevada tasa de adhesión al tratamiento que presenta (Iruela et al., 2009; Bonet de Luna et al., 2011).

A pesar de esto, el uso de ISRSs presenta varios problemas. Por ejemplo, para que este tipo de antidepresivos sean efectivos, se requiere de un periodo como mínimo de dos semanas de tratamiento, donde además se puede producir un agravamiento de los síntomas con un incremento en el riesgo de autolisis de los pacientes (Alvarez and Viñas, 2010; Khun et al., 2017). Acorde con las directrices generales de la prescripción de antidepresivos, las dosis iniciales de los tratamientos con ISRSs suelen ser bajas, pudiendo incrementarse en semanas sucesivas si no se consiguen los efectos deseados antes de intentar cambiar a otro tipo de medicación (Khun et al., 2017). Otro problema a considerar es que la tasa de remisión conseguidas con el uso de estos antidepresivos deja un elevado número de pacientes, que no responden al mismo (Mathew et al., 2008; Travedi et al., 2006; Zhou et al., 2015), presentando lo que se conoce como depresión resistente al tratamiento (DRT) (Fava and Davidson, 1996; Shelton et al., 2010).

Desde el descubrimiento de los fármacos de tipo ISRSs se han desarrollado varias líneas de investigación para generar nuevos fármacos cuya diana farmacológica implica a otros sistemas de neurotransmisores distintos a la serotonina, aunque hasta la fecha pocos de estos fármacos han sido aprobados por la FDA (Mathew et al., 2008) y en el informe de 2015 sobre el uso de medicamentos publicado por la agencia española de medicamentos y productos sanitarios se señala a los antidepresivos de tipo ISRS como los más consumidos. Este es el caso de la ketamina, un anestésico antagonista de los receptores NMDA glutamatérgicos que a dosis subanestésicas muestra efectos antidepresivos muy rápidos y duraderos (Mathew et al., 2008). Aunque las principales limitaciones del uso de la ketamina como antidepresivo lo constituyen sus efectos disociativos y su potencial uso abusivo, las investigaciones preclínicas se centran en descubrir los mecanismos de acción subyacentes asociados con los efectos antidepresivos de la ketamina para poder encontrar nuevas dianas terapéuticas (Zanos and Gould 2018).

Además del desarrollo de nuevos fármacos. Uno de los abordajes farmacológicos que ha tenido buenos resultados para mejorar los tratamientos basados en el uso de los antidepresivos de tipo ISRSs, son las estrategias de potenciación que consisten en la coadministración de ISRSs con otras sustancias para mejorar sus efectos (Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015). Mediante estas estrategias se pretende reducir el tiempo necesario para obtener efectos clínicos con el uso de los ISRSs o conseguir beneficios terapéuticos en pacientes con DRT (Fava and Davidsson, 1996; Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015). En este sentido la FLX también ha sido uno de los antidepresivos más empleados en las estrategias farmacológicas de potenciación en estudios clínicos (Shelton et al., 2010).

Para estudiar la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y la FLX diseñamos varios bloques experimentales. Primero estudiamos la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y FLX en el FST en ratas (Porsolt et al. 1977; Detke and Lucki, 1996), después evaluamos el papel de los receptores galaninérgicos GALR1 y GALR2 en dicha interacción en esta misma tarea comportamental y por último evaluamos el papel del 5-HT<sub>1A</sub>R en la interacción GAL(1-15)-FLX en el FTS, además de estudiar los efectos de la coadministración de GAL(1-15) y FLX sobre las características funcionales y/o la expresión de los 5-HT<sub>1A</sub>R mediante experimentos de autorradiografía e *hibridación in situ* en el RD y el hipocampo dorsal.

En el caso concreto de la FLX, aunque es bien conocido que su principal diana farmacológica son los 5-HTT, existen numerosas evidencias que señalan que el papel de los 5-HT<sub>1A</sub>R, tanto en su distribución presináptica como postsináptica, es fundamental para obtener los efectos antidepresivos deseados (Detke et al., 1997; De Vry et al., 2004; Estada-Camarena et al., 2006; Sghendo and Mifsud, 2011). Concretamente, y debido a que los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> del RD inducen una inhibición de la liberación de la serotonina (Bortolozzi et al., 2012; Artigas, 2013; Nautiyal and Hen, 2017), son muchas las investigaciones que apuntan a que un tratamiento prolongado con FLX induce por un lado la desensibilización de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en el RD y por otro un incremento de la funcionalidad de los



5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos, por ejemplo en el hipocampo (Hajszan et al., 2005; Castro et al., 2008; Descarries and Riad, 2012; Samuels et al., 2015).

Dado que el fragmento GAL(1-15) media sus acciones a través del heterodímero GALR1-GALR2, con la interacción GAL(1-15)-5-HT<sub>1A</sub>R se ha postulado la existencia de complejos de receptores GALR1-GALR2-5-HT<sub>1A</sub>R en el RD y el hipocampo. A nivel conductual, nuestro grupo de investigación también ha demostrado que la coadministración de GAL(1-15) a dosis subumbrales con el agonista específico del 5-HT<sub>1A</sub>R 8-OH-DAPT en el FST, produce un efecto facilitador de la acción antidepresiva del 8-OH-DPAT, siendo más intenso que el obtenido al coadministrar GAL y 8-OH-DPAT. De tal forma, que el complejo GALR1-GALR2-5-HT<sub>1A</sub>R podría constituir la diana farmacológica, donde el fragmento GAL(1-15) podría potenciar dichos efectos antidepresivos (Millón et al., 2016). En base a estos trabajos previos de nuestro grupo de investigación decidimos utilizar el fragmento GAL(1-15) en combinación con el antidepresivo FLX para estudiar si GAL(1-15) modificaba las acciones antidepresivas de dicho fármaco en el FST.

El FST es una de las pruebas de comportamiento animal más ampliamente utilizadas para estudiar la conducta depresiva y antidepresiva, siendo un modelo de gran utilidad para predecir la eficacia clínica de sustancias antidepresivas (Bogdanova et al., 2013). El test consta de dos sesiones. En la primera sesión, se fuerza al animal a nadar durante 15min en un cilindro con agua de forma que no pueda apoyarse en ninguna parte (Detke and Lucki, 1996). Esta situación supone un estresor que lleva al animal a un estado de desesperanza que manifestará mediante una conducta pasiva de inmovilidad (Porsolt et al., 1977; West, 1990). La segunda sesión del test se realiza en el mismo cilindro 24h después, forzando al animal a nadar de nuevo durante 5min y observando su comportamiento. El tiempo de inmovilidad es la principal medida de este test, interpretándose como una conducta de desesperanza característica de los estados depresivos (Castagne et al., 2009).

Existen numerosos fármacos antidepresivos que al ser administrados entre las dos fases del test inducen un descenso de la conducta de inmovilidad en esta prueba (Cryan et al., 2005). Las conductas activas de natación y escalada permiten distinguir, además, entre los mecanismos de acción de los antidepresivos. Los antidepresivos de tipo ISRS como la FLX incrementan el tiempo de natación mientras que aquellos antidepresivos como la desipramina que modifican la transmisión noradrenérgica, incrementan la conducta de escalada (Detke et al., 1995a, 1995b). Este test, además, se ha empleado para el estudio de tratamientos combinados que potencian los efectos terapéuticos de la FLX con otras sustancias (Vázquez-palacios et al., 2005; Estrada-Camarena et al., 2004, 2008).

En un primer bloque experimental y para **estudiar la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y la FLX**, coadministramos una dosis subumbral de GAL(1-15) previamente descrita por nuestro grupo de investigación (Millon et al., 2015), junto con dosis efectivas y no efectivas de FLX (Estrada-Camarena et al., 2003).

Antes de realizar los experimentos de coadministración de FLX con GAL(1-15) determinamos las dosis efectiva y subumbral de FLX en el test, administrando por vía s.c. el antidepresivo entre las dos sesiones de natación forzada. Concretamente a las 23, 5 y 1h antes de la segunda sesión de natación forzada. Este patrón de inyecciones ha demostrado producir efectos en el FST similares a los obtenidos después del tratamiento crónico, imitando los efectos de dosis clínicamente eficaces en humanos (Detke et al., 1997). Los resultados obtenidos con las dosis de FLX de 2.5mg/Kg y 10mg/Kg en el FST con este patrón de inyección, confirman que la dosis de FLX 2.5mg/Kg no reduce el tiempo de inmovilidad ni afecta al resto de conductas, mientras que la dosis de FLX de 10mg/Kg reduce significativamente el tiempo de inmovilidad e incrementa el tiempo de natación sin afectar a la conducta de escalada, indicando que esta dosis presenta efectos antidepresivos. Estos resultados concuerdan con estudios previos acorde con la bibliografía, así Estrada-Camarena et al., 2003 donde se observó una disminución en el tiempo de

inmovilidad similar al obtenido en nuestros experimentos con una dosis de FLX de 10mg/Kg.

Una vez conocida tanto la dosis efectiva como la subumbral de FLX y para evaluar la interacción entre GAL(1-15) y FLX, realizamos un experimento coadministrando dosis subumbrales de GAL(1-15)(1nmol) por vía i.c.v. 15min antes del test, junto con una dosis no efectiva de FLX(2.5mg/Kg) por vía s.c. El tratamiento produjo una disminución en el tiempo de inmovilidad y un aumento en el tiempo de natación sin afectar a la conducta de escalada. Este perfil de comportamiento antidepresivo obtenido al coadministrar dosis subumbrales de GAL(1-15) y FLX, es similar al observado con la dosis efectiva de FLX en este test. Dado que los efectos de GAL(1-15) con dosis efectivas en este test son prodepresivos (Millón et al., 2015) y la dosis de FLX de 2.5mg/Kg no modifican las conductas analizadas en el FST, podemos sugerir que existe una interacción entre GAL(1-15) y FLX que a nivel de comportamiento facilita las acciones antidepresivas de la FLX en el FST.

Una vez determinada la interacción entre GAL(1-15) y FLX a dosis subumbrales, estudiamos en otro experimento la capacidad de GAL(1-15) de modular las acciones de una dosis efectiva del antidepresivo, FLX 10mg/Kg. Los resultados muestran como los efectos antidepresivos de la FLX se ven intensamente potenciados por la infusión de GAL(1-15), con una reducción de hasta el 50% en el tiempo de inmovilidad y un incremento del 40% en el tiempo de natación. En este mismo experimento comparamos los efectos de coadministrar la dosis efectiva de FLX con dosis subumbrales de GAL o GAL(1-15), observándose que la coadministración de la molécula completa de GAL, a diferencia de la coadministración con el fragmento, no modifica los efectos conductuales de la FLX en el FST.

Es interesante señalar que en resultados previos de nuestro grupo de investigación, el fragmento GAL(1-15) potencia los efectos antidepresivos del agonista 5-HT<sub>1A</sub>R 8-OH-DAPT en el FST de forma más intensa que como lo hace la molécula completa (Millón et al., 2016). Por lo que el hecho de que la molécula completa de GAL no modifique la conducta analizada de la FLX en el FST, refuerza la idea de un papel

diferencial del fragmento GAL(1-15) en comparación con la GAL en la interacción de estos dos péptidos con el sistema serotoninérgico.

Son varias las sustancias que se han administrado junto con los ISRSs para intentar mejorar sus tasas de respuesta. Por ejemplo, la combinación con el litio ha conseguido mejoras de un 50% más de respuesta en pacientes con DRT tratados con FLX (Katona, et al. 1995) y en pacientes con episodios de TDM recurrentes se ha observado que consigue una reducción del 88% de intentos de suicidio (Shelton et al., 2010). Los antipsicóticos atípicos como la Olanzapina, que presentan afinidad por el receptor 5-HT<sub>2</sub> serotoninérgico y por el D<sub>2</sub> dopaminérgico, también se han empleado en combinación con la FLX obteniéndose buenos resultados en pacientes con DRT (Corya et al., 2006; Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015).

Siguiendo la estrategia farmacológica de potenciación se han empleado, junto con los ISRSs, sustancias cuyo mecanismo molecular de actuación se basa en el diferente papel de los 5-HT<sub>1A</sub>R según su localización sea pre o postsináptica. Este es el caso del pindolol un agonista parcial de los 5-HT<sub>1A</sub>R y antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que en pacientes de TDM sin tratamiento previo es capaz de reducir el tiempo necesario para obtener los efectos antidepresivos de los ISRSs y además producir mejoras en pacientes con DRT (Artigas et al., 1994; 1996). Más recientemente, la FDA ha aprobado el uso de la vilazodona, una fármaco de tipo ISRSs que actúa simultáneamente como agonista parcial del 5-HT<sub>1A</sub>R y aunque muestra una efectividad similar a la de otros ISRSs, también es capaz reducir síntomas de ansiedad, haciendo este fármaco susceptible de ser usado en pacientes de TDM con angustia ansiosa (Shali et al., 2016; Nautiyal and Hen, 2017).

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados para estudiar la interacción entre GAL(1-15) y FLX muestran por primera vez como el fragmento GAL(1-15) es capaz de potenciar los efectos antidepresivos de un fármaco como la FLX a nivel de comportamiento en ratas, pudiendo ser esta interacción la base de una nueva estrategia farmacológica para tratar el TDM.

Una vez descritos los efectos potenciadores de GAL(1-15) sobre la FLX, estudiamos los mecanismos de acción implicados en esta interacción. Dado que el fragmento GAL(1-15) media sus acciones a través del heterodímero GALR1-GALR2 como hemos demostrado previamente (Millón et al., 2015), primero **evaluamos el papel del receptor GALR2 en la interacción farmacológica entre GAL(1-15) y la FLX en el FST** empleando el antagonista específico M871 y un modelo de silenciamiento génico (siGalR2).

Los resultados obtenidos muestran que la administración de M871 bloquea el efecto potenciador de GAL(1-15) sobre la FLX, de forma que la infusión de GAL(1-15) junto con el antagonista por vía i.c.v. no modifica ninguno de los parámetros inducidos por la dosis efectiva de FLX, indicando que la participación del receptor GALR2 parece fundamental para que se produzca la potenciación de GAL(1-15) sobre la FLX. Por otro lado, y en consonancia con resultados previos (Millon et al., 2015), la infusión i.c.v. de M871 a la dosis de 3nmol no modifica la conducta en el FST.

El papel de GALR2 en la interacción entre GAL(1-15) y OH-DPAT también fue demostrado previamente en trabajos realizados en nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2016), donde se empleó el antagonista M871 para bloquear los efectos potenciadores del fragmento sobre el agonista 5-HT<sub>1A</sub>R.

El M871 es un péptido quimérico que presenta una afinidad 30 veces superior por el receptor GALR2 que por el GALR1 (Sollenberg et al., 2006). En distintos estudios este antagonista ha mostrado la capacidad de bloquear las funciones asociadas con la GAL y mediadas por GALR2. Por ejemplo, se ha usado para bloquear la potenciación del efecto ansiolítico inducido por la coadministración de GAL con el agonista Y1 del neuropéptido Y y en la que participa el heterodímero GALR2-Y1 (Narváez et al., 2014). El M871 también ha mostrado su capacidad para bloquear los efectos de la administración del fragmento GAL(1-15) en el FST como se muestra en trabajos de nuestro grupo de investigación, donde se coadministró a la dosis de

3nmol junto con GAL(1-15) a dosis efectivas (Millón et al., 2015). En trabajos más recientes, este antagonista también ha sido eficaz para bloquear la potenciación del efecto antidepresivo del 8-OH-DPAT mediado por GAL(1-15) en el FST (Millón et al., 2016).

El papel de GALR2, además de con el antagonista específico M871, también se pone de manifiesto en los experimentos en los que usamos un modelo animal de silenciamiento génico, siGalR2. En estos animales siGalR2, la coadministración de GAL(1-15) con la dosis efectiva de FLX no produce ninguna modificación en las conductas de inmovilidad, natación y escalada respecto a los animales siGalR2 a los que se administra solo la dosis efectiva de FLX. Estos datos indican que con este modelo animal se bloquea la potenciación de GAL(1-15), de modo similar al bloqueo obtenido con el antagonista específico de GALR2 M871. Por otra parte, en este modelo animal siGalR2 también comprobamos que la FLX conserva el efecto antidepresivo en comparación con los animales control, reduciendo el tiempo de inmovilidad y aumentando el tiempo de natación. Lo que indica que la reducción del receptor GALR2 no altera los efectos antidepresivos de FLX en el FST.

El modelo de rata siGalR2 ha sido previamente validado y usado en trabajos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015). En estos trabajos se comprobó que el día de mayor reducción en los niveles de GALR2 correspondía con el octavo día tras la inyección i.c.v del reactivo comercial Acell siRNA Smart pool mediante técnicas de qPCR-rt e inmunohistoquímica, y en pruebas conductuales la administración central de GAL(1-15) 3nmol no produjo ningún efecto ansiogénico o prodepresivo en las pruebas del OF y el FST en animales siGalR2 (Millón et al., 2015). Posteriormente, y para confirmar la reducción del GALR2, con el tejido cerebral de los animales que realizaron las pruebas conductuales, también se comprobó mediante la técnica de ligazón por proximidad (Fredriksson et al., 2002) que en los animales siGalR2 se observa una reducción en la formación de heterodímeros GALR1-GALR2 tanto en RD como en hipocampo (Millón et al., 2015). Estos resultados demuestran que la reducción de la expresión del receptor GALR2 produce un bloqueo de los efectos conductuales inducidos por GAL(1-15),

indicando la importancia de dicho receptor en el mecanismo de acción del fragmento.

Los resultados obtenidos en esta tesis empleando el antagonista M871 y el modelo de rata siGalR2 están en consonancia con los datos previos de nuestro grupo (Millón et al., 2015; Millón et al., 2016) y confirman la importancia del receptor GALR2 en la mediación de los efectos de GAL(1-15) y en la interacción del fragmento con el sistema serotoninérgico. En este caso, nuestros resultados nos permiten sugerir un papel determinante de GALR2 en la mediación en la interacción entre GAL(1-15) con la FLX a nivel de comportamiento.

Los modelos de silenciamiento génico generados en nuestro laboratorio se obtienen mediante la infusión de pequeños fragmentos de ARN de interferencia (siRNA) que induce un descenso en la expresión de una proteína diana mediante la degradación de su ARN mensajero. Esta tecnología se ha probado en estudios *in vitro* e *in vivo* y se considera de gran utilidad experimental para obtener animales knockdown y una potente herramienta en el tratamiento de enfermedades (Akhtar y Benter, 2007; de Fougerolles et al., 2007; Shim and Kwon, 2010; Kole et al., 2012; Chen and Zhaori, 2011). Debido a que los ARN son rápidamente degradados por las endonucleasas, obtamos por emplear el sistema comercial de Acell siRNA Smart pool, que incluye modificaciones químicas que permiten prolongar la vida media de los fragmentos de ARN interferente en tejidos *in vivo*. Estas modificaciones muestran además una gran capacidad de penetración en células sin necesidad de reactivos de transfección (Baskin et al., 2008). Este sistema, se ha probado previamente en ratas administrado por vía i.c.v., mostrando una gran especificidad de incorporación en neuronas (Nakajima et al., 2012).

Una vez descrito el papel del receptor GALR2 en la interacción GAL(1-15)-FLX y dado que no se conocen antagonistas específicos del GALR1, de forma análoga al modelo de rata siGalR2 previamente generado en nuestro laboratorio (Millón et al., 2015), en esta tesis hemos realizado los experimentos necesarios para generar **un modelo de silenciamiento génico de siGalR1 para evaluar el papel de los**

**receptores GALR1 en la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y la FLX en el FST.** Dichos experimentos se diseñaron para comprobar la reducción de los niveles de proteína y ARN mensajero en ratas inyectadas con el reactivo comercial Acell siRNA para GALR1 (siRNA-GALR1).

Utilizando la técnica de qPCR-rt para detectar la reducción de los niveles de ARN mensajero, realizamos una curva de tiempo de expresión del mensajero tras la inyección vía i.c.v. del ARN interferente para GALR1. Empleamos para ello tejido de la zona del hipocampo dorsal ya que es uno de los núcleos de estudio de esta tesis. En este experimento se observó una reducción de los niveles de ARN mensajero desde el cuarto día después de la inyección i.c.v. de siRNA-GALR1, obteniéndose la menor reducción de ARN mensajero de GALR1 al octavo día tras la inyección. En este mismo experimento, cuantificamos además los niveles de expresión del ARN mensajero de GALR2, sin observarse ningún tipo de variación en ninguno de los días respecto del grupo control. Estos resultados nos indica que el sistema de interferencia empleado es específico del GALR1 y no altera los niveles de GALR2. Es conveniente mencionar que esta especificidad en el silenciamiento también se observó en el caso de los animales siGalR2, donde no se detectó ningún descenso en los niveles de ARN mensajero de GALR1 (Millón et al., 2015).

Además de analizar los niveles de ARN mensajero, también analizamos directamente los niveles de expresión de la proteína GALR1, mediante inmunohistoquímica, al octavo día tras la inyección de siRNA-GALR1. Los resultados obtenidos en este experimento, mostraron una reducción significativa de expresión de GALR1 en relación con el grupo control.

Los resultados de estos experimentos indican que el reactivo siRNA-GALR1 es capaz de reducir los niveles de ARN mensajero y de expresión de proteína del GALR1 en regiones del hipocampo dorsal al octavo día tras la inyección vía i.c.v. Este octavo día en el que se observa la mayor reducción de expresión de GALR1 coincide con los días de postoperatorio tras la cirugía estereotáxica que dejamos a las ratas normales antes de realizar las pruebas de comportamiento y coincide también



con los días de mínima expresión de proteína en el modelo de rata siGalR2 desarrollado por nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015).

La disponibilidad del modelo de rata siGalR1 nos permitió diseñar experimentos para analizar por un lado si la FLX conservaba sus efectos antidepresivos en el FST en dichos modelos y por otro lado estudiar si se modificaban los efectos de la coadministración de GAL(1-15) junto con la FLX.

En el modelo de rata siGalR1 los resultados muestran, al igual que en los modelos siGalR2, que la administración de una dosis efectiva de FLX conserva los efectos antidepresivos, induciendo una reducción en el tiempo de inmovilidad y un aumento en el tiempo de natación al compararlo con un grupo de animales siGalR1 control. Estos datos, junto con los resultados del experimento realizado con el modelo siGalR2, confirman que ninguno de los receptores galaninérgicos participa en la mediación de los efectos de la FLX de forma aislada.

Por otro lado, al coadministrar GAL(1-15) junto con la dosis efectiva de FLX en ratas siGalR1, no se obtuvo un efecto potenciador de la acción antidepresiva de la FLX, mostrando un bloqueo similar al obtenido en el modelo de siGalR2 y con el antagonista de GALR2. Estos resultados nos indican que GALR1 juega un papel relevante en la interacción entre GAL(1-15)-FLX, y que no sólo GALR2 sino también GALR1 es necesario para que GAL(1-15) ejerza su acción, como se sugieren en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Millón et al., 2015; 2016).

Además, nuestros resultados de esta tesis también indican que el efecto potenciador sobre las acciones de la FLX es específico de GAL(1-15) ya que la molécula completa de GAL no induce tales efectos. Esto valida y amplía la noción de un rol específico de GAL(1-15) en la comunicación cerebral y señala al heteroreceptor GALR1-GALR2 como una nueva diana farmacológica en la terapia para tratar el TDM por su capacidad de potenciar a la FLX.

En conjunto, los datos obtenidos en esta tesis en los estudios realizados sobre la implicación de los receptores galaninérgicos GALR1 y GALR2 en la interacción de GAL(1-15) con la FLX, sostienen y refuerzan la hipótesis de que en el mecanismo de acción de GAL(1-15) están implicados los receptores GALR1 y GALR2, ya que la interacción mostrada por GAL(1-15) con la FLX a nivel de comportamiento se ve bloqueada al administrar antagonistas o reducir la expresión de algunos de los dos receptores galaninérgicos estudiados. Como se ha mencionado con anterioridad, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha postulado que la formación de complejos GALR1-GALR2-5-HT1AR en regiones del RD y el hipocampo constituyen la diana farmacológica donde GAL(1-15) modula los efectos conductuales del agonista específico de 5-HT1AR 8-OH-DPAT (Millón et al., 2016). Dado que el receptor 5-HT1AR es fundamental para la acción de la FLX la hipótesis planteada en esta tesis es que la interacción a nivel conductual entre GAL(1-15) y FLX también se encuentre mediada por el protómero 5-HT1AR integrante de estos complejos de receptores.

Por tanto, en la presente tesis hemos analizado el **papel del 5-HT1AR en la interacción entre el fragmento GAL(1-15) y el antidepresivo FLX**. Como se ha mencionado anteriormente, la FLX es un fármaco cuya diana farmacológica es el transportador serotoninérgico (5HTT) (Wong et al., 1974) que actúa bloqueando la recaptación de serotonina e incrementando los niveles del neurotransmisor en el espacio extracelular. No obstante, aunque el bloqueo del 5HTT induce rápidos incrementos de serotonina, es necesaria la administración durante varias semanas del antidepresivo para conseguir los efectos clínicos deseados (Benmansour et al., 1999; Lau et al., 2008).

Numerosos estudios indican que el retraso de los efectos antidepresivos de la FLX puede deberse a que son necesarios cambios a largo plazo, que implican a varios subtipos de receptores. De entre los distintos subtipos de receptores serotoninérgicos cabe destacar el papel de los 5-HT1AR en la mediación de estos efectos (Detke et al., 1997; De Vry et al., 2004; Estada-camarena et al., 2006; Kobayashi et al., 2008;

Castro et al., 2008; Descarries and Riad, 2012; Samuels et al., 2015; Pytka et al., 2015; Ferrés-Coy et al., 2016).

En estudios recientes de nuestro grupo de investigación hemos descrito como el fragmento GAL(1-15) es capaz de mejorar los efectos antidepresivos inducidos por el agonista del 5-HT<sub>1A</sub>R 8-OH-DPAT en la prueba del FST y que las características de unión del 5-HT<sub>1A</sub>R así como los niveles de ARN mensajero se ven modificadas por la infusión i.c.v. de GAL(1-15) (Millón et al., 2016).

**Para evaluar el papel de los 5-HT<sub>1A</sub>R en la interacción farmacológica entre el fragmento GAL(1-15) y la FLX empleamos el antagonista del 5-HT<sub>1A</sub>R Way100635.** Este antagonista muestra una especificidad muy alta por el 5-HT<sub>1A</sub>R respecto a otros subtipos de receptores serotoninérgicos, con una afinidad más de 100 veces mayor (Forster et al., 1995). En nuestro diseño experimental, administramos el antagonista por vía i.c.v. (Jorgensen et al., 2001) al mismo tiempo que el fragmento GAL(1-15) para evitar bloquear los efectos antidepresivos de la FLX e intentar bloquear el efecto potenciador de GAL(1-15). Aunque varios autores muestran que la administración del antagonista a los mismos tiempos que la FLX bloquea su acción antidepresiva, existen estudios que indican que cuando el antagonista no se administra simultáneamente con la FLX se mantiene su actividad antidepresiva en el FST (Estrada-Camarena et al., 2006; Serres et al., 2000).

Los resultados mostraron que la infusión i.c.v. de Way100635 junto con GAL(1-15) produjo un bloqueo del efecto potenciador de GAL(1-15) sobre los efectos de la FLX, de forma que las conductas de inmovilidad, natación y escalada no difieren de las registradas en animales del grupo administrado sólo con FLX. Estos resultados indican que el 5-HT<sub>1A</sub>R juega un papel fundamental en la interacción GAL(1-15)-FLX a nivel de comportamiento.

En este experimento además evaluamos los efectos de la administración i.c.v. del Way100635 sobre los efectos de la FLX, administrado 15min antes del FST. Los datos indican que la administración de Way100635 no bloquea los efectos

antidepresivos de la FLX en el FST, sugiriendo que el bloqueo anteriormente descrito es debido a un bloqueo de la interacción GAL(1-15)-FLX y no a un bloqueo del efecto de la FLX. Estos resultados se ven avalados en trabajos previos donde el antagonista no se administra al mismo tiempo que la FLX para evitar bloquear los efectos de esta pero si la potenciación de otras sustancias (Estrada-Camarena et al., 2006; Serres et al., 2000).

El hecho de que el patrón temporal de la administración del antagonista no impida el efecto antidepresivo de la FLX y sin embargo bloquee los efectos potenciadores de GAL(1-15) en el FST es de gran interés farmacológico. Este hallazgo es compatible con la idea de que el fragmento GAL(1-15) a través de interacciones alostéricas de tipo agonistas dentro del complejo de receptores GALR1-GALR2-5-HT1AR puede modificar el reconocimiento, la farmacología y la señalización de los protómeros 5-HT1AR participantes. En trabajos previos ya postulamos la existencia de estos complejos donde la activación de GALR1-GALR2, inducido por la administración de GAL(1-15) podría producir interacciones alostéricas entre los receptores integrantes del complejo de heteroreceptores que modifican las características funcionales del protómero 5-HT1AR (Millón et al, 2016; Borroto-Escuela et al., 2014). Los resultados obtenidos en esta tesis en los experimentos de comportamiento sugieren que la interacción entre GAL(1-15) y FLX se produce por la existencia de estos complejos de receptores GALR1-GALR2-5-HT1AR, donde el incremento en los niveles de serotonina extracelular inducidos por la FLX, podrían favorecer la formación o actuar sobre complejos de heteroreceptores GALR1-GALR2-5-HT1AR preexistentes, de forma que la infusión de GAL(1-15) pudiera potenciar los efectos inducidos por el protómero 5-HT1AR. La explicación de estos mecanismos tendrían que ser confirmados en posteriores experimentos utilizando técnicas para la detección de trómeros como el BRET-FRET o la complementación fluorescencia/luminiscencia (BiFC) (Vidi and Watts, 2009).



**Figura 2:** Imagen representativa de una hipotética configuración del trímero formado por GALR1-GALR2-5-HT1AR. Para su desarrollo se usaron los modelos de homología desarrollados con DiscoveryStudio durante la tesis. Se empleó un protocolo ZDOCK para generar uniones rígidas entre GALR1-GALR2 y posteriormente entre el dímero resultante y 5-HT1AR (Cheng et al., 2003).

En esta tesis también hemos **estudiado el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y FLX sobre las características funcionales y expresión del ARNm de los 5-HT1AR** en las regiones del RD y el hipocampo, basándonos en trabajos previos donde mostramos que GAL(1-15) es capaz de modificar algunas características funcionales del 5-HT1AR (Millón et al., 2016).

Los resultados obtenidos en el experimento de autorradiografía muestran que en la zona del GD la coadministración de GAL(1-15) junto con FLX induce una disminución de los valores de  $K_d$  y  $B_{max}$  respecto al grupo administrado solo con FLX, indicando un aumento de la afinidad de los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos por el agonista tritiado 8-OH-DPAT y un descenso de densidad de los mismos. Por el contrario, en la región del RD no observamos ninguna modificación ni en la afinidad ni en la densidad de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> con el patrón de administraciones realizado. Hay que destacar que la administración independiente de GAL(1-15) 1nmol o FLX(10mg/Kg) no modificaron ni la  $K_d$ , ni la  $B_{max}$  en ninguna de las zonas analizadas en nuestros experimentos.

De manera similar, en el experimento de *hibridación in situ* la coadministración de GAL(1-15) y FLX provocó un aumento en los niveles de ARN mensajero del 5-HT<sub>1A</sub>R en las zonas de CA1 y GD del hipocampo dorsal, sin afectar a la expresión de ARN mensajero en el RD. De igual forma, la administración por separado de GAL(1-15) 1nmol o FLX(10mg/Kg), tampoco modificaron la expresión del receptor en ninguna de las zonas analizadas.

Estudios previos empleando también técnicas autorradiográficas demuestran que la GAL(1-15) es capaz de reducir la afinidad de los 5-HT<sub>1A</sub>R postsinápticos en la región del hipocampo dorsal en ratas (Hedlund et al., 1994). Trabajos más recientes de nuestro grupo de investigación también muestran que la administración i.c.v. de dosis efectivas de GAL(1-15) incrementan los valores de  $K_d$  y también de la  $B_{max}$  en las regiones CA1 y en el GD del hipocampo en ratas, efecto observado desde 10 minutos después de la administración hasta 2h después (Millón et al., 2016). Estos resultados señalan la capacidad de GAL(1-15) para reducir la afinidad de los 5-HT<sub>1A</sub>R hipocampales y aumentar la densidad de los mismos cuando se administra i.c.v a una dosis de 3nmol. Estos efectos sobre los receptores 5-HT<sub>1A</sub>R son distintos a los observados tras la infusión i.c.v de la molécula completa, ya que GAL provoca un rápido incremento de la  $K_d$  (descenso de afinidad) a los 10min y un incremento en la densidad de receptores ( $B_{max}$ ) 5-HT<sub>1A</sub>R a las 2h pero en el RD no en el hipocampo (Razani et al., 2000).

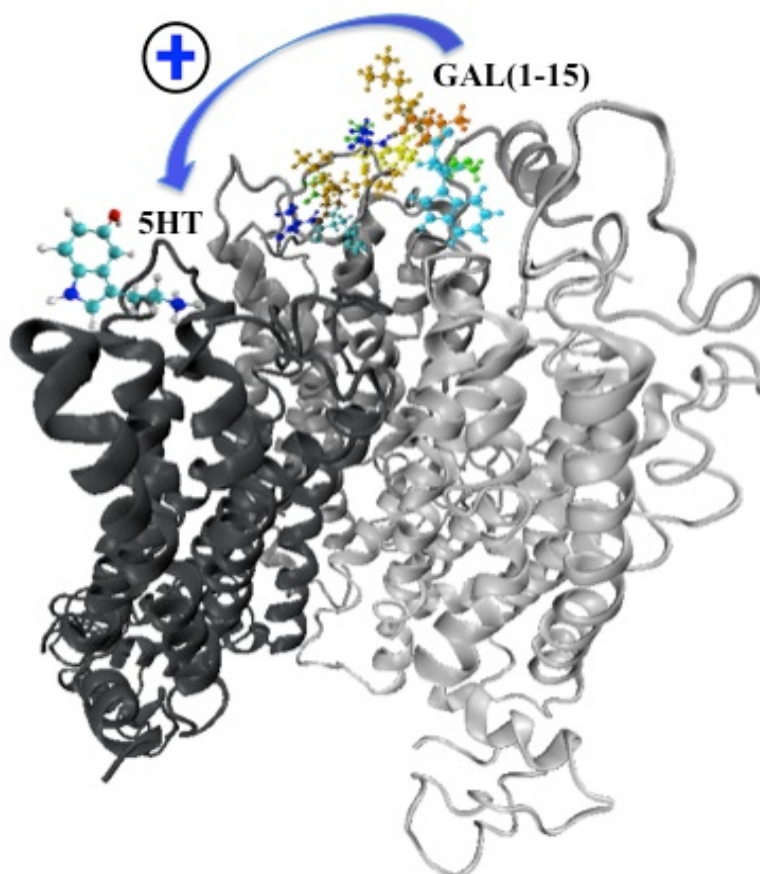
En cuanto a la expresión del receptor, los datos previos indican que la GAL(1-15) provoca un descenso de los niveles de ARN mensajero en el RD a las 2h tras su administración i.c.v, mientras que induce un incremento de los niveles de expresión en la regiones CA1 y GD (Millón et al., 2016). En este caso, el péptido completo de GAL induce también una reducción prolongada de la expresión en el RD, que abarca desde las 2 hasta las 5h después de la administración i.c.v. (Razani et al., 2000).

En resumen los resultados mostrados en esta tesis doctoral muestran, que la coadministración de una dosis subumbral de GAL(1-15) con una dosis efectiva de FLX induce un rápido aumento de afinidad del 5-HT1AR por su agonista en el GD así como de la expresión de su ARN mensajero y, a nivel de comportamiento, una potenciación de los efectos antidepresivos de la FLX en el FST. Basándonos en estos resultados sugerimos que el aumento de la afinidad de los 5-HT1AR en el GD podría ser la causa subyacente a los efectos potenciadores observados en el FST, ya que la estimulación de los 5-HT1AR postsinápticos son responsables de los efectos antidepresivos (Haddjeri et al., 1998; Richarson-Jones et al., 2010).

Además, nuestros resultados también sugieren que el RD no es el núcleo clave en la potenciación mediada por GAL(1-15) sobre los efectos antidepresivos de la FLX. Sin embargo, no podemos excluir que una mejora de la transmisión serotoninérgica pueda ser inducida por GAL(1-15) mediante algún mecanismo que involucre al autorreceptor 5-HT1A a nivel del RD. Los estudios previos con dosis efectivas de GAL(1-15) indican una reducción en el descenso de expresión de ARN mensajero 2h después de la administración i.c.v. de GAL(1-15) en el RD (Millón et al., 2016) y en los experimentos realizados en la presente tesis no llegamos a analizar los efectos de la coadministración de GAL(1-15)-FLX a esos tiempos.

Las variaciones observadas en la afinidad y expresión de los 5-HT1AR postsinápticos a nivel del hipocampo refuerzan la hipótesis anteriormente expuesta de la formación de un complejo heteroreceptor GALR1-GALR2-5-HT1AR. El orden y la dosis de las sustancias administradas puede ser un factor a considerar en las interacciones alostéricas que se dan entre los distintos protómeros que integran un

oligómero (Franco, 2009). El aumento de los niveles extracelulares de serotonina inducidos por la FLX podrían favorecer la formación de complejos de heteroreceptores GALR1-GALR2-5-HT1AR a nivel de hipocampo o promover las interacciones alostéricas que favorezcan a la señalización mediada por el 5-HT1AR a bajas dosis de GAL(1-15). De echo, los trabajos previos de nuestro grupo, muestran que la administración de GAL(1-15) a dosis subumbrales potencia los efectos antidepresivos del 8-OH-DPAT en el FST (Millón et al., 2016), y los resultados presentados en esta tesis, también muestran que dosis subumbrales de GAL(1-15) potencian los efectos de la FLX en el mismo test.



**Figura 3:** Imagen representativa de un hipotético mecanismo de acción subyacente a la formación del trímero GALR1-GALR2-5-HT1AR, donde las interacciones alostéricas que se dan entre los diferentes protómeros constituyentes determinarían los efectos dependiendo del orden y cantidad de ligandos unidos al complejo. De forma que los incrementos de serotonina (5-HT) inducidos por la FLX puedan ser potenciados en presencia de bajas dosis de GAL(1-15). Los receptores y ligandos han sido generados mediante el software DiscoveryStudio..



Aunque parece clara la participación del 5-HT1AR en la interacción GAL(1-15)-FLX en la potenciación de los efectos antidepresivos de la FLX en el FST, no podemos descartar el posible papel de otros subtipos de receptores serotoninérgicos que puedan participar de alguna forma en dicha interacción. Son varias las investigaciones que indican que los subtipos de receptores 5-HT2A, 5-HT3 5-HT4 y 5-HT7, también se han asociado de alguna manera con la FLX (Bockaert et al., 2008; Kobayashi et al., 2008; Pytliak et al., 2011; Artigas, 2013; Borroto-Escuela et al., 2017).

Los efectos conductuales descritos en esta tesis, se centran fundamentalmente en modelos que evalúan el aspecto de la desesperanza, uno de los endofenotipos característicos de la depresión (Hastler et al., 2004). No obstante, sería de gran interés analizar los efectos de la interacción GAL(1-15)-FLX en otros síntomas característicos del TDM, como son la pérdida de interés o placer en las actividades diarias (anhedonia) (DSM-V, 2013), que pudieran ofrecer una visión más global sobre el papel de esta interacción en el trastorno depresivo y que pudiera fundamentar la búsqueda de una estrategia farmacológica basada en la interacción entre GAL(1-15) y FLX.

En conclusión, nuestros resultados indican que la administración i.c.v. del fragmento GAL(1-15) potencia los efectos antidepresivos inducidos por la FLX en el FST. La diana de GAL(1-15) podrían ser los complejos heterorreceptores GALR1-GALR2-5-HT1AR localizados en el hipocampo dorsal, donde se producirían interacciones de tipo alostéricas entre los receptores integrantes (Fuxe et al., 2008, 2012; Millón et al., 2015, 2016). Por el contrario, las acciones de la GAL parece mediarse principalmente a través complejos de heterorreceptores GALR1-5-HT1AR y GALR2-5-HT1AR confirmando un papel diferencial entre GAL(1-15) y GAL en relación con sus funciones fisiológicas y mecanismos de acción subyacentes (Borroto-Escuela et al., 2010; Millón et al., 2015, 2016; Diaz-Cabiale 2005). Los resultados obtenidos abren la posibilidad de utilizar el fragmento GAL(1-15), algún agonista del mismo o

un fármaco bivalente como una estrategia farmacológica de aumentación junto con la FLX para potenciar los efectos de este antidepresivo.

# CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



**Primera:** La administración intracerebroventricular de GAL(1-15) induce un efecto prodepresivo y ansiogénico en el test de suspensión de la cola y en el test de luz/oscuridad respectivamente.

**Segunda:** Se han generado, por primera vez, modelos de homología de los receptores GALR1 y GALR2 incluyendo los extremos N y C-terminales con los que poder estudiar la formación de heterodímeros GALR1-GALR2 y la unión de estos heterodímeros con sus ligandos.

**Tercera:** La administración de GAL(1-15) a dosis subumbrales potencia los efectos antidepresivos de la FLX en el FST. La potenciación inducida por GAL(1-15) se consigue con dosis efectivas y no efectivas del antidepresivo, siendo mayor el efecto observado cuando se combina con una dosis efectiva de FLX. Esta potenciación es exclusiva del fragmento GAL(1-15) ya que no se produce con la molécula completa de GAL.

**Cuarta:** Los receptores galaninérgicos GALR1 y GALR2 participan de manera fundamental en los efectos potenciadores de GAL(1-15) sobre la FLX en el FST. El uso del antagonista específico para GALR2 M871 y de los modelos de rata siGalR1 y si GalR2 bloquean dicha potenciación, confirmando nuestra hipótesis previa de que GAL(1-15) actúa a través de la formación del heterodímero GALR1-GALR2.

**Quinta:** El receptor 5-HT1A serotoninérgico está implicado en la interacción entre GAL(1-15) y FLX a nivel de comportamiento. El uso del antagonista específico del receptor 5-HT1A Way100635 bloquea la potenciación de GAL(1-15) sobre los efectos antidepresivos de FLX en FST.

**Sexta:** La coadministración de GAL(1-15) y FLX modifican las características y la expresión de los receptores 5-HT1A en el hipocampo dorsal. Se observa un aumento de la afinidad de los receptores 5-HT1A junto con una reducción de su densidad en el GD, y además se observa un incremento de los niveles de ARN mensajero del receptor 5-HT1A en el GD y en CA1.

**Séptima:** Todos los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir la formación de un mosaico de receptores GALR1-GALR2-5-HT1AR en el hipocampo dorsal como parte del mecanismo de acción subyacente a la interacción GAL(1-15)-FLX que potencia los efectos antidepresivos de la FLX en el FST.

# SUMMARY



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





## INTRODUCTION

Major depressive disorder (MDD) represents the classic condition of depression within the group of depressive disorders. It is characterized by a discrete episode of at least two weeks in duration where 5 or more of the following symptoms are identified: depressed mood, marked loss of interest or pleasure in daily activities (anhedonia), significant loss or gain of weight and/or appetite, insomnia or hypersomnia, fatigue or loss of energy and locomotor activity, recurring feelings of uselessness and guilt, inability to think and indecision, recurrent thoughts about death and suicidal ideation with or without an action plan. These episodes are classified according to the amount and intensity of the symptoms as mild, moderate or severe (DSM-V, 2013).

According to the latest WHO reports, MDD affects 4.4% of the world population, with an increase in prevalence of 18% in the last decade, and twice as many cases in women as in men (WHO, 2017). In 2030, MDD will become the main cause of disability in the world (Mathers et al., 2008), and it is estimated that half of the suicides worldwide occur during a depressive period. In Europe, the economic burden of the MDD, reaches approximately 113 billion euros per year (Smith, 2011).

Although MDD is one of the most common and debilitating mental disorders, its aetiology is unclear. Multiple factors arise as possible triggers of the disease. Social, psychological, genetic and biological factors during development and in later stages of life may result in an episode of MDD (Hoffmann et al., 2017).

Despite tremendous progress in neuroscience research over the past few decades, the pathophysiology of MDD has not been fully elucidated. Research has implicated several mechanisms, including HPA axis abnormalities, increased inflammatory factors, a decrease in neuroplasticity and in neurogenesis and alterations in the glutamatergic and GABAergic systems and in neuropeptides (Dean and Keshavan, 2017). The monoamine hypothesis of depression posits that depression is caused by decreased monoamine (serotonin, noradrenaline and dopamine) function in the brain (Krishnan and Nestler, 2008). Originating from early clinical observation, this hypothesis has been widely validated from a pharmacological perspective since, from the 1950s, most antidepressants modify monoaminergic systems. Selective inhibitors of the reuptake of serotonin (SSRI), such as fluoxetine (FLX) are the most currently used class of

antidepressants because of their favourable safety profile (Khun et al., 2017). Despite the development of a wide range of antidepressants, the first choice in many clinical cases continues to be FLX due to its high effectiveness, its high tolerance by patients and higher rates of adherence rates to treatment (Iruela et al., 2009; Bonet de Luna et al., 2011).

Although there have been several available treatments for depression over the past two decades, approximately 30% of patients either did not respond adequately to these drugs or were unable to tolerate their adverse effects. These patients are broadly defined as having treatment-resistant depression (TRD) (Fava and Davidson, 1996; Mathew et al., 2008; Shelton et al., 2010; Zohu et al., 2015). The pharmacological approaches to solve the TRD involves several strategies: strategies of optimization, substitution, combination or augmentation (Shelton et al., 2010). The augmentation strategy consists of the administration of a non-antidepressant compounds that potentiates the effects of an antidepressant, and FLX has also shown efficacy in augmentation strategies for the treatment of TRD (Shelton et al., 2010).

The pharmacological target of FLX is the serotonin transporter (5-HTT) but the serotonergic receptor 5-HT<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1AR</sub>) has a key role in achieving the antidepressant effects of FLX. The 5-HT<sub>1AR</sub> is one of the most studied serotonergic receptors related to MDD (Nautiyal and Hen, 2017). 5-HT<sub>1AR</sub> is found in the soma and dendrites of the serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus (DR), which inhibits the release of serotonin through a negative feedback mechanism (Barnes and Sharp, 1999; Artigas, 2013). Postsynaptically, 5-HT<sub>1AR</sub> has a greater widespread distribution and is abundantly distributed throughout the hippocampus as well as the cerebral cortex and amygdala with lower density in the thalamus, hypothalamus and basal ganglia (Smythies, 2005; 2013; Nautiyal and Hen, 2017).

The acute administration of FLX induces an increase in the extracellular levels of serotonin in the DR, which activates the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and inhibits firing towards the projection areas. The desensitization of the presynaptic 5-HT<sub>1AR</sub> is achieved only with chronic treatment, avoiding the negative feedback and increasing the serotonin levels in the projection regions (Bortolozzi et al., 2012; Artigas, 2013; Nautiyal and Hen, 2017). The postsynaptic 5-HT<sub>1AR</sub>, especially in the hippocampus,

also seems to be fundamental in the mediation of the antidepressant effects of FLX since its functionality is increased by the treatment. On the contrary, the absence of 5-HT<sub>1A</sub>R in the hippocampus inhibits the antidepressant actions in the forced swimming test (FST) in rats (Castro et al., 2008; Samuels et al., 2015).

The differential role of 5-HT<sub>1A</sub>R, according to location has allowed the use of substances that block the activation of the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors as an augmentation therapy in the use of SSRIs; for example, with a 5-HT<sub>1A</sub>R partial agonist, such as pindolol (Artigas et al., 1994). The development of agonists with preference for postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub>R could also be a useful tool for the treatment of MDD (Newman-Tancredi et al., 2008; Nautiyal and Hen, 2017).

Recent studies have also implicated several neuropeptides in the pathophysiology of depression in rodents and in the possibility of using them as a combined treatment with antidepressant drugs. In this context, Galanin (GAL) is of particular interest. GAL is widely distributed in the central nervous system (CNS) and three GAL receptor subtypes, GALR1-3 with a 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 signalling (Branchek et al., 2000; Wang et al., 1997).

Related to mood disorders, GAL induces an anxiogenic or anxiolytic effects in different behaviour tests depending on the place of administration and the animal's previous stress state. (Bing et al., 1993; Möller et al., 1999; Khoshbouei et al., 2002; Barrera et al., 2006). GAL also induces a pro-depressive effect in the forced swim test in rodents (Weiss et al., 1998; Kuteeva et al., 2008) mediated by GALR1 and GALR3 (Swanson et al., 2005; Kuteeva et al., 2008b) receptors, while GALR2 receptor activation induces antidepressant effects in this same test (Kuteeva et al., 2008b). GAL interacts with the serotonergic system at different levels. It has been proposed that the existence of GALR1-5-HT<sub>1A</sub>R heterodimers in some brain regions act as an underlying mechanism for the antagonistic interactions between GAL and the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub>R (Fuxe et al. 1988; Fuxe et al. 1990; Razani et al., 2000; Kuteeva et al., 2008; Borroto-Escuela et al., 2010).

Not only the GAL, but also the fragment GAL(1-15) has biological activity in the SNC, however GAL(1-15) has a differential role and mechanism of action compared to the complete peptide (Hedlund et al., 1992; Hedlund and Fuxe, 1996; Díaz-Cabiale et al., 1998; 2005; 2007; 2010). In recent works, we showed that the central administration of GAL(1-15) in rats induces a pro-depressive and anxiogenic-like effect that is stronger than GAL (Millón et al., 2015). Additionally, we showed that GALR1 and GALR2 are involved in the underlying mechanism of action of GAL(1-15) by forming the heteroreceptor complex GALR1-GALR2 (Borroto-Escuela et al., 2014; Millón et al., 2015). However, it is necessary to confirm the role of the GAL(1-15) fragment in anxiety and depression and get more acquainted with the formation of the GALR1-GALR2 heterodimer as a mechanism of action of GAL(1-15).

We have also recently demonstrated that GAL(1-15) interacts with the serotonergic system, enhancing the antidepressant effects of the 5-HT<sub>1A</sub>R agonist 8-OH-DPAT in a stronger manner than the one induced by GAL. GAL(1-15) also modifies the affinity and expression of 5-HT<sub>1A</sub>R in the DR and the hippocampus, which are both regions involved in depressive behaviour. In these works, we have also postulated that the interaction between GAL(1-15) and 5-HT<sub>1A</sub>R involves the formation of GALR1-GALR2-5-HT<sub>1A</sub>R receptor complexes (Millón et al., 2016).

5-HT<sub>1A</sub>R is one of the most studied serotonergic receptors in major depressive disorder (Nautiyal and Hen, 2017) and it plays a key role in the antidepressant effects of SSRIs, such as fluoxetine, both as an autoreceptor in the DR and in its postsynaptic distribution in the hippocampus (Estada-camarena et al., 2006; Kobayashi et al., 2008; Castro et al., 2008; Iruela et al., 2009; Bonet de Luna et al., 2011; Descarries et al., 2012; Samuels et al., 2015; Pytka et al., 2015; Ferrés-Coy et al., 2016). However, we have to consider that therapy with SSRIs has a limited efficacy and many patients do not respond adequately to these drugs or were unable to tolerate their adverse effects. These patients are broadly defined as having treatment-resistant depression (TRD) (Fava and Davidsson, 1996; Shelton et al., 2010; Zhou et al., 2015). The augmentation therapies are a pharmacological strategy that was developed to avoid this high proportion of resistance and they consist of the coadministration of substances or compounds with antidepressants to enhance their effects, with fluoxetine being one of the drugs of first choice (Artigas et al., 1994; 1996; Shali et al., 2016; Nautiyal and Hen, 2017).



Therefore, the interactions described between GAL(1-15) and 5-HT1AR could be the basis for an augmentation therapy between GAL(1-15) and fluoxetine.

## **OBJECTIVES**

Based on these preliminary results, in this doctoral thesis we propose to address two **main objectives**:

1- Confirm the role of the GAL(1-15) fragment in anxiety and depression and develop complete homology models of the GALR1 and GALR2 receptors in order to study the dynamics of GALR1-GALR2 heterodimer formation as a molecular target of GAL(1-15).

2- Study the effects of the pharmacological interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine in behavioural tests related to depression and analyzing the role of the galaninergic receptors GALR1 and GALR2 and the serotonergic 5-HT1AR.

To perform these main objectives this doctoral thesis has been organized into three independent experimental blocks, each of them with their respective **specific objectives**, as detailed below:

### **Role of GAL(1-15) in anxiety and depression. Development of homology models of the GALR1 and GALR2 receptors**

1- Study the effects of the central administration of the GAL(1-15) in behavioural tests of anxiety and depression.

2- Develop homology models of the GALR1 and GALR2 receptors involved in the mechanism of action of GAL(1-15) using computational methods.

**Interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine: role of the GALR1 and GALR2 receptors**

1. Study the pharmacological interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine in a behavioural test of depression and determine if this interaction is exclusive for the fragment or also occurs with GAL.
2. To evaluate the role of GALR2 receptors in the pharmacological interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine in a behavioural test of depression using the specific antagonist M871 and a gene silencing model employing RNA interference for GALR2 (siGalR2).
3. To evaluate the role of GALR1 receptors in the pharmacological interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine in an animal behavior test of depression using a gene silencing model employing RNA interference for GALR1 (siGalR1).

**Interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine: role of serotonergic 5-HT1AR**

1. To evaluate the role of 5-HT1AR in the pharmacological interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine in a behavioural test of depression using the specific antagonist Way100635.
2. To study the effect of the coadministration of GAL(1-15) and fluoxetine on the functional characteristics and mRNA expression of the serotonergic 5-HT1AR in the DR and dorsal hippocampus with autoradiography and in situ hybridization experiments.

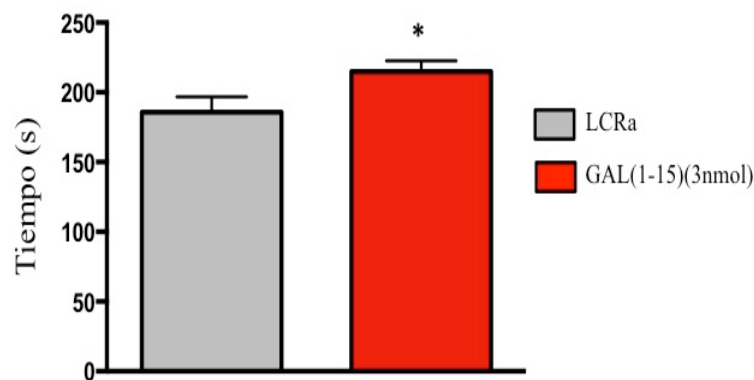
## RESULTS

All the methodology and results are detailed in the articles appended at the end of the manuscript. In this section we described the most relevant results in this thesis.

### Role of GAL(1-15) in anxiety and depression. Development of homology models of the GALR1 and GALR2 receptors.

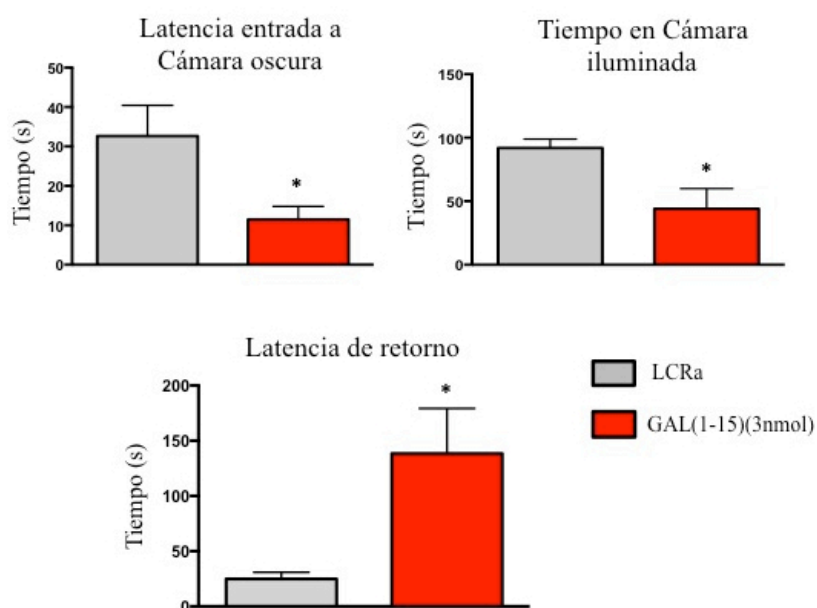
To confirm the role of the GAL(1-15) fragment in anxiety and depression, a group of animals was administered i.c.v with an effective dose of GAL(1-15) (3nmol) 15 min before the tail suspension test or the dark/light test.

In the tail suspension test (Figure 1), GAL(1–15) at the dose of 3 nmol significantly increased the immobility behavior recorded during the 6 min of testing.



**Figure 1:** Behavioural effects of the administration of an effective dose of GAL(1-15) (3nmol) in the tail suspension test. GAL(1-15) or CSFa were injected i.c.v. 15 min before the test. Data represent mean  $\pm$  SEM of immobility, during the 6min test period (n=6-8 rats per group). \*p<0.05 according to Student's unpaired t-test.

In the light/dark test (Figure 2) GAL(1-15) significantly decreased the total time spent in the light compartment and the latency to enter in the dark chamber compared with controls. Moreover, the latency time for reentering the light chamber was significantly increased after GAL(1–15) treatment.

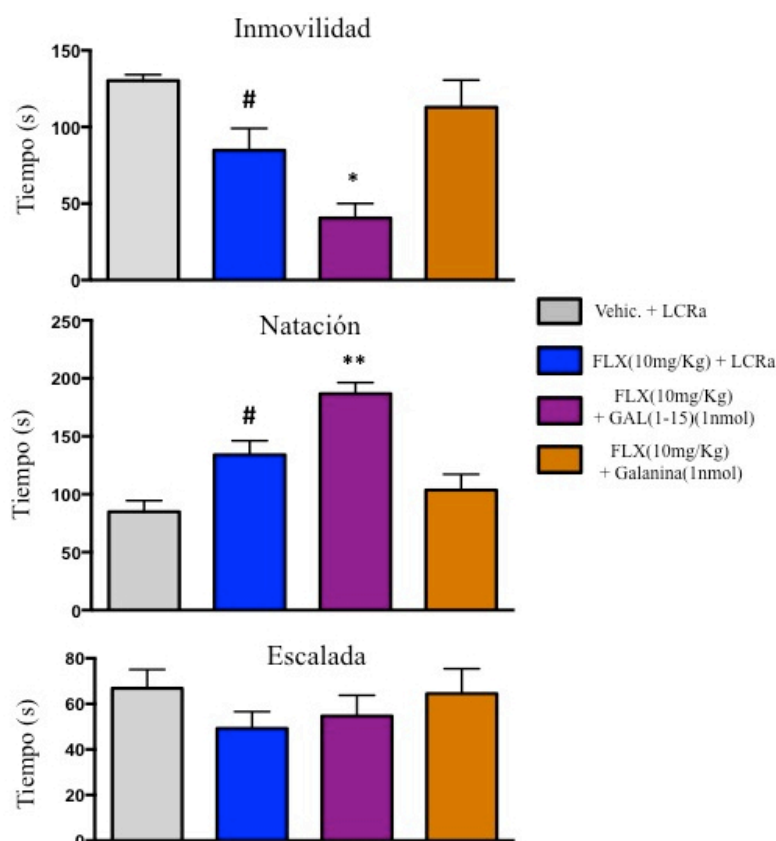


**Figure 2:** Behavioural effects of the administration of an effective dose of GAL(1-15) (3nmol) in the light/dark test. GAL(1-15) or CSFa were injected i.c.v. 15min before the test. Data represent the mean  $\pm$  SEM of the total time spent in the light compartment, the latency to enter the dark chamber and latency time for reentering to light during the 5min test period (n=5-6 rats per group). \*p<0.05 according to Student's unpaired t-test.

### Pharmacological interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine

To determine the existence of an interaction between FLX and GAL(1-15), a group of animals was administered i.c.v. with GAL (1nmol) instead of GAL(1-15) to determine whether the interaction with FLX is exclusive for the fragment or is also produced with the complete molecule. The coadministration of FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15) (1nmol) induced a strong decrease of more than 50% in the immobility time as well as a 40% increase in the swimming time compared with the group injected only with FLX (10mg/Kg) (Figure 3). These effects revealed the intensity of the interaction between GAL(1-15) and FLX. On the other hand, the coadministration of GAL(1nmol)+FLX(10mg/Kg) did not modify any parameter analysed in comparison with the FLX(10mg/Kg) group (Figure 2), indicating that the interaction is exclusive for GAL(1-15).





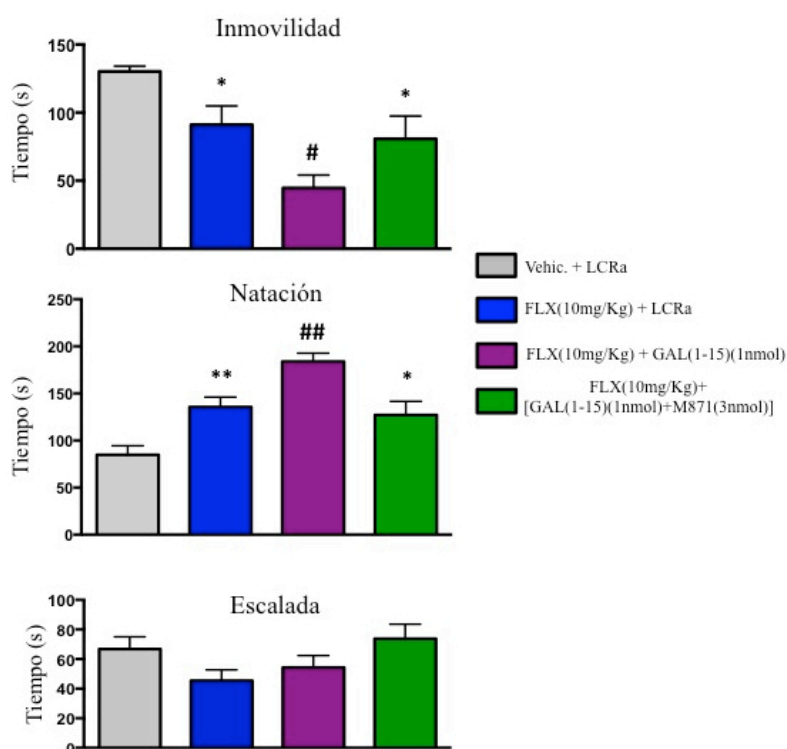
**Figure 3:** Behavioural effects of the coadministration of an effective dose of FLX(10mg/kg) and GAL(1-15)(1nmol) or Galanin(1nmol) in the FST. FLX were administered s.c. 23, 5 and 1h before the test. CSFa, GAL(1-15) and Galanin were injected i.c.v. 15min before the test. Data represents the mean  $\pm$  SEM of immobility, climbing and swimming time in FST during the 5min test period (n=7-8 rats per group). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 versus all the groups; # $p$ <0.05 versus Control according to a one way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test.

### Interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine: role of the GALR1 and GALR2 receptors

To determine the involvement of GALR1 and GALR2 in the effect of GAL(1-15) on FLX-mediated action, we first used the GALR2 specific antagonist M871 at a dose of 3nmol and a knockdown GALR2 rats (siGalR2) previously developed in our laboratory (Millón et al., 2015). Then, we determined the role of GALR1 in the GAL(1-15)-FLX interaction with a knockdown GALR1 rats (siGalR1) since there are no commercial antagonists specific for GALR1.

The obtained showed that, in animals administered with FLX(10mg/Kg) s.c. and GAL(1-15)(1nmol)+M871(3nmol) i.c.v., the GALR2 antagonist blocked the reduction

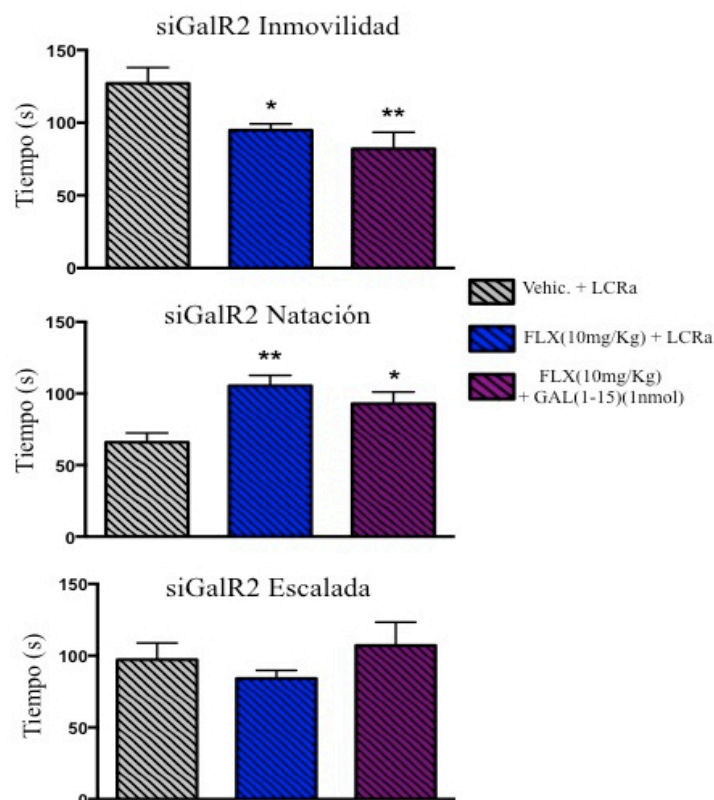
of the immobility time and in the increase in the swimming time induced by the administration of FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) (Figure 3). In addition, the animals treated with FLX(10mg/Kg) and GAL(1-15)(1nmol)+M871(3nmol) did not show differences in any of the parameters compared to the group injected only with FLX(10mg/Kg) (Figure 4). This indicated that the antagonist M871(3nmol) blocked the potentiation mediated by GAL(1-15)(1nmol) without modifying the effects of FLX(10mg/Kg).



**Figure 4:** Behavioural effects of the coadministration of an effective dose of FLX(10mg/kg) and GAL(1-15)(1nmol) alone or in combination with M871(3nmol) in the FST. FLX was administered s.c. 23, 5 and 1h before the test. CSFa, GAL(1-15) or GAL(1-15)+M871 were injected i.c.v. 15min before the test. Data represents the mean  $\pm$  SEM of immobility, climbing and swimming time in FST during the 5min test period (n=7-9 rats per group). #p<0.05, ##p<0.01 versus FLX(10mg/Kg)+LCRa y FLX(10mg/Kg)+[GAL(1-15)(1nmol)+M871(3nmol)]; \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus all the groups according to a one way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test.

We also tested the role of GALR2 in the GAL(1-15)-FLX interaction using siGalR2 animals in the FST. In this experiment, groups of siGalR2 animals were administered with FLX(10mg/Kg) or FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) with the same administration pattern as in the previous experiments. The results obtained in siGalR2 animals showed that the coadministration of FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) did

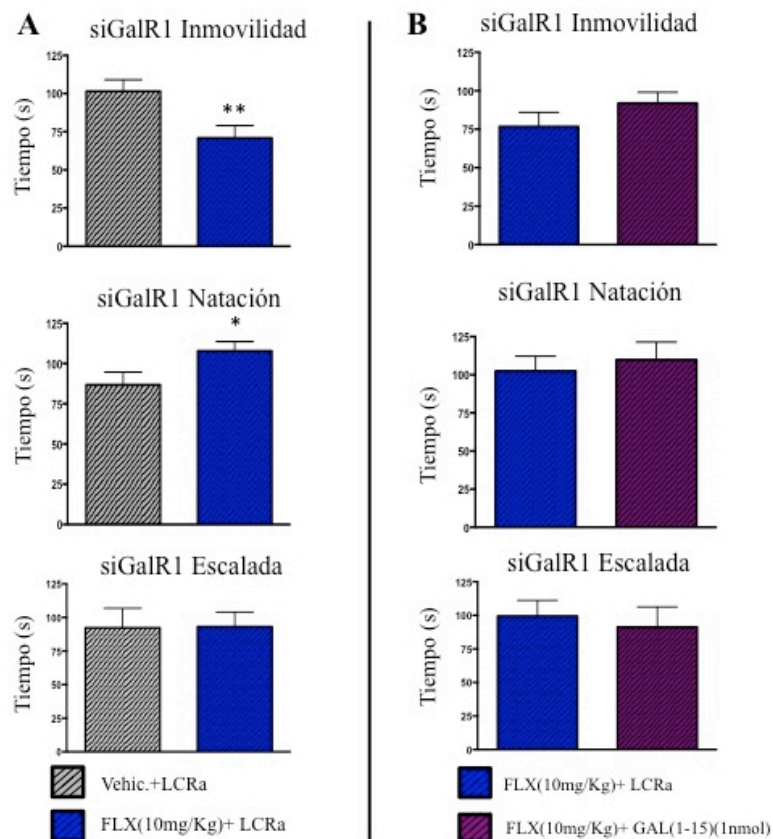
not induce differences in any of the parameters studied compared to the group of animals injected only with FLX(10mg/Kg) (Figure5). It was also observed that, in siGalR2 rats, the group treated with FLX(10mg/Kg) showed antidepressant effects with respect to the control group. The results indicated that, in the siGalR2 animals, GAL(1-15) lacked the enhancing effect on the effective dose of FLX without modifying its antidepressant effects.



**Figure 5:** Behavioural effects of the coadministration of an effective dose of FLX(10mg/kg) alone or in combination with GAL(1-15)(1nmol) in siGalR2 rats. FLX or Veh was administered s.c. 23, 5 and 1h before the test. aCSF and GAL(1-15) were injected i.c.v. 15min before the test. Data represents the mean  $\pm$  SEM of immobility, climbing and swimming times in FST during the 5min test period (n=7-9 rats per group). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 versus Control according to a one way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test.

To study the role of GALR1 in the interaction between GAL(1-15)-FLX, we used siGalR1 rats in the FST. In this experiment, we used groups of control siGalR1 animals, FLX(10mg/Kg) and FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) with the same administration pattern as described above. In the siGalR1 rat model, it was observed that FLX(10mg/Kg) (Figure 6a) induced the same antidepressant effects as in normal rats. On the other hand, the coadministration of FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) did not

induce significant differences in any of the parameters compared to the group injected with FLX(10mg/Kg) alone (Figure 6b).



**Figure 6:** Behavioural effects of the administration of an effective dose of FLX(10mg/kg) **A**) and coadministration of FLX(10mg/kg)+GAL(1-15)(1nmol) **B**) in siGalR1 rats. FLX or Veh was administered s.c. 23, 5 and 1h before the test. aCSF, GAL(1-15) were injected i.c.v. 15min before the test. Data represents the mean  $\pm$  SEM of immobility, climbing and swimming times in FST during the 5min test period (n=7-9 rats per group). \*p < 0.05 according to Student's unpaired t-test.

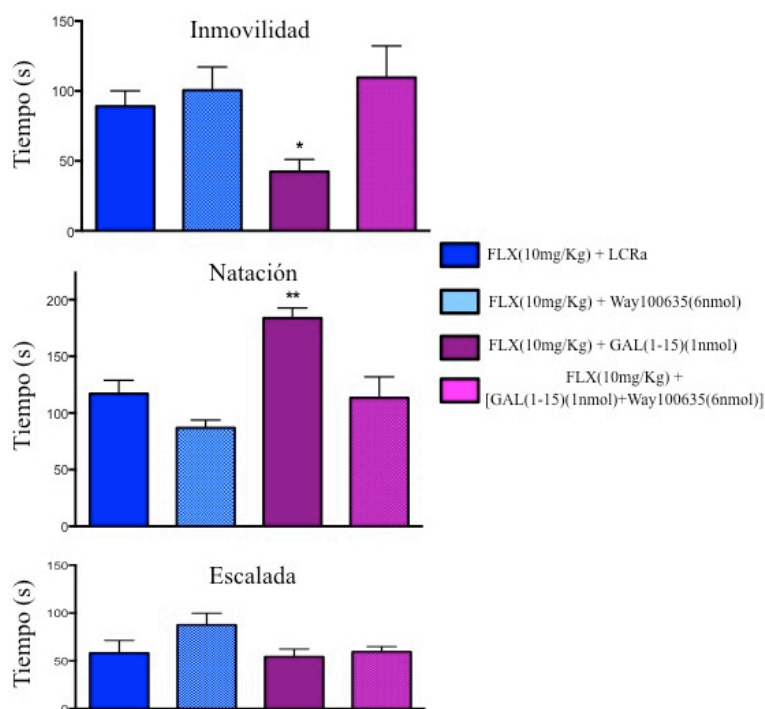
Taken together, the data obtained in the experiments that were performed to determine the involvement of galanergic receptors GALR1 and GALR2 in the interaction of GAL(1-15)-FLX, reinforced the hypothesis that GALR1 and GALR2 are involved in the mechanism of action of GAL(1-15), since the interaction shown by GAL(1-15) with FLX at the behavioural level is blocked by administering antagonists or reducing the expression of some of the two galanergic receptors studied.

### **Interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine: role of serotonergic 5-HT1AR**

To determine the involvement of the 5-HT1AR in the GAL(1-15)-FLX interaction, we carried out two experiments. We first studied the role of this receptor in the FST using

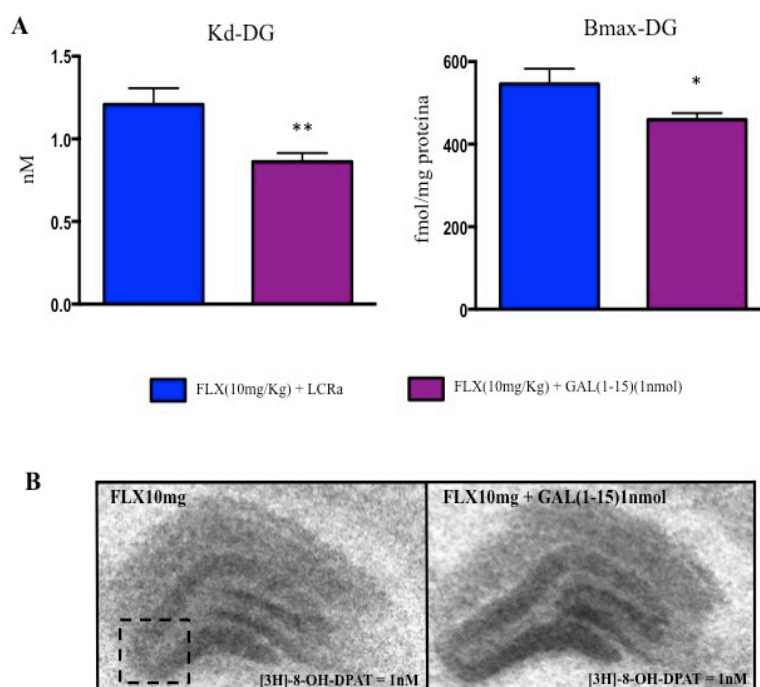
the specific 5-HT<sub>1A</sub>R antagonist Way100635. Then, by autoradiography and *in situ hybridization*, we determined whether the coadministration of GAL(1-15) and FLX modified the functional characteristics of 5-HT<sub>1A</sub>R and the expression levels of its messenger mRNA.

In the first experiment, the injection patterns were the same as those described in previous experiments. The results showed that the administration of FLX(10mg/Kg) and GAL(1-15)(1nmol)+Way100635(6nmol) blocked the enhancing effect of GAL(1-15) on FLX, since it induced a decrease in immobility time and an increase in swimming time compared with the group treated with FLX(10mg/Kg) and GAL(1-15)(1nmol) (Figure 7). The results also showed that the coadministration of FLX(10mg/Kg) +Way100635(6nmol) did not induce significant differences compared to the animals treated with the effective dose of FLX(10mg/Kg) alone in any parameters (Figure6). These results suggested a fundamental role for 5-HT<sub>1A</sub>R in the enhancing effect of GAL(1-15) over FLX. In addition, the Way100635 antagonist does not block the effect of FLX administered at the indicated dose and times.

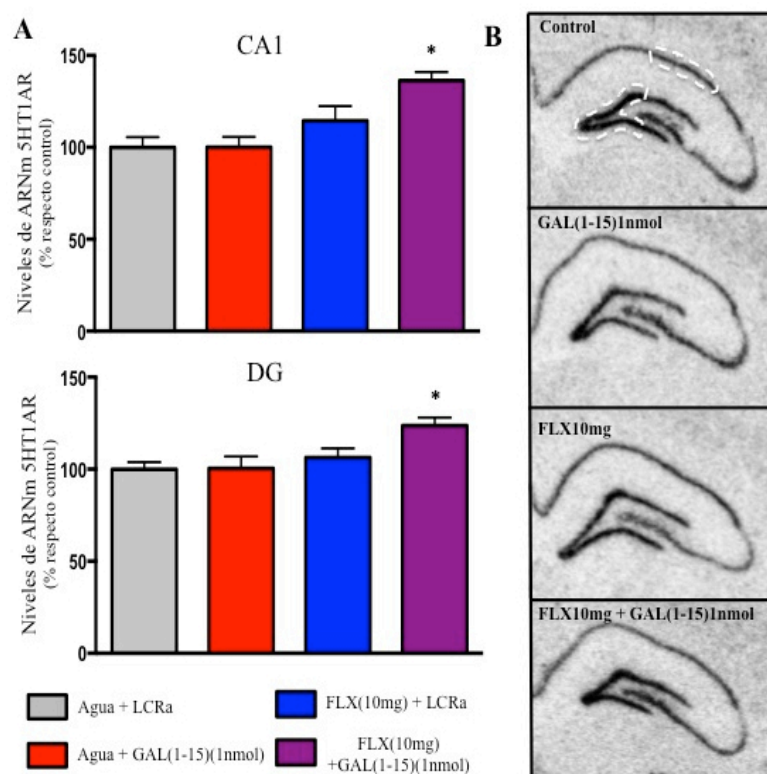


**Figure 7:** Behavioural effects of the coadministration of an effective dose of FLX(10mg/kg) and GAL(1-15)(1nmol) alone or in combination with Way100635(6nmol) in the FST. FLX was administered s.c. 23, 5 and 1h before the test. CSFa, GAL(1-15), Way100635 or GAL(1-15)+Way100635 were injected i.c.v. 15min before the test. Data represents the mean  $\pm$  SEM of immobility, climbing and swimming time in FST during the 5min test period (n=7-9 rats per group). \*p<0.05, \*\*p<0.01 versus all the groups according to a one way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test.

In the autoradiography and *in situ hybridization* experiments, the results showed that in the dentate gyrus of the hippocampus (DG), the coadministration of FLX(10mg/Kg) with GAL(1-15)(1nmol) produced a decrease of 30% in the value of the Kd and a decrease of 15% in the Bmax compared with the group of animals injected with the effective dose of FLX(10mg/Kg) (Figure 8). In addition, the results obtained by *in situ hybridization* also showed that the coadministration of FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) induced a significant increase in mRNA levels in the DG and CA1 regions compared to the other groups (Figure 9). No modification was observed in the functional characteristics of the 5-HT1AR or in the levels of expression of mRNA in the DR in any experimental group.



**Figure 8:** Effects on the binding characteristics of 5-HT1AR agonist [3H]-8-OH-DPAT in the dental gyrus (DG) of the hippocampus (A) after the coadministration of FLX(10mg/kg) and aCSF or GAL(1-15)(1nmol). FLX was administered sc 23, 5 and 1,25 h before sacrifice and GAL(1-15) or CSFa were injected i.c.v. 30 min before. Saturation experiments were performed with ten concentrations of [3H]-8-OH-DPAT (0.26-10nM) in sections from the hippocampus. Non-specific binding was defined as the binding in the presence of 10mM serotonin. The Kd and the Bmax values are shown as the mean  $\pm$  SEM (n=6 per group). In FLX(10mg/kg) the Kd (nM) value was  $1.2 \pm 0.1$  and Bmax(fmol/mg prot) was  $545 \pm 37$ . \*p<0.05; \*\*p<0.01 according to Student's unpaired t-test. (B) Representative autoradiograms from hippocampus sections of rat showing an increase in the affinity of the agonist for 5-HT1AR with a low concentration of the radioligand (1 nM).



**Figure 9:** (A) Effects of the coadministration of FLX(10mg/kg) and GAL(1-15)(1nmol) on 5-HT1AR mRNA levels in the dorsal hippocampus (CA1 and DG). FLX was administered sc 23, 5 and 1,25 h before sacrifice and GAL(1-15) was injected i.c.v. 30min before sacrifice. The values of optical density (O.D.), and mean  $\pm$  SEM (n=6 per group), are expressed as percentages with respect to the control values (100%). \*p<0.05 versus all groups according to a one way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test (B) Representative autoradiograms from the dorsal hippocampus showing the levels of mRNA coding for 5-HT1AR determined by in situ hybridization and the analysed areas.

## DISCUSSION

### Role of GAL(1-15) in anxiety and depression. Development of homology models of the GALR1 and GALR2 receptors.

In the current study, we demonstrated that GAL(1–15) induces a depression-related and anxiogenic-like effects in the tail suspension test, and the light/dark test respectively. These results are in agreement with our previous work in which we had showed that GAL(1-15) has a depression-related effect in the FST and an anxiogenic-like effects in the open field that was significantly stronger than the corresponding behavioural effects induced by GAL (Millón et al., 2015). Our results confirmed the view that, at a behavioural level, GAL(1-15) has a specific role in brain communication and a potential role in mood disorders.

In this thesis, we also have developed, for the first time, homology models of GALR1 and GALR2 with complete receptor sequences using the software DiscoveryStudio according to previous works (Eswar et al., 2007; Fiser, 2010). Several computational works on interactions between GPCRs indicated that, in addition to the role of the transmembrane segments in the formation of heterodimers, the participation of helix 8 located at the C-terminal is also important for the formation of receptor complexes (Filizola et al., 2006; Simpson et al., 2010; Gorinski et al., 2012; Johnson et al., 2012). The obtained homology models were visually compared to previous computational models (Hui et al., 2016) and we also confirmed that the amino acid residues involved in the interaction between different ligands with the galaninergetic receptors are disposed towards the internal cavity formed by the transmembrane segments, confirming the adequate orientation of said residues with respect to a hypothetical place of union with the GAL (Kask et al., 1998; Lundstrom et al., 2007; Runesson et al., 2010). Since the precise structure of GALR1 and GALR2 has not been elucidated, these models meet the appropriate structural requirements to study the mechanisms involved in the formation of the GALR1-GALR2 heterodimer.

### **Interaction between GAL(1-15) and the antidepressant fluoxetine: role of GALR1, GALR2 and 5-HT1AR.**

In the current study, we demonstrated for the first time that GAL(1-15) enhances the antidepressant-like effects induced by FLX in the FST. These effects were specific since GAL lacks the effect. Our results also indicated the involvement of a GALR1-GALR2 heteroreceptor complex in the GAL(1-15)-mediated actions based on the use of the specific GALR2 antagonist M871 and the siGalR1 and siGalR2 rat models. Importantly, 5-HT1AR participates in GAL(1-15)-FLX interactions since the 5-HT1AR antagonist WAY100635 blocked the behavioural effects in the FST induced by the coadministration of GAL(1-15) and FLX. The mechanism underlying the GAL(1-15)-FLX interactions involved increases in the affinity of 5-HT1AR agonist binding in the DG with changes also at the transcriptional level in both CA1 and DG. GAL(1-15)-FLX interactions affected the binding characteristics as well as the mRNA levels of 5-HT1AR specifically in the dorsal hippocampus, while leaving the 5-HT1AR mRNA levels of receptor agonist binding unaffected in the dorsal raphe.



The FST is used as a behavioural test to predict the efficacy of antidepressant treatments. The FST is an attractive behavioural screen for antidepressant drugs since it is quick to perform, reliable across laboratories, and sensitive to the effects of all of the major classes of antidepressant drugs. In this test, the main indication of an antidepressant-like action of any given compound is a decrease in immobility behaviour (Detke et al., 1995a, 1995b). The scoring of the active behaviours of swimming and climbing gave additional information about the mechanism of action that mediates the antidepressant-like effect. In fact, selective 5-HT reuptake inhibitors decrease immobility and increase swimming behaviour (Detke et al., 1995a, 1995b).

Our results in the FST showed that FLX(10mg/kg) administered at 23, 5 and 1h before the 5min test significantly reduced the immobility and increased swimming time and FLX(2.5mg/kg) lacked these effects. These results are in agreement with previous studies, and they validated the behavioural model that was used (Detke et al., 1997; Estrada-Camarena et al., 2006). In addition, our results indicated that GAL(1-15) enhanced FLX induced antidepressant effects in the FST. A decrease in immobility behaviour and an increase in swimming behaviour were observed following cotreatment with threshold doses of GAL(1-15) and FLX(2.5mg/kg). When administered alone, neither GAL(1-15)(1nmol) nor FLX(2.5mg/kg) affected the performance in the test, indicating that GAL(1-15) and FLX interacted to provoke the enhanced antidepressant-like responses. Since an effective dose of GAL(1-15) induced a pro-depressive effect (Millon et al., 2015), the antidepressant effect could only be due to the enhancement of FLX action. Moreover, the strong enhancement by GAL(1-15) of the antidepressant FLX action was validated using an effective dose of FLX.

On the other hand, the results indicated that GALR1 and GALR2 participated in the GAL(1-15) FLX interaction in the FST since the GALR2 antagonist M871 and the siGalR1 and siGalR2 animals models blocked the enhancing effect of GAL(1-15) on the antidepressant-like action of FLX. It is interesting to note that, in siGalR1 and siGalR2 rats, FLX alone reduced the immobility and increased swimming time in the FST, indicating that the effect of FLX is not affected by the reduction of GALR1 or GALR2 expression. Previous work showed that GALR1-GALR2 heteroreceptors are observed in the neurons of the dorsal hippocampus and DR (Millon et al., 2015). The enhancing effects of GAL(1-15) on FLX mediated actions in the FST were not observed with the



coadministration of GAL. These results validated the concept that GAL(1-15) mediated actions depend on the existence of GALR1-GALR2 heteroreceptors complexes in the brain, and they extend the vision of a specific role for GAL(1-15) in brain communication (Borroto-Escuela et al., 2014; Fuxe et al., 2012; Millon et al., 2015, 2016).

We have also showed a fundamental role for the 5-HT<sub>1A</sub>R in the GAL(1-15)-FLX interaction since the use of the specific 5-HT<sub>1A</sub>R antagonist WAY100635 blocked the enhancing effects of GAL(1-15) over FLX in the FST. Several authors have reported that WAY100635, when administered together with an effective dose of FLX, is able to block its antidepressant action. However, if the antagonist is administered at a different time point, similar to in the current study, the antidepressant-like activity of FLX in the FST is maintained (Estrada-Camarena et al., 2006; Serres et al., 2000). The fact that the ability to block the effects of FLX in the FST by WAY100635 depends on its management pattern is of great interest. It is compatible with the notion that GAL(1-15), through allosteric agonist interactions in GALR1-GALR2-5-HT<sub>1A</sub>R heteroreceptor complexes (Figure 10), may include effects on the recognition, pharmacology and signalling of the participating 5-HT<sub>1A</sub>R protomers. Such events can facilitate the understanding of the mechanism for improvement of FLX antidepressant actions by GAL(1-15).

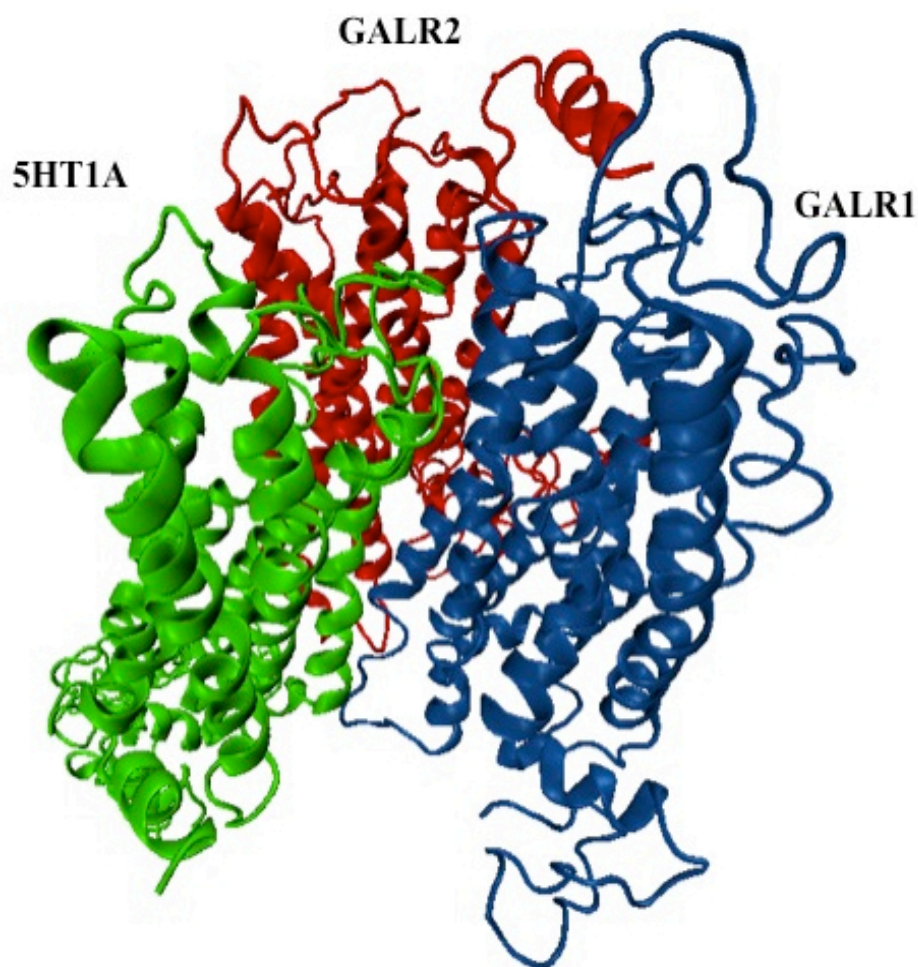
The coadministration of GAL(1-15) and FLX also modified the functionality and expression of 5-HT<sub>1A</sub>R at the hippocampal level. The coadministration of GAL(1-15)+FLX induced an increase in postsynaptic levels of the mRNA in the dorsal hippocampus and a decrease in the K<sub>d</sub> and B<sub>max</sub> values, specifically in the DG, while there were no modifications at the DR level. Although we do not know the main types of 5-HT homo- and heteroreceptor complexes involved in the antidepressant effects of FLX, the results indicated an important role for hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> postsynaptic receptors in mediating the enhancing effects of the interaction GAL(1-15)-FLX, possibly as members of heteroreceptor complexes 5-HT<sub>1A</sub>R-GALR1-GALR2.

In previous works, we demonstrated that the GALR1-GALR2 complexes could operate via allosteric GALR1-GALR2 interactions, which inhibited the Gq/G11-mediated signalling of the GALR2 protomer and switched the isoreceptor complex towards Gi/o-



mediated signalling (Borroto-Escuela et al., 2014; Millon et al., 2015). The increases in the extracellular levels of 5-HT induced by FLX may favour the formation of GALR1-GALR2-5-HT1AR complexes where the allosteric interactions could explain the enhanced signalling of the 5-HT1AR protomer, although this mechanism must be confirmed. The participation of other subtypes of 5-HT receptors in the interaction should also be analysed.

In summary, our results indicated that the administration i.c.v. of GAL(1-15) improves the antidepressant effects induced by FLX in the FST. The target for GAL(1-15) may mainly be the 5-HT1AR-GALR1-GALR2 complex located in the dorsal hippocampus (Fuxe et al. ., 2008, 2012; Millon et al., 2016 Millon et al., 2015). The results open up the possibility of using GAL(1-15), or some agonist thereof or a bivalent drug, as a new pharmacological augmentation strategy together with FLX against depression.



**Figure 9:** Representative image of a hypothetical trimer formed by GALR1-GALR2-5-HT1AR. The homology models developed with DiscoveryStudio during the thesis work were used. A ZDOCK protocol (Cheng et al., 2003) was used to generate this trimer.

## CONCLUSIONS

**First:** The intracerebroventricular administration of GAL(1-15) induces a depressive-related and anxiogenic-like effect in the tail suspension test and in the light/dark test, respectively.

**Second:** For the first time, homology models of the GALR1 and GALR2 receptors were generated, including the N and C-terminal ends, to study the formation of GALR1-GALR2 heterodimers and the binding of these heterodimers with their ligands.

**Third:** GAL(1-15) at threshold doses enhances the antidepressant-like effects of FLX in the FST. The enhancement induced by GAL(1-15) is mediated in effective and non-effective doses of the antidepressant, showing a very strong effect with the effective dose of FLX. This enhancement is exclusive of the GAL(1-15) fragment since GAL did not induce any modification on the FLX effects.

**Fourth:** The galaninergic receptors GALR1 and GALR2 have a key role in the enhancement induced by GAL(1-15) on the antidepressant-like effects of FLX in the FST. The use of the GALR2 specific antagonist M871 and siGalR1 and siGalR2 rats blocked the potentiation of GAL(1-15) over FLX. These results confirmed our previous hypothesis that GAL(1-15) acts through the formation of the GALR1-GALR2 heterodimer.

**Fifth:** The serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptor is involved in the interaction between GAL(1-15) and FLX at the behavioural level. The specific antagonist of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor Way100635 blocked the potentiation of GAL(1-15) on the antidepressant effects of FLX in FST.

**Sixth:** The coadministration of GAL(1-15) and FLX modified the characteristics and expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus. An increase in the affinity of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors was observed together with a reduction in its density in the GD, in addition to an increase in the levels of RNA messenger of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the GD and in CA1.

**Seventh:** All the results obtained in this thesis suggested the formation of a mosaic of GALR1-GALR2-5-HT<sub>1A</sub>R receptors in the dorsal hippocampus as part of the mechanism of action underlying the GAL(1-15)-FLX interaction which enhanced the antidepressant effects of the FLX in the FST.



# BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Abelaira, H. M., Reus, G. Z., Quevedo, J., 2013. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr* 35 Suppl 2, S112-120.

Akhtar, S., Benter, I. F., 2007. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 117, 3623-3632.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

Amaral, D. G., Scharfman, H. E., Lavenex, P., 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163, 3-22.

Amargos-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M. V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., Toth, M., Mengod, G., Artigas, F., 2004. Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14, 281-299.

Artigas, F., 2013. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 137, 119-131.

Artigas, F., Perez, V., Alvarez, E., 1994. Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch Gen Psychiatry* 51, 248-251.

Artigas, F., Romero, L., de Montigny, C., Blier, P., 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. *Trends Neurosci* 19, 378-383.

Baldwin, J. M., 1994. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 180-190.

Barnes, N. M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.

Barrera, G., Echevarria, D. J., Poulin, J. F., Laforest, S., Drolet, G., Morilak, D. A., 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, 289-292.

Baskin, L., Urschel, S., Eiberger, B., 2008. A novel ex-vivo application of RNAi for neuroscience. *Biotechniques* 45, 338-339.

Bellido, I., Diaz-Cabiale, Z., Jimenez-Vasquez, P. A., Andbjør, B., Mathe, A. A., Fuxe, K., 2002. Increased density of galanin binding sites in the dorsal raphe in a genetic rat model of depression. *Neurosci Lett* 317, 101-105.

Benmansour, S., Cecchi, M., Morilak, D. A., Gerhardt, G. A., Javors, M. A., Gould, G. G., Frazer, A., 1999. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci* 19, 10494-10501.

- Berthold, M., Kahl, U., Jureus, A., Kask, K., Nordvall, G., Langel, U., Bartfai, T., 1997. Mutagenesis and ligand modification studies on galanin binding to its GTP-binding-protein-coupled receptor GalR1. *Eur J Biochem* 249, 601-606.
- Bing, O., Moller, C., Engel, J. A., Soderpalm, B., Heilig, M., 1993. Anxiolytic-like action of centrally administered galanin. *Neurosci Lett* 164, 17-20.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., Dumuis, A., 2008. 5-HT(4) receptors: history, molecular pharmacology and brain functions. *Neuropharmacology* 55, 922-931.
- Bogdanova, O. V., Kanekar, S., D'Anci, K. E., Renshaw, P. F., 2013. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 118, 227-239.
- Boldrini, M., Underwood, M. D., Mann, J. J., Arango, V., 2008. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* 42, 433-442.
- Bonifazi, A., Yano, H., Ellenberger, M. P., Muller, L., Kumar, V., Zou, M. F., Cai, N. S., Guerrero, A. M., Woods, A. S., Shi, L., Newman, A. H., 2017. Novel Bivalent Ligands Based on the Sumanriole Pharmacophore Reveal Dopamine D2 Receptor (D2R) Biased Agonism. *J Med Chem* 60, 2890-2907.
- Borroto-Escuela, D. O., Li, X., Tarakanov, A. O., Savelli, D., Narvaez, M., Shumilov, K., Andrade-Talavera, Y., Jimenez-Beristain, A., Pomierny, B., Diaz-Cabiale, Z., Cuppini, R., Ambrogini, P., Lindskog, M., Fuxe, K., 2017. Existence of Brain 5-HT1A-5-HT2A Isoreceptor Complexes with Antagonistic Allosteric Receptor-Receptor Interactions Regulating 5-HT1A Receptor Recognition. *ACS Omega* 2, 4779-4789.
- Borroto-Escuela, D. O., Narvaez, M., Di Palma, M., Calvo, F., Rodriguez, D., Millon, C., Carlsson, J., Agnati, L. F., Garriga, P., Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., 2014. Preferential activation by galanin 1-15 fragment of the GalR1 protomer of a GalR1-GalR2 heteroreceptor complex. *Biochem Biophys Res Commun* 452, 347-353.
- Borroto-Escuela, D. O., Narvaez, M., Marcellino, D., Parrado, C., Narvaez, J. A., Tarakanov, A. O., Agnati, L. F., Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., 2010. Galanin receptor-1 modulates 5-hydroxytryptamine-1A signaling via heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 767-772.
- Bortolozzi, A., Castane, A., Semakova, J., Santana, N., Alvarado, G., Cortes, R., Ferres-Coy, A., Fernandez, G., Carmona, M. C., Toth, M., Perales, J. C., Montefeltro, A., Artigas, F., 2012. Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT1A autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol Psychiatry* 17, 612-623.
- Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., Walker, M. W., 2000. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21, 109-117.
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D.



- M., Karplus, M., 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30, 1545-1614.
- Campos, A. C., Fogaca, M. V., Aguiar, D. C., Guimaraes, F. S., 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr* 35 Suppl 2, S101-111.
- Castagne, V., Porsolt, R. D., Moser, P., 2009. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur J Pharmacol* 616, 128-133.
- Castren, E., Rantamaki, T., 2010. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* 70, 289-297.
- Castro, E., Diaz, A., Rodriguez-Gaztelumendi, A., Del Olmo, E., Pazos, A., 2008. WAY100635 prevents the changes induced by fluoxetine upon the 5-HT1A receptor functionality. *Neuropharmacology* 55, 1391-1396.
- Celada, P., Bortolozzi, A., Artigas, F., 2013. Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs* 27, 703-716.
- Chaudhury, D., Liu, H., Han, M. H., 2015. Neuronal correlates of depression. *Cell Mol Life Sci* 72, 4825-4848.
- Chen, D., Meng, L., Pei, F., Zheng, Y., Leng, J., 2017. A review of DNA methylation in depression. *J Clin Neurosci* 43, 39-46.
- Chen, N. H., Reith, M. E., Quick, M. W., 2004. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* 447, 519-531.
- Chen, R., Li, L., Weng, Z., 2003. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* 52, 80-87.
- Chen, S. H., Zhaori, G., 2011. Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations. *Eur J Clin Invest* 41, 221-232.
- Chermat, R., Thierry, B., Mico, J. A., Steru, L., Simon, P., 1986. Adaptation of the tail suspension test to the rat. *J Pharmacol* 17, 348-350.
- Christopoulos, A., Kenakin, T., 2002. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54, 323-374.
- Church, W. B., Jones, K. A., Kuiper, D. A., Shine, J., Iismaa, T. P., 2002. Molecular modelling and site-directed mutagenesis of human GALR1 galanin receptor defines determinants of receptor subtype specificity. *Protein Eng* 15, 313-323.
- Corya, S. A., Williamson, D., Sanger, T. M., Briggs, S. D., Case, M., Tollefson, G., 2006. A randomized, double-blind comparison of olanzapine/fluoxetine combination, olanzapine, fluoxetine, and venlafaxine in treatment-resistant depression. *Depress Anxiety* 23, 364-372.

- Costanzi, S., Wang, K., 2014. The GPCR crystallography boom: providing an invaluable source of structural information and expanding the scope of homology modeling. *Adv Exp Med Biol* 796, 3-13.
- Crawley, J., Goodwin, F. K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13, 167-170.
- Cremers, T. I., Giorgetti, M., Bosker, F. J., Hogg, S., Arnt, J., Mork, A., Honig, G., Bogeso, K. P., Westerink, B. H., den Boer, H., Wikstrom, H. V., Tecott, L. H., 2004. Inactivation of 5-HT(2C) receptors potentiates consequences of serotonin reuptake blockade. *Neuropsychopharmacology* 29, 1782-1789.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., Lucki, I., 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 547-569.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K., 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.
- de Almeida, J., Mengod, G., 2007. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT(2A) receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem* 103, 475-486.
- de Fougerolles, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., Lieberman, J., 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 443-453.
- de Kloet, E. R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.
- De Vry, J., Schreiber, R., Melon, C., Dalmus, M., Jentsch, K. R., 2004. 5-HT1A receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 14, 487-495.
- Deacon, R. M., Rawlins, J. N., 1996. Equithesin without chloral hydrate as an anaesthetic for rats. *Psychopharmacology (Berl)* 124, 288-290.
- Dean, J., Keshavan, M., 2017. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr* 27, 101-111.
- Delgado, P. L., Charney, D. S., Price, L. H., Aghajanian, G. K., Landis, H., Heninger, G. R., 1990. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Arch Gen Psychiatry* 47, 411-418.
- Descarries, L., Riad, M., 2012. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT1A receptors and SERT. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2416-2425.

Desikan, A., Wills, D. N., Ehlers, C. L., 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.

Detke, M. J., Johnson, J., Lucki, I., 1997. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol* 5, 107-112.

Detke, M. J., Lucki, I., 1996. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res* 73, 43-46.

Detke, M. J., Rickels, M., Lucki, I., 1995a. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121, 66-72.

Detke, M. J., Wieland, S., Lucki, I., 1995b. 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, 47-54.

Diaz-Cabiale, Z., Narvaez, J. A., Marcos, P., Cordon, M. P., Covenas, R., Fuxe, K., Gonzalez-Baron, S., 1998. Galanin and NH<sub>2</sub>-terminal galanin fragments in central cardiovascular regulation. *Ann N Y Acad Sci* 863, 421-424.

Diaz-Cabiale, Z., Narvaez, J. A., Yanaihara, N., Gonzalez-Baron, S., Fuxe, K., 2000. Galanin/alpha2-receptor interactions in central cardiovascular control. *Neuropharmacology* 39, 1377-1385.

Diaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Narvaez, M., Millon, C., Puigcerver, A., Fuxe, K., Narvaez, J. A., 2010. Neurochemical modulation of central cardiovascular control: the integrative role of galanin. *EXS* 102, 113-131.

Diaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Vela, C., Covenas, R., Yanaihara, N., Fuxe, K., Gonzalez-Baron, S., Narvaez, J. A., 2005a. Intracisternal galanin/angiotensin II interactions in central cardiovascular control. *Regul Pept* 127, 133-140.

Diaz-Cabiale, Z., Parrado, C., Vela, C., Razani, H., Covenas, R., Fuxe, K., Narvaez, J. A., 2005b. Role of galanin and galanin(1-15) on central cardiovascular control. *Neuropeptides* 39, 185-190.

Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., Lopez-Rubalcava, C., 2003. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 28, 830-838.

Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., Lopez-Rubalcava, C., 2006. Participation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 31, 247-255.

Estrada-Camarena, E., Rivera, N. M., Berlanga, C., Fernandez-Guasti, A., 2008. Reduction in the latency of action of antidepressants by 17 beta-estradiol in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 201, 351-360.



Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., Sali, A., 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 2, Unit 2 9.

Fang, P., He, B., Shi, M., Kong, G., Dong, X., Zhu, Y., Bo, P., Zhang, Z., 2015. The regulative effect of galanin family members on link of energy metabolism and reproduction. *Peptides* 71, 240-249.

Fava, M., Davidson, K. G., 1996. Definition and epidemiology of treatment-resistant depression. *Psychiatr Clin North Am* 19, 179-200.

Ferres-Coy, A., Galofre, M., Pilar-Cuellar, F., Vidal, R., Paz, V., Ruiz-Bronchal, E., Campa, L., Pazos, A., Caso, J. R., Leza, J. C., Alvarado, G., Montefeltro, A., Valdizan, E. M., Artigas, F., Bortolozzi, A., 2016. Therapeutic antidepressant potential of a conjugated siRNA silencing the serotonin transporter after intranasal administration. *Mol Psychiatry* 21, 328-338.

Filizola, M., Wang, S. X., Weinstein, H., 2006. Dynamic models of G-protein coupled receptor dimers: indications of asymmetry in the rhodopsin dimer from molecular dynamics simulations in a POPC bilayer. *J Comput Aided Mol Des* 20, 405-416.

Fiser, A., 2010. Template-based protein structure modeling. *Methods Mol Biol* 673, 73-94.

Flint, J., Kendler, K. S., 2014. The Genetics of Major Depression. *Neuron* 81, 1214.

Flores-Burgess et al., 2018. Small Interference RNA Knockdown Rats in Behavioral Functions: GALR1/GALR2 Heteroreceptor in Anxiety and Depression-Like Behavior. Kjell F. (Ed.), Borroto-Escuela D., (Ed.). *Receptor-Receptor Interactions in the Central Nervous System* (pp133-148). Springer, Berlin, Germany.

Forster, E. A., Cliffe, I. A., Bill, D. J., Dover, G. M., Jones, D., Reilly, Y., Fletcher, A., 1995. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol* 281, 81-88.

Franco, R., 2009. G-protein-coupled receptor heteromers or how neurons can display differently flavoured patterns in response to the same neurotransmitter. *Br J Pharmacol* 158, 23-31.

Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gustafsdottir, S. M., Ostman, A., Landegren, U., 2002. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol* 20, 473-477.

Funck, V. R., Fracalossi, M. P., Vidigal, A. P. P., Beijamini, V., 2018. Dorsal hippocampal galanin modulates anxiety-like behaviours in rats. *Brain Res* 1687, 74-81.

Furtado, M., Katzman, M. A., 2015. Examining the role of neuroinflammation in major depression. *Psychiatry Res* 229, 27-36.

Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A. O., Calvo, F., Garriga, P., Tena, M., Narvaez, M., Millon, C., Parrado, C., Ciruela, F., Agnati, L. F.,



- Narvaez, J. A., Diaz-Cabiale, Z., 2012. On the existence and function of galanin receptor heteromers in the central nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 127.
- Fuxe, K., Jansson, A., Diaz-Cabiale, Z., Andersson, A., Tinner, B., Finnman, U. B., Misane, I., Razani, H., Wang, F. H., Agnati, L. F., Ogren, S. O., 1998. Galanin modulates 5-hydroxytryptamine functions. Focus on galanin and galanin fragment/5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor interactions in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 863, 274-290.
- Fuxe, K., Marcellino, D., Rivera, A., Diaz-Cabiale, Z., Filip, M., Gago, B., Roberts, D. C., Langel, U., Genedani, S., Ferraro, L., de la Calle, A., Narvaez, J., Tanganelli, S., Woods, A., Agnati, L. F., 2008. Receptor-receptor interactions within receptor mosaics. Impact on neuropsychopharmacology. *Brain Res Rev* 58, 415-452.
- Fuxe, K., Ogren, S. O., Jansson, A., Cintra, A., Harfstrand, A., Agnati, L. F., 1988. Intraventricular injections of galanin reduces 5-HT metabolism in the ventral limbic cortex, the hippocampal formation and the fronto-parietal cortex of the male rat. *Acta Physiol Scand* 133, 579-581.
- Gomes, I., Ayoub, M. A., Fujita, W., Jaeger, W. C., Pflieger, K. D., Devi, L. A., 2016. G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 56, 403-425.
- Gonzalez, A., Cordomi, A., Matsoukas, M., Zachmann, J., Pardo, L., 2014. Modeling of G protein-coupled receptors using crystal structures: from monomers to signaling complexes. *Adv Exp Med Biol* 796, 15-33.
- Gorinski, N., Kowalsman, N., Renner, U., Wirth, A., Reinartz, M. T., Seifert, R., Zeug, A., Ponimaskin, E., Niv, M. Y., 2012. Computational and experimental analysis of the transmembrane domain 4/5 dimerization interface of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 82, 448-463.
- Gozlan, H., El Mestikawy, S., Pichat, L., Glowinski, J., Hamon, M., 1983. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 305, 140-142.
- Griebel, G., Belzung, C., Misslin, R., Vogel, E., 1993. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol* 4, 637-644.
- Grivas, V., Markou, A., Pitsikas, N., 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, 105-110.
- Gurevich, I., Tamir, H., Arango, V., Dwork, A. J., Mann, J. J., Schmauss, C., 2002. Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron* 34, 349-356.
- Haddjeri, N., Blier, P., de Montigny, C., 1998. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Neurosci* 18, 10150-10156.

- Hagan, C. E., McDevitt, R. A., Liu, Y., Furay, A. R., Neumaier, J. F., 2012. 5-HT(1B) autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. *Synapse* 66, 1024-1034.
- Hajszan, T., MacLusky, N. J., Leranath, C., 2005. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 21, 1299-1303.
- Hascoet, M., Bourin, M., 1998. A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 60, 645-653.
- Hasler, G., Drevets, W. C., Manji, H. K., Charney, D. S., 2004. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1765-1781.
- Hedlund, P., von Euler, G., Fuxe, K., 1991. Activation of 5-hydroxytryptamine1A receptors increases the affinity of galanin receptors in di- and telencephalic areas of the rat. *Brain Res* 560, 251-259.
- Hedlund, P. B., Finnman, U. B., Yanaihara, N., Fuxe, K., 1994. Galanin-(1-15), but not galanin-(1-29), modulates 5-HT1A receptors in the dorsal hippocampus of the rat brain: possible existence of galanin receptor subtypes. *Brain Res* 634, 163-167.
- Hedlund, P. B., Yanaihara, N., Fuxe, K., 1992. Evidence for specific N-terminal galanin fragment binding sites in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 224, 203-205.
- Hinojosa, F. R., Spricigo, L., Jr., Izidio, G. S., Bruske, G. R., Lopes, D. M., Ramos, A., 2006. Evaluation of two genetic animal models in behavioral tests of anxiety and depression. *Behav Brain Res* 168, 127-136.
- Hodes, G. E., Kana, V., Menard, C., Merad, M., Russo, S. J., 2015. Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci* 18, 1386-1393.
- Hoffmann, A., Sportelli, V., Ziller, M., Spengler, D., 2017. Epigenomics of Major Depressive Disorders and Schizophrenia: Early Life Decides. *Int J Mol Sci* 18.
- Holmes, A., Picciotto, M. R., 2006. Galanin: a novel therapeutic target for depression, anxiety disorders and drug addiction? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5, 225-232.
- Hooi, S. C., Maiter, D. M., Martin, J. B., Koenig, J. I., 1990. Galaninergic mechanisms are involved in the regulation of corticotropin and thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 127, 2281-2289.
- Hui, W. Q., Cheng, Q., Liu, T. Y., Ouyang, Q., 2016. Homology modeling, docking, and molecular dynamics simulation of the receptor GALR2 and its interactions with galanin and a positive allosteric modulator. *J Mol Model* 22, 90.
- Huynh, J., Thomas, W. G., Aguilar, M. I., Pattenden, L. K., 2009. Role of helix 8 in G protein-coupled receptors based on structure-function studies on the type 1 angiotensin receptor. *Mol Cell Endocrinol* 302, 118-127.
- Ihnatko, R., Theodorsson, E., 2017. Short N-terminal galanin fragments are occurring naturally in vivo. *Neuropeptides* 63, 1-13.

- Jacobowitz, D. M., Kresse, A., Skofitsch, G., 2004. Galanin in the brain: chemoarchitectonics and brain cartography--a historical review. *Peptides* 25, 433-464.
- Johnston, J. M., Wang, H., Provasi, D., Filizola, M., 2012. Assessing the relative stability of dimer interfaces in G protein-coupled receptors. *PLoS Comput Biol* 8, e1002649.
- Jorgensen, H., Kjaer, A., Warberg, J., Knigge, U., 2001. Differential effect of serotonin 5-HT(1A) receptor antagonists on the secretion of corticotropin and prolactin. *Neuroendocrinology* 73, 322-333.
- Jurkowski, W., Yazdi, S., Elofsson, A., 2013. Ligand binding properties of human galanin receptors. *Mol Membr Biol* 30, 206-216.
- Karlsson, R. M., Holmes, A., 2006. Galanin as a modulator of anxiety and depression and a therapeutic target for affective disease. *Amino Acids* 31, 231-239.
- Kask, K., Berthold, M., Kahl, U., Jureus, A., Nordvall, G., Langel, U., Bartfai, T., 1998. Mutagenesis study on human galanin receptor GalR1 reveals domains involved in ligand binding. *Ann N Y Acad Sci* 863, 78-85.
- Katona, C. L., Abou-Saleh, M. T., Harrison, D. A., Nairac, B. A., Edwards, D. R., Lock, T., Burns, R. A., Robertson, M. M., 1995. Placebo-controlled trial of lithium augmentation of fluoxetine and lofepramine. *Br J Psychiatry* 166, 80-86.
- Kilfoil, T., Michel, A., Montgomery, D., Whiting, R. L., 1989. Effects of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety in mice. *Neuropharmacology* 28, 901-905.
- Kobayashi, K., Ikeda, Y., Haneda, E., Suzuki, H., 2008. Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurosci* 28, 6272-6280.
- Kokare, D. M., Dandekar, M. P., Chopde, C. T., Subhedar, N., 2005. Interaction between neuropeptide Y and alpha-melanocyte stimulating hormone in amygdala regulates anxiety in rats. *Brain Res* 1043, 107-114.
- Kole, R., Krainer, A. R., Altman, S., 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 11, 125-140.
- Kovacs, D., Kovacs, P., Eszlari, N., Gonda, X., Juhasz, G., 2016. Psychological side effects of immune therapies: symptoms and pathomechanism. *Curr Opin Pharmacol* 29, 97-103.
- Krishnan, V., Nestler, E. J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.
- Kufareva, I., Abagyan, R., 2012. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol* 857, 231-257.
- Kuhhorn, J., Hubner, H., Gmeiner, P., 2011. Bivalent dopamine D2 receptor ligands: synthesis and binding properties. *J Med Chem* 54, 4896-4903.



Kuhn, H., Mennella, C., Magid, M., Stamu-O'Brien, C., Kroumpouzos, G., 2017. Psychocutaneous disease: Pharmacotherapy and psychotherapy. *J Am Acad Dermatol* 76, 795-808.

Kuteeva, E., Calza, L., Holmberg, K., Theodorsson, E., Ogren, S. O., Hokfelt, T., 2004. Distribution of galanin and galanin transcript in the brain of a galanin-overexpressing transgenic mouse. *J Chem Neuroanat* 28, 185-216.

Kuteeva, E., Hokfelt, T., Wardi, T., Ogren, S. O., 2008a. Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *Cell Mol Life Sci* 65, 1854-1863.

Kuteeva, E., Wardi, T., Hokfelt, T., Ogren, S. O., 2007. Galanin enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 64-69.

Kuteeva, E., Wardi, T., Lundstrom, L., Sollenberg, U., Langel, U., Hokfelt, T., Ogren, S. O., 2008b. Differential role of galanin receptors in the regulation of depression-like behavior and monoamine/stress-related genes at the cell body level. *Neuropsychopharmacology* 33, 2573-2585.

Lai, H. M., Cleary, M., Sitharthan, T., Hunt, G. E., 2015. Prevalence of comorbid substance use, anxiety and mood disorders in epidemiological surveys, 1990-2014: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 154, 1-13.

Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., Hokfelt, T., Kofler, B., 2015. Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol Rev* 67, 118-175.

Lau, T., Horschitz, S., Berger, S., Bartsch, D., Schloss, P., 2008. Antidepressant-induced internalization of the serotonin transporter in serotonergic neurons. *FASEB J* 22, 1702-1714.

Le Francois, B., Czesak, M., Steubl, D., Albert, P. R., 2008. Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* 55, 977-985.

Leonard, B. E., 2001. Stress, norepinephrine and depression. *J Psychiatry Neurosci* 26 Suppl, S11-16.

Li, M., D'Arcy, C., Meng, X., 2016. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. *Psychol Med* 46, 717-730.

Li, Q., Muma, N. A., van de Kar, L. D., 1996. Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors: reductions in hypothalamic and midbrain Gi and G(o) proteins and in neuroendocrine responses to a 5-HT<sub>1A</sub> agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 1035-1042.

Lu, X., Barr, A. M., Kinney, J. W., Sanna, P., Conti, B., Behrens, M. M., Bartfai, T., 2005. A role for galanin in antidepressant actions with a focus on the dorsal raphe nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 874-879.





- Lundstrom, L., Sollenberg, U. E., Bartfai, T., Langel, U., 2007. Molecular characterization of the ligand binding site of the human galanin receptor type 2, identifying subtype selective interactions. *J Neurochem* 103, 1774-1784.
- Ma, X., Tong, Y. G., Schmidt, R., Brown, W., Payza, K., Hodzic, L., Pou, C., Godbout, C., Hokfelt, T., Xu, Z. Q., 2001. Effects of galanin receptor agonists on locus coeruleus neurons. *Brain Res* 919, 169-174.
- Machado-Vieira, R., Henter, I. D., Zarate, C. A., Jr., 2017. New targets for rapid antidepressant action. *Prog Neurobiol* 152, 21-37.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., Duman, R. S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.
- Maletic, V., Eramo, A., Gwin, K., Offord, S. J., Duffy, R. A., 2017. The Role of Norepinephrine and Its alpha-Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review. *Front Psychiatry* 8, 42.
- Marcos, P., Diaz-Cabiale, Z., Cordon, M. P., Covenas, R., Yanaihara, N., Fuxe, K., Gonzalez-Baron, S., Narvaez, J. A., 2001. Central galanin and N-terminal galanin fragment induce c-Fos immunoreactivity in the medulla oblongata of the anesthetized rat. *Peptides* 22, 1501-1509.
- Mathew, S. J., Manji, H. K., Charney, D. S., 2008. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 2080-2092.
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L. K., Rebuffat, P., Nussdorfer, G. G., 1992. Effects of galanin on the secretory activity of the rat adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *Res Exp Med (Berl)* 192, 373-381.
- McGonigle, P., 2014. Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol* 87, 140-149.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M. J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12, 342-348.
- McKay, M. S., Zakzanis, K. K., 2010. The impact of treatment on HPA axis activity in unipolar major depression. *J Psychiatr Res* 44, 183-192.
- Meaney, M. J., 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24, 1161-1192.
- Melander, T., Hokfelt, T., Rokaeus, A., Cuello, A. C., Oertel, W. H., Verhofstad, A., Goldstein, M., 1986. Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J Neurosci* 6, 3640-3654.
- Melander, T., Kohler, C., Nilsson, S., Hokfelt, T., Brodin, E., Theodorsson, E., Bartfai, T., 1988. Autoradiographic quantitation and anatomical mapping of 125I-galanin binding sites in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat* 1, 213-233.



- Mengod, G., Palacios, J. M., Cortes, R., 2015. Cartography of 5-HT1A and 5-HT2A Receptor Subtypes in Prefrontal Cortex and Its Projections. *ACS Chem Neurosci* 6, 1089-1098.
- Michelsen, K. A., Prickaerts, J., Steinbusch, H. W., 2008. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 172, 233-264.
- Millon, C., Flores-Burgess, A., Narvaez, M., Borroto-Escuela, D. O., Santin, L., Gago, B., Narvaez, J. A., Fuxe, K., Diaz-Cabiale, Z., 2016. Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system. *Brain Struct Funct* 221, 4491-4504.
- Millon, C., Flores-Burgess, A., Narvaez, M., Borroto-Escuela, D. O., Santin, L., Parrado, C., Narvaez, J. A., Fuxe, K., Diaz-Cabiale, Z., 2015. A role for galanin N-terminal fragment (1-15) in anxiety- and depression-related behaviors in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18.
- Mitsukawa, K., Lu, X., Bartfai, T., 2008. Galanin, galanin receptors and drug targets. *Cell Mol Life Sci* 65, 1796-1805.
- Mizutani, H., Hori, T., Takahashi, T., 2006. 5-HT1B receptor-mediated presynaptic inhibition at the calyx of Held of immature rats. *Eur J Neurosci* 24, 1946-1954.
- Molendijk, M. L., Spinhoven, P., Polak, M., Bus, B. A., Penninx, B. W., Elzinga, B. M., 2014. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry* 19, 791-800.
- Moller, C., Sommer, W., Thorsell, A., Heilig, M., 1999. Anxiogenic-like action of galanin after intra-amygdala administration in the rat. *Neuropsychopharmacology* 21, 507-512.
- Morais, J. S., Souza, M. M., Campanha, T. M., Muller, C. J., Bittencourt, A. S., Bortoli, V. C., Schenberg, L. C., Beijamini, V., 2016. Galanin subtype 1 and subtype 2 receptors mediate opposite anxiety-like effects in the rat dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res* 314, 125-133.
- Morilak, D. A., Cecchi, M., Khoshbouei, H., 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, 715-726.
- Nakajima, H., Kubo, T., Semi, Y., Itakura, M., Kuwamura, M., Izawa, T., Azuma, Y., Takeuchi, T., 2012. A rapid, targeted, neuron-selective, in vivo knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *J Biotechnol* 157, 326-333.
- Narvaez, J. A., Diaz, Z., Aguirre, J. A., Gonzalez-Baron, S., Yanaihara, N., Fuxe, K., Hedlund, P. B., 1994. Intracisternally injected galanin-(1-15) modulates the cardiovascular responses of galanin-(1-29) and the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT. *Eur J Pharmacol* 257, 257-265.



Narvaez, J. A., Diaz-Cabiale, Z., Hedlund, P. B., Aguirre, J. A., Covenas, R., Gonzalez-Baron, S., Fuxe, K., 2000. The galanin receptor antagonist M40 blocks the central cardiovascular actions of the galanin N-terminal fragment (1-15). *Eur J Pharmacol* 399, 197-203.

Narvaez, M., Millon, C., Borroto-Escuela, D., Flores-Burgess, A., Santin, L., Parrado, C., Gago, B., Puigcerver, A., Fuxe, K., Narvaez, J. A., Diaz-Cabiale, Z., 2014. Galanin receptor 2-neuropeptide Y Y1 receptor interactions in the amygdala lead to increased anxiolytic actions. *Brain Struct Funct* 220, 2289-2301.

Nautiyal, K. M., Hen, R., 2017. Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Res* 6, 123.

Nestler, E. J., Carlezon, W. A., Jr., 2006. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59, 1151-1159.

Newman-Tancredi, A., Heusler, P., Martel, J. C., Ormiere, A. M., Leduc, N., Cussac, D., 2008. Agonist and antagonist properties of antipsychotics at human dopamine D4.4 receptors: G-protein activation and K<sup>+</sup> channel modulation in transfected cells. *Int J Neuropsychopharmacol* 11, 293-307.

Nickols, H. H., Conn, P. J., 2014. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Dis* 61, 55-71.

Nielsen, J. A., Moore, K. E., 1982. Effects of chloral hydrate, gamma-butyrolactone, and equithesin on the efflux of dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolites into cerebroventricular perfusates of rats. *J Neurochem* 39, 235-238.

Overington, J. P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A. L., 2006. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996.

Parker, K. J., Schatzberg, A. F., Lyons, D. M., 2003. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav* 43, 60-66.

Paxinos, George; Charles Watson . The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Inc. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA.

Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J. A., Berrocoso, E., 2014. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opin Drug Discov* 9, 567-578.

Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J., 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.

Pieribone, V. A., Xu, Z. Q., Zhang, X., Grillner, S., Bartfai, T., Hokfelt, T., 1995. Galanin induces a hyperpolarization of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in the brainstem slice. *Neuroscience* 64, 861-874.

Porcelli, S., Drago, A., Fabbri, C., Serretti, A., 2011. Mechanisms of antidepressant action: an integrated dopaminergic perspective. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 1532-1543.

- Porsolt, R. D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-336.
- Postal, M., Appenzeller, S., 2015. The importance of cytokines and autoantibodies in depression. *Autoimmun Rev* 14, 30-35.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463, 3-33.
- Pytka, K., Partyka, A., Jastrzebska-Wiesek, M., Siwek, A., Gluch-Lutwin, M., Mordyl, B., Kazek, G., Rapacz, A., Olczyk, A., Galuszka, A., Blachuta, M., Waszkielewicz, A., Marona, H., Sapa, J., Filipek, B., Wesolowska, A., 2015. Antidepressant- and Anxiolytic-Like Effects of New Dual 5-HT(1)A and 5-HT(7) Antagonists in Animal Models. *PLoS One* 10, e0142499.
- Pytliak, M., Vargova, V., Mechirova, V., Felsoci, M., 2011. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* 60, 15-25.
- Qu, Y., Aluisio, L., Lord, B., Boggs, J., Hoey, K., Mazur, C., Lovenberg, T., 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 92, 469-473.
- Razani, H., Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., Ogren, S. O., 2000. Intraventricular galanin produces a time-dependent modulation of 5-HT1A receptors in the dorsal raphe of the rat. *Neuroreport* 11, 3943-3948.
- Renault, P. F., Hoofnagle, J. H., Park, Y., Mullen, K. D., Peters, M., Jones, D. B., Rustgi, V., Jones, E. A., 1987. Psychiatric complications of long-term interferon alfa therapy. *Arch Intern Med* 147, 1577-1580.
- Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Gorinski, N., Guseva, D., Abdel-Galil, D., Frohlich, M., Doring, F., Wischmeyer, E., Richter, D. W., Neher, E., Ponimaskin, E. G., 2012. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J Cell Sci* 125, 2486-2499.
- Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Guiard, B. P., Stephen, A., Metzger, K. L., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., David, D. J., Beck, S. G., Hen, R., Leonardo, E. D., 2010. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65, 40-52.
- Robinson, Z. D., Riggs, P. D., 2016. Cooccurring Psychiatric and Substance Use Disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 25, 713-722.
- Rosenblat, J. D., Cha, D. S., Mansur, R. B., McIntyre, R. S., 2014. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 53, 23-34.
- Runesson, J., Sollenberg, U. E., Jurkowski, W., Yazdi, S., Eriksson, E. E., Elofsson, A., Langel, U., 2010. Determining receptor-ligand interaction of human galanin receptor type 3. *Neurochem Int* 57, 804-811.



Sahli, Z. T., Banerjee, P., Tarazi, F. I., 2016. The Preclinical and Clinical Effects of Vilazodone for the Treatment of Major Depressive Disorder. *Expert Opin Drug Discov* 11, 515-523.

Samuels, B. A., Anacker, C., Hu, A., Levinstein, M. R., Pickenhagen, A., Tsetsenis, T., Madronal, N., Donaldson, Z. R., Drew, L. J., Dranovsky, A., Gross, C. T., Tanaka, K. F., Hen, R., 2015. 5-HT<sub>1A</sub> receptors on mature dentate gyrus granule cells are critical for the antidepressant response. *Nat Neurosci* 18, 1606-1616.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.

Sensory, I., 2014. A review on the relationship between food structure, processing, and bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54, 902-909.

Serrats, J., Mengod, G., Cortes, R., 2005. Expression of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat* 29, 83-91.

Serres, F., Muma, N. A., Raap, D. K., Garcia, F., Battaglia, G., Van de Kar, L. D., 2000. Coadministration of 5-hydroxytryptamine(1A) antagonist WAY-100635 prevents fluoxetine-induced desensitization of postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptors in hypothalamus. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 296-301.

Sghendo, L., Mifsud, J., 2012. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *J Pharm Pharmacol* 64, 317-325.

Shelton, R. C., Osuntokun, O., Heinloth, A. N., Corya, S. A., 2010. Therapeutic options for treatment-resistant depression. *CNS Drugs* 24, 131-161.

Shen, M. Y., Sali, A., 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 15, 2507-2524.

Shim, M. S., Kwon, Y. J., 2010. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J* 277, 4814-4827.

Shopsin, B., Friedman, E., Gershon, S., 1976. Parachlorophenylalanine reversal of tranylcypromine effects in depressed patients. *Arch Gen Psychiatry* 33, 811-819.

Sicras-Mainar, A., Navarro-Artieda, R., Ruiz-Torres, A., Prados-Torres, A., Group, A. C. G. E. S., 2013. Morbidity and costs associated with neurological disorders. *Neurologia* 28, 126-129.

Silote, G. P., Rosal, A. B., de Souza, M. M., Bejamini, V., 2013. Infusion of galanin into the mid-caudal portion of the dorsal raphe nucleus has an anxiolytic effect on rats in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 252, 312-317.

Simpson, L. M., Taddese, B., Wall, I. D., Reynolds, C. A., 2010. Bioinformatics and molecular modelling approaches to GPCR oligomerization. *Curr Opin Pharmacol* 10, 30-37.



- Skofitsch, G., Jacobowitz, D. M., 1985. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6, 509-546.
- Smith, K., 2011. Trillion-dollar brain drain. *Nature* 478, 15.
- Smythies, J., 2005. Section V. Serotonin system. *Int Rev Neurobiol* 64, 217-268.
- Spasov, V. Z., Yan, L., 2008. A fast and accurate computational approach to protein ionization. *Protein Sci* 17, 1955-1970.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.
- Swanson, C. J., Blackburn, T. P., Zhang, X., Zheng, K., Xu, Z. Q., Hokfelt, T., Wolinsky, T. D., Konkel, M. J., Chen, H., Zhong, H., Walker, M. W., Craig, D. A., Gerald, C. P., Branchek, T. A., 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, 17489-17494.
- Taliaz, D., Stall, N., Dar, D. E., Zangen, A., 2010. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. *Mol Psychiatry* 15, 80-92.
- Tatemoto, K., Rokaeus, A., Jornvall, H., McDonald, T. J., Mutt, V., 1983. Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164, 124-128.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Vazquez-Palacios, G., Bonilla-Jaime, H., Velazquez-Moctezuma, J., 2005. Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 39-46.
- Vidi, P. A., Watts, V. J., 2009. Fluorescent and bioluminescent protein-fragment complementation assays in the study of G protein-coupled receptor oligomerization and signaling. *Mol Pharmacol* 75, 733-739.
- Volle, J., Bregman, T., Scott, B., Diwan, M., Raymond, R., Fletcher, P. J., Nobrega, J. N., Hamani, C., 2018. Deep brain stimulation and fluoxetine exert different long-term changes in the serotonergic system. *Neuropharmacology* 135, 63-72.
- Walsh, R. N., Cummins, R. A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83, 482-504.
- Weger, M., Sandi, C., 2018. High anxiety trait: A vulnerable phenotype for stress-induced depression. *Neurosci Biobehav Rev* 87, 27-37.
- Weiss, J. M., Bonsall, R. W., Demetrikopoulos, M. K., Emery, M. S., West, C. H., 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, 863-877.

Whooley, M. A., Wong, J. M., 2013. Depression and cardiovascular disorders. *Annu Rev Clin Psychol* 9, 327-354.

Wiczak, W., Rekowski, P., Kupryszewski, G., Lubkowski, J., Oldziej, S., Liwo, A., 1996. Fluorescence and Monte Carlo conformational studies of the (1-15) galanin amide fragment. *Biophys Chem* 58, 303-312.

Wong, D. T., Horng, J. S., Bymaster, F. P., Hauser, K. L., Molloy, B. B., 1974. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci* 15, 471-479.

Wong, M. L., Licinio, J., 2004. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov* 3, 136-151.

Xu, Z. Q., Zhang, X., Pieribone, V. A., Grillner, S., Hokfelt, T., 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, 79-94.

Yan, Y., Wang, Y. L., Su, Z., Zhang, Y., Guo, S. X., Liu, A. J., Wang, C. H., Sun, F. J., Yang, J., 2014. Effect of oxytocin on the behavioral activity in the behavioral despair depression rat model. *Neuropeptides* 48, 83-89.

Yoshimura, R., Hori, H., Ikenouchi-Sugita, A., Umene-Nakano, W., Ueda, N., Nakamura, J., 2009. Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 722-726.

Yoshitake, T., Reenila, I., Ogren, S. O., Hokfelt, T., Kehr, J., 2003. Galanin attenuates basal and antidepressant drug-induced increase of extracellular serotonin and noradrenaline levels in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 339, 239-242.

Zanos, P., Gould, T. D., 2018. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry* 23, 801-811.

Zhou, X., Keitner, G. I., Qin, B., Ravindran, A. V., Bauer, M., Del Giovane, C., Zhao, J., Liu, Y., Fang, Y., Zhang, Y., Xie, P., 2015. Atypical Antipsychotic Augmentation for Treatment-Resistant Depression: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Int J Neuropsychopharmacol* 18, pyv060.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





# ANEXO







# Galanin (1-15) enhancement of the behavioral effects of Fluoxetine in the forced swimming test gives a new therapeutic strategy against depression



Antonio Flores-Burgess, MsC <sup>a</sup>, Carmelo Millón, PhD <sup>a</sup>, Belén Gago, PhD <sup>a</sup>, Manuel Narváez, MD, PhD <sup>a</sup>, Dasiel O. Borroto-Escuela, PhD <sup>b</sup>, Guadalupe Mengod, PhD <sup>c</sup>, José Angel Narváez, MD, PhD <sup>a</sup>, Kjell Fuxe, MD, PhD <sup>b</sup>, Luis Santín, PhD <sup>d</sup>, Zaida Díaz-Cabiale, PhD <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Medicina, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

<sup>b</sup> Department of Neuroscience, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

<sup>c</sup> Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB-CSIC, IDIBAPS, CIBERNED, Barcelona 08036, Spain

<sup>d</sup> Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Psicología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 November 2016

Received in revised form

17 February 2017

Accepted 7 March 2017

Available online 11 March 2017

### Keywords:

Fluoxetine

Depression

Galanin(1-15)

5-HT1A receptor

## ABSTRACT

The pharmacological treatment of major depression is mainly based on drugs elevating serotonergic (5-HT) activity. Specifically, selective 5-HT reuptake inhibitors, including Fluoxetine (FLX), are the most commonly used for treatment of major depression. However, the understanding of the mechanism of action of FLX beyond its effect of elevating 5-HT is limited. The interaction between serotonergic system and neuropeptides signaling could be a key aspect. We examined the ability of the neuropeptide Galanin(1-15) [GAL(1-15)] to modulate the behavioral effects of FLX in the forced swimming test (FST) and studied feasible molecular mechanisms. The data show that GAL(1-15) enhances the antidepressant-like effects induced by FLX in the FST, and we demonstrate the involvement of GALR1/GALR2 heteroreceptor complex in the GAL(1-15)-mediated effect using *in vivo* rat models for siRNA GALR1 or GALR2 knockdown.

Importantly, 5-HT1A receptors (5HT1A-R) also participate in the GAL(1-15)/FLX interactions since the 5HT1AR antagonist WAY100635 blocked the behavioral effects in the FST induced by the coadministration of GAL(1-15) and FLX. The mechanism underlying GAL(1-15)/FLX interactions affected the binding characteristics as well as the mRNA levels of 5-HT1A-R specifically in the dorsal hippocampus while leaving unaffected mRNA levels and affinity and binding sites of this receptor in the dorsal raphe. The results open up the possibility to use GAL(1-15) as for a combination therapy with FLX as a novel strategy for treatment of depression.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Major Depression is the most frequent mood disorder, with a lifetime prevalence that has been reported to range from 7% to 21% (Albert et al., 2011). It is associated with a substantial functional impairment, diminished quality of life, increased burden both for patients and caregivers, as well as with a higher risk of mortality.

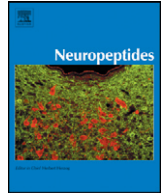
Although several neurotransmitter systems and brain areas

have been implicated in this pathology, the pharmacological treatment of major depression is mainly based on drugs elevating serotonergic (5-HT) activity (Blüher and de Montigny, 1994; Jans et al., 2007). Specifically, selective 5-HT reuptake inhibitors (SRRIs) are the most commonly used for treatment of major depression. In particular, Fluoxetine (FLX) is usually chosen for the treatment of symptoms of depression (Artigas, 2013). However the understanding of the mechanism of action of FLX beyond its effect of elevating 5-HT is limited. Recent studies have also implicated several neuropeptides in the pathophysiology of depression in rodents and in the possibility to use them as a combined treatment with antidepressant drugs.

\* Corresponding author.

E-mail address: [zaida@uma.es](mailto:zaida@uma.es) (Z. Díaz-Cabiale).





## News and reviews

# The neuropeptides Galanin and Galanin(1–15) in depression-like behaviours



Carmelo Millón <sup>a,\*</sup>, Antonio Flores-Burgess <sup>a</sup>, Manuel Narváez <sup>a</sup>, Dasiel O. Borroto-Escuela <sup>b</sup>, Belén Gago <sup>a</sup>, Luis Santín <sup>c</sup>, Estela Castilla-Ortega <sup>c</sup>, José Ángel Narváez <sup>a</sup>, Kjell Fuxe <sup>b</sup>, Zaida Díaz-Cabiale <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

<sup>b</sup> Department of Neuroscience, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

<sup>c</sup> Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Psicología, Departamento de Psicobiología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 August 2016

Received in revised form 24 January 2017

Accepted 24 January 2017

Available online 31 January 2017

## Keywords:

Depression

Galanin

## ABSTRACT

Galanin is a 29 amino acid neuropeptide widely distributed in neurons within the central nervous system. Galanin exerts its biological activities through three different G protein-receptors and participates in a number of functions, including mood regulation. Not only Galanin but also Galanin N-terminal fragments like Galanin(1–15) are active at the central level. In this work, we review the latest findings in studies on Galanin and Galanin(1–15) in depression-related behaviours. Our focus is on animal models for depression, and we pay some attention to research data obtained in human studies. Since Serotonin (5-HT), especially through 5-HT<sub>1A</sub>, and Galanin receptors interact at both pre- and postsynaptic level, the development of drugs targeting potential GAL<sub>1</sub>-GAL<sub>2</sub>-5-HT<sub>1A</sub> heteroreceptor complexes linked to the raphe-hippocampal 5-HT neurons may represent new treatment strategies in depression.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction . . . . .	39
2. Galanin in depression . . . . .	40
2.1. Galanin receptors in depression . . . . .	40
3. Galanin(1–15) in depression. . . . .	41
3.1. Galanin receptors involved in GAL(1–15)-mediated effect: siRNA GAL <sub>1</sub> receptor or GAL <sub>2</sub> receptor knockdown rats. . . . .	42
4. Effects of Galanin on monoamine systems. . . . .	43
5. Conclusion . . . . .	44
Acknowledgements . . . . .	44
References . . . . .	44

## 1. Introduction

Mood disorders, including depression and anxiety, are among the most prevalent mental illnesses with high socioeconomic impact (Gelenberg, 2010; Wittchen et al., 2011). Although the underlying mechanisms have not yet been clearly defined in the last decade the importance of the role of neuropeptides, including Galanin (GAL), and/or

their receptors in the treatment of stress-related mood disorders is becoming increasingly apparent (Kormos and Gaszner, 2013).

GAL is a 29 amino acid neuropeptide (Tatemoto et al., 1983) widely distributed in neurons within the central nervous system (CNS) including raphe nuclei, cerebral cortex and hippocampus (Jacobowitz et al., 2004) among other nuclei involved in mood disorders. Three GAL receptor subtypes (GAL<sub>1-3</sub> receptors) have been described (Branchek et al., 2000; Mitsukawa et al., 2008). GAL<sub>1</sub> and GAL<sub>2</sub> receptors, in particular, are found in many regions of the CNS as demonstrated with in situ hybridization, radioligand binding, and immunohistochemical studies (Jacobowitz et al., 2004) and have all high affinity for GAL. GAL<sub>1</sub> and GAL<sub>3</sub> receptors mainly activate inhibitory G proteins Gi/Go, while

\* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29080 Málaga, Spain.

E-mail address: [carmelomp@uma.es](mailto:carmelomp@uma.es) (C. Millón).



## RESEARCH ARTICLE

# A Role for Galanin N-Terminal Fragment (1–15) in Anxiety- and Depression-Related Behaviors in Rats

Carmelo Millón, MSc; Antonio Flores-Burgess, MSc; Manuel Narváez, MD/PhD; Dasiel O. Borroto-Escuela, PhD/MBA; Luis Santín, PhD; Concepción Parrado, MD/PhD; José Angel Narváez, MD/PhD; Kjell Fuxe, MD/PhD; Zaida Díaz-Cabiale, PhD

Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Medicina, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España (PhD Millón, Flores-Burgess, M Narváez, Parrado, JA Narváez, and Díaz-Cabiale); Department of Neuroscience, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden (PhD Borroto-Escuela and Fuxe); Universidad de Málaga, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Facultad de Psicología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España (PhD Santín).

Correspondence: Zaida Díaz-Cabiale, PhD, Associated Professor, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n. 29080 Málaga, Spain ([zaida@uma.es](mailto:zaida@uma.es)).

## Abstract

**Background:** Galanin (GAL) plays a role in mood regulation. In this study we analyzed the action of the active N-terminal fragment [GAL(1–15)] in anxiety- and depression-related behavioral tests in rats.

**Methods:** The effect of GAL(1–15) was analyzed in the forced swimming test, tail suspension test, open field test, and light/dark test. The proximity of GAL<sub>1</sub> and GAL<sub>2</sub> receptors was examined with the proximity ligation assay (PLA). We tested the GAL receptors involved in GAL(1–15) effects with the GAL<sub>2</sub> receptor antagonist M871 and with an *in vivo* model of siRNA GAL<sub>2</sub> receptor knockdown or siRNA GAL<sub>1</sub> receptor knockdown rats. The effects of GAL(1–15) were also studied in the cell line RN33B.

**Results:** GAL(1–15) induced strong depression-like and anxiogenic-like effects in all the tests. These effects were stronger than the ones induced by GAL. The involvement of the GAL<sub>2</sub> receptor was demonstrated with M871 and with the siRNA GAL<sub>2</sub> receptor knockdown rats. The PLA indicated the possible existence of GAL<sub>1</sub> and GAL<sub>2</sub> heteroreceptor complexes in the dorsal hippocampus and especially in the dorsal raphe nucleus. In the siRNA GAL<sub>1</sub> receptor knockdown rats the behavioral actions of GAL(1–15) disappeared, and in the siRNA GAL<sub>2</sub> receptor knockdown rats the reductions of the behavioral actions of GAL(1–15) was linked to a disappearance of PLA. In the cell line RN33B, GAL(1–15) decreased 5-HT immunoreactivity more strongly than GAL.

**Conclusions:** Our results indicate that GAL(1–15) exerts strong depression-related and anxiogenic-like effects and may give the basis for the development of drugs targeting GAL<sub>1</sub> and GAL<sub>2</sub> heteroreceptor complexes in the raphe-limbic system for the treatment of depression and anxiety.

**Keywords:** anxiety, depression, galanin

## Introduction

Mood disorders, including depression and anxiety, are among the most prevalent mental illnesses, with high socioeconomic impacts (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 the underlying

Received: April 21, 2014; Revised: September 30, 2014; Accepted: September 30, 2014

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of CINP.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



## Chapter 9

### Small Interference RNA Knockdown Rats in Behavioral Functions: GALR1/GALR2 Heteroreceptor in Anxiety and Depression-Like Behavior

Antonio Flores-Burgess, Carmelo Millón, Belén Gago, José Angel Narváez, Kjell Fuxe, and Zaida Díaz-Cabiale

#### Abstract

The gene silencing by RNA interference (RNAi) represents a new approach for inhibition of gene expression in cell culture and in vivo and it is a potential clinical tool for the treatment of illnesses, including neuropsychiatric disorders. In this chapter, we described an animal model using this technology to study the role of Galanin (1–15) [GAL(1–15)] through GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes in anxiety and depression-like behavior. We have generated siRNA GALR1 and siRNA GALR2 rats to analyze the involvement of GALR1-GALR2 heteroreceptor complexes in the behavioral effects induced by GAL(1–15). In this chapter, we provide a protocol for using these animal models to investigate the role of heterodimers in vivo when a behavioral test is needed.

Key words siRNA, Galanin (1–15), GALR1-GAL2 heteroreceptor

#### 1 Introduction

##### 1.1 Small Interference RNA Technology

The gene silencing by RNA interference (RNAi) represents a new approach for inhibition of gene expression in cell culture and in vivo. The RNAi gene silencing strategy is a process by which a specific mRNA is targeted for degradation as a means of inhibiting the synthesis of the encoded protein. The RNAi response is activated by the presence of double-stranded RNA (dsRNA) in cells. The dsRNA is degraded into short double-stranded fragments known as small Interference RNA (siRNA). The siRNA generated enters the RNA-induced silencing complex (RISC), which becomes activated upon guide (antisense) strand selection. The incorporated strand acts as a guide for the activated RISC complex to selectively degrade the complementary mRNA [1, 2] (Fig. 1).

Antonio Flores-Burgess and Carmelo Millón contributed equally to the manuscript.

Kjell Fuxe and Dasiel O. Borroto-Escuela (eds.), *Receptor-Receptor Interactions in the Central Nervous System*, Neuromethods, vol. 140, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8576-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8576-0_9), © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
23 de agosto de 2018 (23.08.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
WO 2018/150073 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A61K 38/10 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)  
A61K 31/135 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070121

(22) Fecha de presentación internacional:

20 de febrero de 2018 (20.02.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201730214 20 de febrero de 2017 (20.02.2017) ES

(71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE MÁLAGA [ES/ES];  
Avenida Cervantes, N°2, 29071 Málaga (ES).

(72) Inventores: FLORES BURGESS, Antonio; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edificio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES). MILLÓN PEÑUELA, Carmelo; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edificio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES). GAGO CALDERÓN, Belén; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edificio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES). NARVÁEZ PELÁEZ, Manuel Alejandro; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edificio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES). NARVÁEZ BUENO, José Ángel; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edificio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES). SANTÍN NÚÑEZ, Luis Javier; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edificio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES). DÍAZ CABIALE, Zaida; Avda. Severo Ochoa, N°4, Edi-

ficio Institutos Universitarios de Investigación, Parque Tecnológico de Andalucía, Campanillas, 29590 Málaga (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SELECTIVE SEROTONIN AND GALANIN (1-15) REUPTAKE INHIBITORS

(54) Título: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA RECAPTACIÓN DE LA SEROTONINA Y GALANINA (1-15)

(57) Abstract: Pharmaceutical composition comprising selective serotonin and galanin (1-15) reuptake inhibitors. The present invention relates to the use of galanin (1-15) or a pharmaceutically acceptable salt thereof for use in combination with a selective serotonin reuptake inhibitor or any other compound that significantly increases the synthesis of postsynaptic 5-HT1A receptors in terminal areas. In particular, the present invention concerns the use of galanin (1-15) or a pharmaceutically acceptable salt thereof useful for increasing and/or providing a faster onset of the therapeutic effect of a selective serotonin reuptake inhibitor or any other compound that significantly increases the synthesis of postsynaptic 5-HT1A receptors in terminal areas.

(57) Resumen: Composición farmacéutica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y galanina (1-15). La presente invención se refiere al uso de galanina (1-15) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para ser utilizado en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales. En particular, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo útil para aumentar y/o proporcionar un inicio más rápido del efecto terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales.

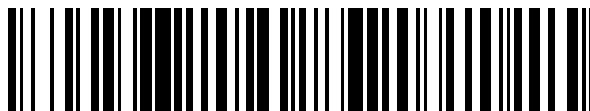


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 092**

21 Número de solicitud: 201730214

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 25/24** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**20.02.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**13.03.2018**

Fecha de concesión:

**22.06.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**29.06.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.0%)  
C/ Cervantes, N° 2  
29071 Málaga (Málaga) ES**

72 Inventor/es:

**FLORES BURGESS, Antonio;  
MILLÓN PEÑUELA, Carmelo ;  
GAGO CALDERÓN, Belén;  
NARVÁEZ PELÁEZ, Manuel Alejandro;  
NARVÁEZ BUENO, José Ángel;  
SANTÍN NÚÑEZ, Luis Javier y  
DÍAZ CABIALE, Zaida**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y galanina (1-15)**

57 Resumen:

Composición farmacéutica que comprende inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina y galanina (1-15). La presente invención se refiere al uso de galanina (1-15) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para ser utilizado en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que provoque un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales. En particular, la presente invención se refiere al uso de GAL(1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo útil para aumentar y/o proporcionar un inicio más rápido del efecto terapéutico de un inhibidor de la recaptación de serotonina o cualquier otro compuesto que un aumento significativo de la síntesis de receptores 5HT1A postsinápticos en áreas terminales.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



ES 2 659 092 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

