



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Regulación alostérica en el heteroreceptor oxitocina-cannabinoide CB1: Una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de trastornos de ansiedad.

Trabajo de Titulación, modalidad de proyecto de investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Cristian Omar Carvajal Tapia
Tutor: Dr. Wilber Romero Fernández, PhD.

Ambato-Ecuador
Abril-2017

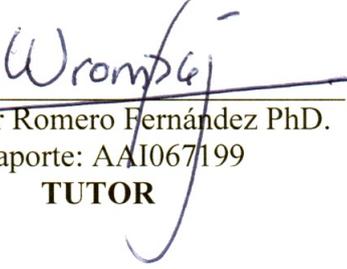
APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Wilber Romero Fernández PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido minuciosamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación. El mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 15 de febrero del 2017.


Dr. Wilber Romero Fernández PhD.
Pasaporte: AAI067199
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Cristian Omar Carvajal Tapia manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Cristian Omar Carvajal Tapia

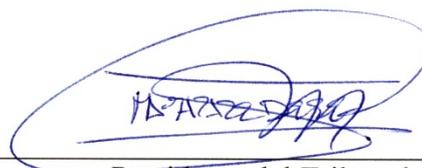
C.I. 050263141-9

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado en conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dra. Yenddy Nayghit Carrero Castillo, PhD.

C.I. 175740457-7



Dra. Marisel De Lucca Osorio, PhD.

C.I. 175781830-5

Ambato, 16 de marzo de 2017.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Cristian Omar Carvajal Tapia

C.I. 050263141-9

AUTOR

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Doctor Wilber Romero Fernández, por su ayuda en el desarrollo de esta investigación, por su valiosa e inigualable amistad y por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación en el grupo.

De igual forma al Dr. Dasiel Borroto Escuela por ceder los plásmidos para el desarrollo de esta investigación, a la Dra. Soledad por su amistad, los conocimientos y los filtros compartidos. Asimismo, agradecer al “viejo Isra”, por su invaluable ayuda con los experimentos y por las largas horas tratando de sacar las mejores fotografías en el microscopio de fluorescencia para la tesis. A “mijo Tayo” por meterle ese positivismo característico y el trapito rojo a todos los experimentos para obtener los resultados esperados. A David por su amistad a lo largo de toda la carrera y su colaboración con los filtros de esterilización de la Doc. Sole. De igual manera y no menos importante a las licen Eli, Belén y Vane por brindarme todo su apoyo y aprecio desde el primer día que llegue al laboratorio y al licen Cris por prestarme la cámara de flujo para realizar los cultivos bacterianos.

Del mismo modo, dar las gracias a todos quienes conforman Grupo de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica de la Universidad Técnica de Ambato por todos los gratos momentos compartidos y todo su apoyo para poder concluir esta investigación.

Igualmente quiero agradecer a uno de mis mejores amigos Tarsis porque más que un amigo hoy te considero un hermano. Y como olvidarme de mis amigos de la U, Angie, Pao, Joha, Marcelo, Edison, Jonathan, gracias a todos ustedes por su amistad creo que al fin lo logré.

SIN TODOS USTEDES ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN NO HUBIERA SIDO POSIBLE.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA	I
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	IV
DERECHOS DE AUTOR.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
CAPITULO I	
1.1 TEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	5
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
CAPITULO II	
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
2.2 HIPÓTESIS.....	12
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	13
CAPITULO III	
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1.1 SECUENCIACIÓN PLASMÍDICA.....	14
3.1.2 TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI DH5 α	14
3.1.3 PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	15
3.1.4 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	16
3.1.5 CULTIVO CELULAR Y CRIOCONSERVACIÓN.....	16
3.1.6 TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS HeLa.....	16

3.1.7	ENSAYOS DE CO-LOCALIZACIÓN.....	17
3.1.8	ENSAYOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR.....	17
3.2	ESTADÍSTICA Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	18
CAPITULO IV		
4.1	RESULTADOS	19
4.1.1	OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO PARA LA TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HELa.....	19
4.1.2	EXPRESIÓN TRANSCIENTE DE OxTR-GFP Y CB1R-YFP EN CÉLULAS HELa.....	23
4.1.3	CO-LOCALIZACIÓN DE OxTR Y CB1R.....	24
4.1.4	ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR.....	25
4.2	DISCUSIÓN.....	27
4.3	VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	29
CAPITULO V		
5.1	CONCLUSIONES.....	30
5.2	RECOMENDACIONES.....	30
REFERENCIAS		31
ANEXOS		35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un receptor de siete hélices de transmembrana acoplado proteína G.....	7
Figura 2. Actualización de los conocimientos sobre la señalización a través de los receptores de membrana acoplados a proteínas G.....	8
Figura 3. Cascada de señalización celular del neuropéptido oxitocina.....	10
Figura 4. Cascada de señalización retrograda del cannabinoide.....	11
Figura 5. Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α con los ADN plasmídico....	19
Figura 6. Cuantificación y calidad del ADN plasmídico.....	20
Figura 7. Electroforesis de ADN plasmídico en gel de agarosa.....	21
Figura 8. Secuencia de ADN correspondiente al plásmido pcMV6-OxTR-GFP..	22
Figura 9. Secuencia de ADN correspondiente al plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP.....	22
Figura 10. Expresión de receptores marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.....	23
Figura 11. Expresión de receptores marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.....	24
Figura 12. Co-localización de los receptores de oxitocina y los receptores de cannabinoide CB1 en la membrana citoplasmática de células HeLa.....	25
Figura 13. Tratamiento con un agonista específico del receptor cannabinoide CB1 promueve la internalización del receptor de oxitocina.....	26
Figura 14. Tratamiento con un agonista específico del receptor cannabinoide CB1 no promueve la internalización del receptor de oxitocina en células HeLa que expresan solo el receptor de oxitocina.....	26
Figura 15. Co-transfección de OxTR-GFP y CB1R en células HeLa no afecta la expresión de receptor de oxitocina en la membrana celular.....	27

RESUMEN

Los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) son capaces de establecer interacciones entre dos o más receptores, de igual forma, se ha descrito que puede existir regulación alostérica en estas interacciones receptor-receptor. Por todo ello, la formación de estas complejas estructuras y la regulación entre los protómeros involucrados en la interacción proteína-proteína representan blancos terapéuticos para el tratamiento de ansiedad, miedo y depresión.

Las células HeLa que expresan de forma transciente los receptores de oxitocina (OxTR) y cannabinoide CB1 (CB1R) son un buen modelo para el estudio de las interacciones proteína-proteína. Los resultados obtenidos indican que estos receptores co-localizan en áreas determinadas de la membrana celular, lo que podría sugerir la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R. Adicionalmente, la administración de anandamida, un agonista específico de CB1R, induce la internalización de OxTR, lo que daría indicios que existe una regulación alostérica positiva entre OxTR y CB1R. Los datos obtenidos representan las primeras evidencias de la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R y de la naturaleza de la regulación alostérica que tiene lugar en esta compleja estructura.

Por lo tanto, este heterómero podría constituir una diana para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de trastornos de ansiedad.

Palabras clave: Oxitocina, Cannabinoide, Receptor de oxitocina, Receptor de cannabinoide CB1, Interacción receptor-receptor, Heteroreceptor, Regulación alostérica, Ansiedad.

ABSTRACT

G-protein coupled membrane receptors (GPCRs) can establish interactions between two or more receptors. It has been described that allosteric regulation may exist in these receptor-receptor interactions. Therefore, the formation of these complex structures and the regulation among the protomers involved in the protein-protein interaction represent therapeutic targets for anxiety, fear, and depression treatments.

HeLa cells that transiently express oxytocin (OxTR) and cannabinoid CB1R (CB1R) receptors are a worthy study model of protein-protein interactions. The results indicate that these receptors co-localize in specific areas of the cell membrane, which could suggest the formation of the OxTR / CB1R heteroreceptor. In addition, the administration of anandamide, a specific CB1R agonist, induces the internalization of OxTR, which would indicate a positive allosteric regulation between OxTR and CB1R. The data obtained represent the first evidence of the OxTR / CB1R heteroreceptor formation and the nature of the allosteric regulation that takes place in this complex structure.

Therefore, this heteromer could establish a target for the design of new drugs for the treatment of anxiety disorders.

Key words: Oxytocin, Cannabinoid, Oxytocin receptor, CB1 cannabinoid receptor, Receptor-receptor interaction, Heteroreceptor, Allosteric regulation, Anxiety.

INTRODUCCIÓN

Se estima que aproximadamente 15% de la población mundial ha padecido durante su vida algún episodio de ansiedad o depresión, por lo tanto, estas patologías representan un serio problema de salud pública, por este motivo la Organización Mundial de la Salud plantea que la ansiedad y la depresión se corresponden con las principales enfermedades mentales. Dada las escasas opciones terapéuticas y el éxito fallido de muchos de los tratamientos establecidos, es necesario proponer nuevas estrategias terapéuticas.

La oxitocina es un neuropéptido hipotalámico que desempeña un papel crítico en el comportamiento social y tiene un papel ansiolítico en humanos (Blume et al., 2008; I. D. Neumann, 2008). Sin embargo, el mecanismo y la función ansiolítica regulada por la oxitocina es en gran parte desconocida. Además de la oxitocina, se ha descrito el sistema cannabinoide está estrechamente asociado a la modulación de la ansiedad (Rey, Purrio, Viveros, & Lutz, 2012).

La oxitocina y los cannabinoides realizan su señalización celular a través de los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs). Un nuevo enfoque acerca de los GPCRs muestra que estos son capaces de formar homodímeros, heterodímeros y mosaicos de interacciones (interacción entre más de dos receptores) en las superficies celulares (Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014). Si la formación de estas complejas estructuras cambia la visión de la transducción de señal a través de los GPCRs, el hecho que de ocurra una regulación alostérica entre los receptores implicados incrementa la complejidad de esta realidad. Estos conocimientos actualizados han llevado tanto a los homodímeros, heterodímeros y los mosaicos de interacciones como a la regulación alostérica de las interacciones receptor-receptor a convertirse en importantes blancos en el diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades (Fuxe, O. Borroto-Escuela, et al., 2012).

Se conoce que los receptores de oxitocina (OxTR) y los receptores de cannabinoide (CB1R) se encuentran co-expresados en regiones del cerebro involucradas en la fisiología y fisiopatología de la ansiedad (Jimenez, Young, Triana-

Del Rio, LaPrairie, & Gonzalez-Mariscal, 2015; Katona et al., 2001). También, se ha descrito que el OxTR es capaz de formar un heterómero con el receptor de dopamina D2 y que la activación del OxTR incrementa la señalización dopaminérgica (Romero-Fernandez, Borroto-Escuela, Agnati, & Fuxe, 2013). Adicionalmente, resulta interesante que el sistema cannabinoide es capaz de transactivar la señalización de la oxitocina (Verty, McFarlane, McGregor, & Mallet, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se descrito una interacción física entre estos receptores.

Dado que el papel ansiolítico regulado por la oxitocina resulta complejo y que podría involucrar la interacción con otros sistemas, este trabajo se ha enfocado en estudiar la formación del heterómero OxTR/CB1R. También, se pretende describir la naturaleza de la regulación alostérica de esta interacción receptor-receptor. Sin duda, los resultados que se obtengan serán un avance para establecer a los heteroreceptores como dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mentales.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 TEMA DE LA INVESTIGACIÓN

Regulación alostérica en el heteroreceptor oxitocina-cannabinoide CB1: Una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de trastornos de ansiedad.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El estilo de vida que ha adoptado la sociedad actual ha incrementado los problemas laborales y económicos, conflictos de pareja, enfermedades crónicas, abuso de sustancias entre otras, ha generado una alta tasa de incidencia de trastornos de ansiedad. Se estima que alrededor del 15% de la población mundial ha experimentado algún episodio de ansiedad durante su vida, por lo tanto, se ha convertido en un serio problema de salud pública.

La ansiedad adaptativa o no patológica es una respuesta fisiológica ante un estímulo agudo el cual se reconoce como dañino y que puede comprometer la integridad del individuo. Cuando este estímulo supera cierto umbral o se afectan los mecanismos fisiológicos de la respuesta adaptativa dirigidos a evitar los efectos nocivos de la información sensorial, la ansiedad se convierte en patológica (Viveros, Marco, & File, 2005). Se conoce que la amígdala, el hipotálamo y el núcleo accumbens son regiones del cerebro estrechamente relacionadas con la respuesta fisiológica y fisiopatológica de la ansiedad (E. I. Martin, Ressler, Binder, & Nemeroff, 2010). En la respuesta fisiológica a la ansiedad se conoce que la información que proviene del medio ambiente se transmite a la amígdala lateral y baso lateral, luego llega al núcleo de accumbens y al núcleo amigdalino central medial, que son las regiones encargadas de generar respuestas hormonales y autonómicas en función del estímulo sensorial.

Diversos estudios establecen que la señalización a través del neuropéptido oxitocina y de cannabinoide están involucradas en la regulación de la ansiedad (M. Martin, Ledent, Parmentier, Maldonado, & Valverde, 2002; Inga D. Neumann, 2008).

De igual manera, se ha planteado que la respuesta celular a la ansiedad no patológica podría implicar la interacción de varios sistemas. De hecho, varios autores han expuesto que el papel ansiolítico mediado por la oxitocina podría implicar la interacción con los sistemas de neurotransmisión de dopamina (Romero-Fernandez et al., 2013), serotonina o cannabinoide (Baskerville & Douglas, 2010). En este sentido, algunos autores han informado que la activación de la señalización cannabinoide incrementa la síntesis de oxitocina y regula la ingesta de agua y alimentos, lo que podría sugerir que existe una transactivación entre estos sistemas de neurotransmisión (Verty et al., 2004). Por otra parte, Schechter y colaboradores demostraron que la reducción de CB1R en el hipocampo altera los niveles de expresión de OxTR. No obstante, hasta la fecha no se describió la formación de un heterómero entre OxTR y CB1R (Schechter et al., 2013).

El OxTR y CB1R pertenecen a la familia A de los GPCRs, los cuales son receptores de siete hélices transmembrana implicados en la transducción de señal (Fuxe et al., 2007). Estos receptores de membrana son activados por ligandos específicos que generalmente promueven la activación de las proteínas heterotriméricas G, las cuales una vez activas, inician una vía de señalización caracterizada por la interacción en cascada de diversos efectores intracelulares que concluye produciendo una respuesta celular.

Los trabajos pioneros de Fuxe y colaboradores revelaron que los GPCRs se pueden encontrar en las membranas celulares en forma de monómeros, dímeros (homodímeros y heterodímeros) o mosaicos de interacciones (interacción de más de dos receptores). Se ha señalado que la existencia de homodímeros y heterodímeros y de regulación alostérica en las interacciones receptor-receptor modifica significativamente el reconocimiento, el tráfico y la señalización de los GPCRs. Para comprender esta nueva visión de la comunicación celular a través de los GPCRs es necesario generar nuevos conocimientos sobre la implicación fisiológica de las interacciones físicas receptor-receptor y de la regulación alostérica que tiene lugar en los heterómeros. Esta investigación pretende establecer los heterómeros y su regulación alostérica como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

Si tenemos en cuenta lo expuesto anteriormente y que: i) los OxTR y CB1R se co-expresan en áreas del cerebro que modulan el miedo y la ansiedad (Jimenez et al., 2015; Katona et al., 2001) ii) la activación de los CB1R modula los niveles de oxitocina iii) y que la formación de heterómeros y de regulación alostérica de la interacción proteína-proteína podría ser diana terapéutica para el tratamiento de patologías neuropsiquiátricas, sería interesante conocer:

¿Es posible que el OxTR formen un heterómero con el CB1R?

¿Es posible que el papel ansiolítico y antidepresivo mediado por la oxitocina en parte se deba a la modulación alostérica que tiene lugar en el heteroreceptor del OxTR/CB1R?

¿Es posible emplear la modulación alostérica que podría ocurrir en el heterodímero de los OxTR/CB1R como blanco terapéutico en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de los trastornos de ansiedad?

Por lo antes expuesto, este trabajo propone el estudio de la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R y la regulación alostérica que tiene lugar en dicha interacción.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Describir la formación de un heteroreceptor oxitocina-cannabinoide CB1, y establecer la naturaleza de la regulación alostérica en la interacción receptor-receptor.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.2.1 Evaluar la correcta expresión de los receptores de oxitocina y cannabinoide CB1 en células HeLa.

1.3.2.2 Determinar *in vitro* la formación del heterómero entre el OxTR y el CB1R en células HeLa.

1.3.2.3 Describir la naturaleza de la modulación alostérica de la interacción receptor-receptor que tiene lugar en el heteroreceptor OxTR/CB1R.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTE DE LA INVESTIGACIÓN

Los GPCRs también llamados receptores de siete dominios de transmembrana forman el mayor grupo de receptores de membrana implicados en la transducción de señal (**Figura 1**). Hasta la fecha, en el genoma humano se han identificado más de 1000 secuencias que codifican para estos receptores, lo que evidencia la importancia fisiológica de estas proteínas en la comunicación celular. La diversidad química de ligandos endógenos que se unen y activan a estos receptores es notable, entre ellos podemos encontrar feromonas, hormonas, lípidos, péptidos, aminas biógenas, nucleótidos e iones. Además, estímulos exógenos, tales como, la luz, el olor y el sabor también son mediados por estos GPCRs. De esta forma, regulan un sin número de procesos fisiológicos, tales como: el crecimiento, la secreción, el metabolismo y la diferenciación celular, respuestas inflamatorias e inmunes, la visión, y la neurotransmisión.

Dada su participación en diversos procesos fisiológicos, no es sorprendente que estén involucrados en muchos procesos fisiopatológicos. La presencia de estos GPCRs en las superficies celulares hace que estos receptores sean muy accesibles a agentes terapéuticos, por lo que se consideran dianas relevantes para el desarrollo de fármacos. Por lo tanto, comprender el funcionamiento de los mecanismos de señalización celular de los GPCRs contribuirá notablemente al avance de la biomedicina y el desarrollo de fármacos para el tratamiento de múltiples patologías.

El conocimiento de la transducción de señal a través de los GPCRs ha cambiado notablemente en las últimas décadas. Los relevantes y pioneros hallazgos científicos de Fuxe y colaboradores en la década de los 80 sugirieron que estos receptores no solo se pueden encontrar en las superficies celulares en forma de monómeros, sino que también son capaces de formar dímeros (homodímeros y heterodímeros). Más tarde, entre los años 1998-1999 se demostró que los receptores

GABAB1 y GABAB2 se podían ensamblar en forma de heterodímeros de señalización en la superficie celular (Marshall, Jones, Kaupmann, & Bettler, 1999).

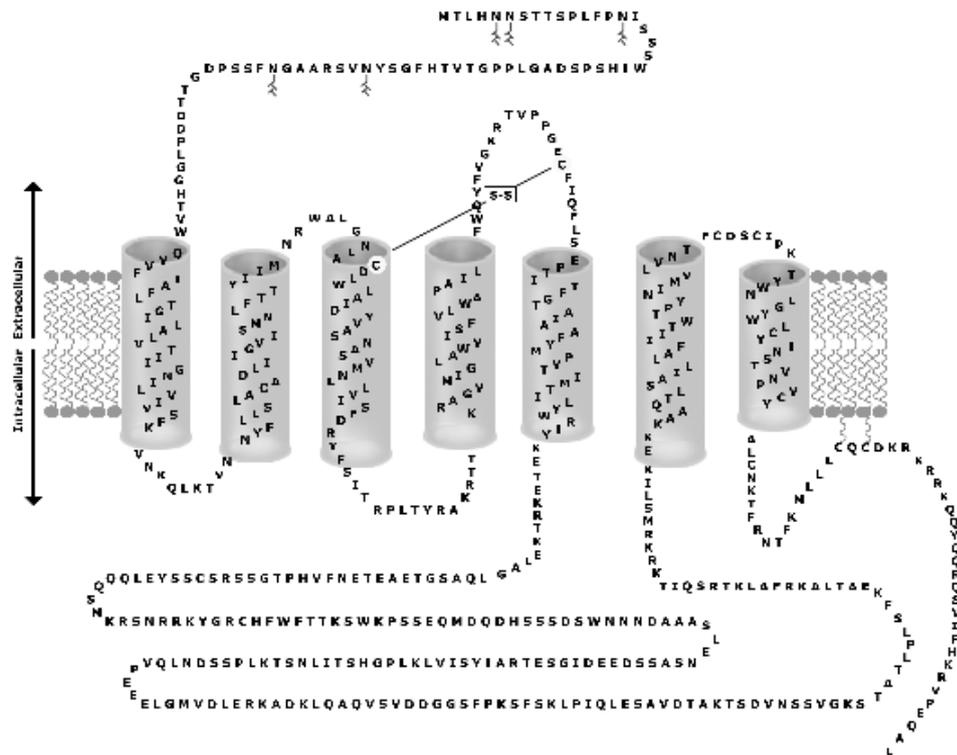


Figura 1. Representación esquemática de un receptor de siete hélices transmembrana acoplado a proteína G. La figura representa la estructura y secuencia de aminoácidos del receptor muscarínico M3 humano, adaptada de Borroto-Escuela y colaboradores (Borroto-Escuela, Correia, et al., 2011). La arquitectura estructural de los GPCRs es altamente específica y se caracteriza por estar formada por α -hélices que atraviesan la membrana siete veces y que están conectadas a través de bucles intracelulares y extracelulares. Cuando se pliegan correctamente, los dominios extracelular e intracelular forman sitios activos muy específicos para la unión de ligandos y de las proteínas G, respectivamente. La orientación de los extremos N-terminal y C-terminal también se conserva en todos los GPCRs, el extremo N-terminal se expone al medio extracelular y el extremo C-terminal se encuentra en el citosol de la célula. Los puentes disulfuro pueden formar el dominio extracelular y son claves para conservar la estructura-función de la proteína. De igual forma, son capaces de señalar a través de chaperones y proteínas andamio (vía independiente a las proteínas G). La mayoría de los GPCRs pertenecen a la familia A de los GPCRs en la cual encontramos los receptores aminérgicos (serotonina, muscarínico, dopamina, histamina, adrenérgico), receptores peptídicos (oxitocina, vasopresina, colecistocina), receptor de rodopsina, entre otros. La homología de secuencia entre los receptores de la familia A es baja, sin embargo, se caracterizan por la presencia de dominios altamente conservados, importantes en la estructura y función de los receptores. Entre estos dominios encontramos el DRY(Asp-Arg-Tyr), que forma parte de la transmembrana citoplasmática III y está implicado en la activación de la proteína G (Probst, Snyder, Schuster, Brosius, & Sealfon, 1992) y el dominio NPxxY, localizado en la parte citoplasmática de la transmembrana VII e involucrado en la

conformación del receptor que garantiza una correcta señalización celular y formación de complejos multiproteicos intracelulares (Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2011).

En la última década, con el avance de técnicas de estudio de las proteínas empleando principios de transferencia de fluorescencia (Fluorescence resonance energy transfer) o bioluminiscencia (Bioluminescence resonance energy transfer) se corroboró la formación de heterómeros entre los miembros de la familia A de los GPCRs. Otras técnicas avanzadas han permitido demostrar que los GPCRs también pueden formar oligómeros (más de dos receptores de membrana). En este sentido, algunos autores han descrito la formación de mosaicos de interacciones para mGluR5-A_{2A}R-D₂R (Cabello et al., 2009) y CB1R-D₂R-A_{2A}R (Navarro et al., 2008)(Figura 2).

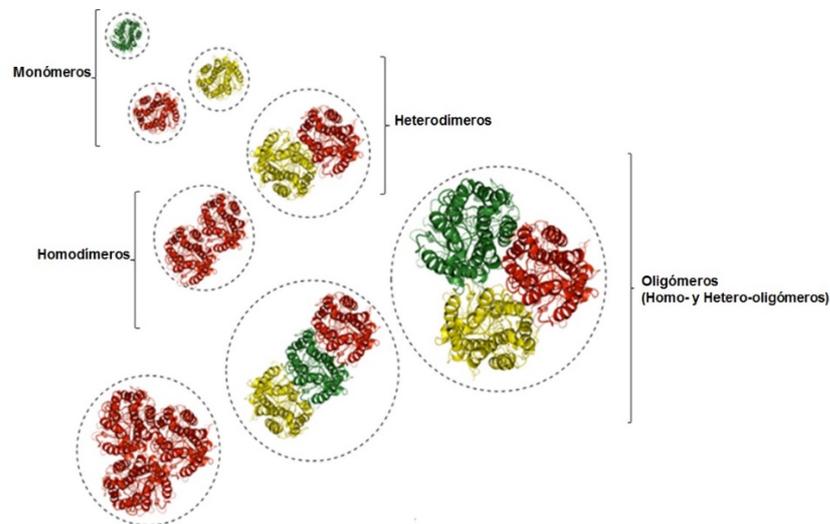


Figura 2. Receptores de membrana acoplados a proteínas G, formación de monómeros, homodímeros, heterodímeros y oligómeros. La transducción de señal a través de los GPCRs es más compleja de lo que se pensó en un inicio, estudios recientes han demostrado que estos receptores se pueden expresar en las membranas celulares de diferente forma. Figura adaptada de Fuxe y colaboradores (Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014).

Se ha destacado que la existencia de heterómeros y de regulación alostérica en las interacciones receptor-receptor que tiene lugar en estas complejas estructuras incrementa significativamente la diversidad de reconocimiento, el tráfico y la señalización de los GPCRs (Fuxe, Borroto-Escuela, et al., 2012; Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014). Así mismo, estudios recientes muestran que la formación de dímeros tiene lugar desde la síntesis de los GPCRs en el retículo

endoplasmático, que podrían tener un papel crítico en el tráfico de los GPCRs hacia la superficie celular (Van Craenenbroeck et al., 2011).

Extensa literatura científica relaciona alteraciones específicas en las interacciones receptor-receptor con mecanismos moleculares que conducen a trastornos neuropsiquiátricos (Fuxe, Borroto-Escuela, et al., 2012). Por ello, estudios dirigidos a comprender la función fisiológica de la interacción física receptor-receptor y de la regulación alostérica que regula la señalización de los protómeros que forman parte de un heteroreceptor será clave para el desarrollo de nuevas drogas en el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas.

Uno de los principales problemas que aquejan a la población mundial es el aumento de trastornos mentales y adicciones. La ansiedad cuando se convierte en patológica se caracteriza por síntomas físicos, sociales y conductuales que afectan la calidad de vida de los individuos que la padecen (Viveros et al., 2005). La amígdala, el hipotálamo, el núcleo rafe y el núcleo accumbens son regiones del cerebro estrechamente relacionadas con la respuesta fisiológica y fisiopatológica de la ansiedad, desempeñando un papel clave en el procesamiento de la información sensorial que proviene del tálamo y la corteza cerebral. Dicha información se envía al núcleo accumbens y al núcleo amigdalino centro medial donde se generan una serie de respuestas hormonales y autonómicas dirigidas a dar respuesta al estímulo sensorial (Ehrlich et al., 2009; LeDoux, 2000; Majidi, Kosari-Nasab, & Salari, 2016; Paz & Pare, 2013).

Evidencias experimentales han demostrado que el neuropéptido oxitocina juega un papel crítico en el comportamiento social y en la respuesta de ansiedad adaptativa tanto en seres humanos como animales (I. D. Neumann, 2008). Este neuropéptido se une a su receptor y a través de la proteína Gq/11, activa la cascada de señalización celular de inositol trifosfato (IP3) y 1,2 diacilglicerol (1,2-DAG) (Van Soest, Lodder, & Kits, 2000; Vrachnis, Malamas, Sifakis, Deligeoroglou, & Iliodromiti, 2011) (**Figura 3**). En las últimas décadas, varios estudios han mostrado que la administración de oxitocina reduce la actividad de la amígdala y tiene un efecto positivo tanto en pacientes que padecen estrés postraumático (Koch et al., 2015), como

en pacientes esquizofrénicos (Sobota, Mihara, Forrest, Featherstone, & Siegel, 2015). Igualmente, se ha observado un efecto ansiolítico (Laszlo et al., 2016; Ring et al., 2006) y una disminución del estrés inducido por corticosterona en ratones (Windle, Shanks, Lightman, & Ingram, 1997). Por otra parte, ratones knock-out para OxTR expuestos a factores estresantes muestran un comportamiento similar a la ansiedad y se observa un incremento en los niveles de corticosterona (Amico, Mantella, Vollmer, & Li, 2004).

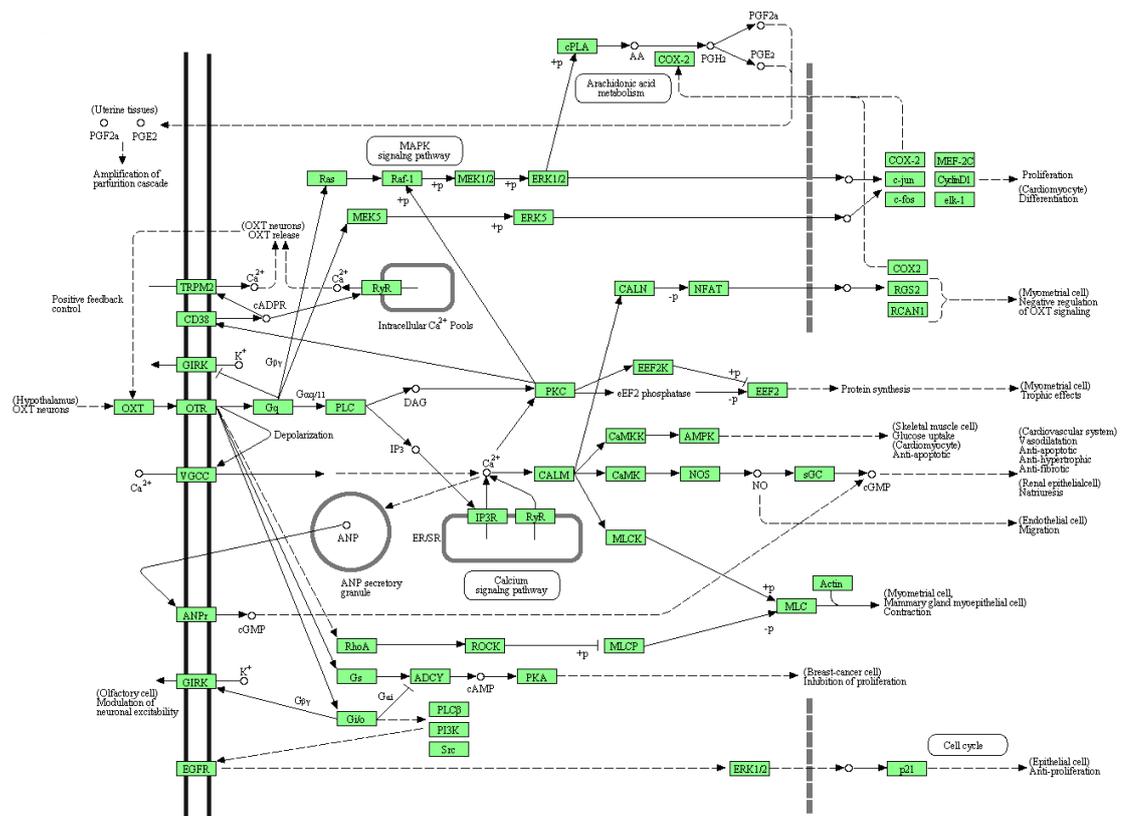


Figura 3. Cascada de señalización celular del neuropéptido oxitocina. La oxitocina se une a su receptor y este activa proteínas $G_{q/11}$, activando la fosfolipasa C, la cual genera segundos mensajeros intracelulares como el IP₃ y 1,2-DAG encargados de la transducción de señal.

Resulta interesante que un incremento en la expresión de los OxTR en la amígdala de animales de experimentación reduce la ansiedad (Bosch OJ, 2006). Se ha descrito que los efectos ansiolíticos de oxitocina involucra la activación de la cascada de señalización de Raf, MAPK y ERK1/2 (Blume et al., 2008; Jurek et al., 2012) y la participación de neuronas GABA dentro del núcleo central de la amígdala que disminuyen la actividad ansiogénica (Huber, Veinante, & Stoop, 2005) (Figura 3). Sin duda, el efecto ansiolítico mediado por oxitocina resulta complejo y podría involucrar

la interacción con otros sistemas de neurotransmisores, tales como, el de dopamina, serotonina y cannabinoide.

Se ha descrito que el sistema cannabinoide, en especial el CB1R, juega un importante papel en la etiología y tratamiento de enfermedades mentales (Manzanares, Urigüen, Rubio, & Palomo, 2004) este receptor se encuentra en mayor concentración en el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Viveros et al., 2005). La vía de señalización del CB1R esta mediada por la activación de las proteínas Gi/o que señalizan a través de la vía de la adenilato ciclasa (**Figura 4**).

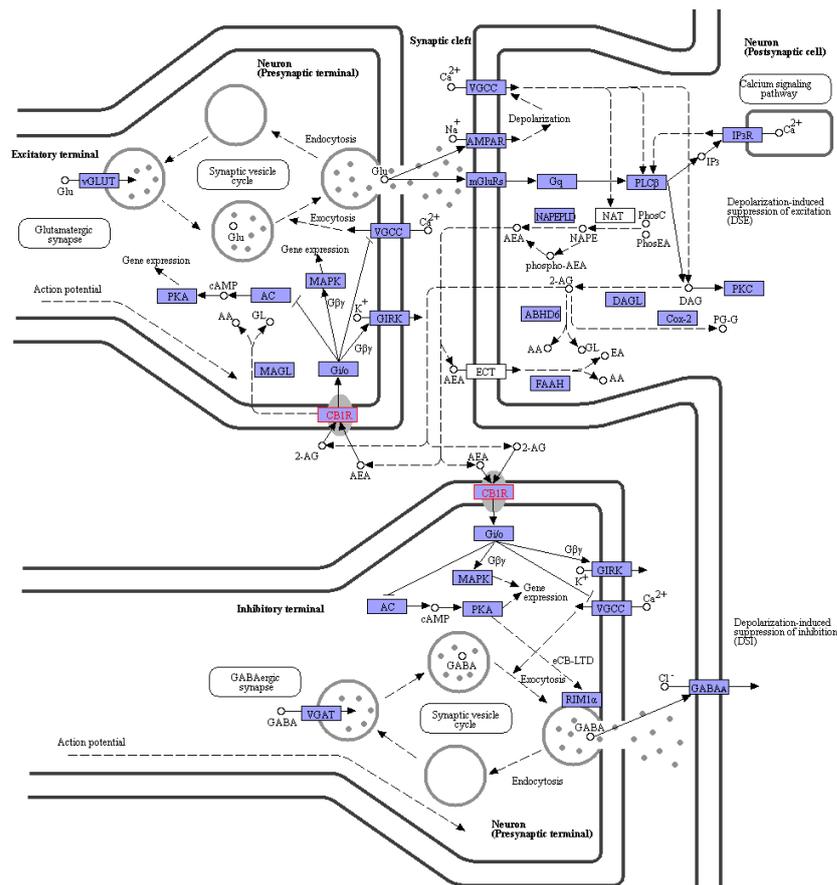


Figura 4. Cascada de señalización retrograda del cannabinoide. Los endocannabinoides funcionan como mensajeros retrógrados en las sinapsis en varias regiones del cerebro. La familia de endocannabinoides incluye al menos cinco derivados de ácido araquidónico. Hasta la fecha los dos mejor caracterizados son araquidonoil etanolamida (anandamida, AEA) y 2-araquidonoil glicerol (2AG). Estos endocannabinoides se liberan en las neuronas postsinápticas producto de la despolarización postsináptica y/o por la activación de los receptores de cannabinoides. Los endocannabinoides liberados activan entonces los receptores CB1 en los terminales presinápticos y por la inhibición de canales de Ca^{2+} suprimen la liberación del transmisor inhibitorio GABA (la despolarización induce la supresión de inhibición, DSI) o el neurotransmisor excitador glutamato (la despolarización induce la supresión de la excitación, DSE). Mientras que DSI y DSE median la plasticidad sináptica a

corto plazo, los endocannabinoides interceden en los cambios sinápticos a largo plazo (eCB-LTD). Se ha descrito que la activación persistente de los receptores CB1 desencadenan eCB-LTD por un mecanismo dependiente de RIM1alfa.

Evidencias experimentales han demostrado que la inhibición de la degradación de endocannabinoides potencia la señalización de los CB1R lo que conduce a reducir comportamientos similares a la ansiedad. Por el contrario, la inhibición de estos receptores produce efectos ansiogénicos (Moreira & Wotjak, 2010).

Según lo antes descrito se plantea como hipótesis que el papel ansiolítico y antidepresivo mediado por la oxitocina puede deberse a la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R donde la activación del CB1R podría modular alostéricamente al OxTR incrementando su señalización celular lo cual podría contribuir a mejorar el papel ansiolítico mediado por la oxitocina dentro de regiones claves del cerebro involucradas en la regulación del miedo, la ansiedad y la depresión. De ser acertada dicha hipótesis, será posible proponer nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de los trastornos de ansiedad.

2.2 HIPÓTESIS

2.2.1 FORMACIÓN DEL HETERORECEPTOR OxTR/CB1R.

Hipótesis Nula:

No existe la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R.

Hipótesis Alternativa:

Existe la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R.

2.2.2 REGULACIÓN ALOSTÉRICA EN EL HETERORECEPTOR OxTR/CB1R.

Hipótesis Nula:

La activación del CB1R no regula alostéricamente al OxTR.

Hipótesis Alternativa:

La activación del CB1R regula alostéricamente al OxTR.

2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.

Formación del heteroreceptor OxTR/CB1R.

- Secuenciación plasmídica de OxTR y CB1R.
- Purificación de ADN plasmídico.
- Transfección de plásmidos en células HeLa.
- Expresión de los receptores en la membrana de células HeLa.
- Colocalización de los receptores in vitro en células HeLa.

Regulación alostérica en el heteroreceptor OxTR/CB1R.

- Ensayos de señalización celular.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 SECUENCIACIÓN PLASMÍDICA.

Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP fueron cedidos por el Dr. Dasiel Oscar Borroto-Escuela del Departamento de Neurociencia del Instituto Karolinska, Suecia. Para verificar que en el material de partida no se han producido inserciones, deleciones, sustituciones o corrimiento del marco de lectura, se determinaron las secuencias correspondientes a los receptores con el inserto fluorescente. La secuenciación se realizó a través de un servicio externo en la compañía Macrogen (Corea del Sur), quienes utilizaron un secuenciador “3730xl DNA Analyzer” y el cebador CMV-F (5’- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG -3’). Para la preparación de las muestras se siguió el protocolo recomendado por la empresa, se enviaron 50 µl de los plásmidos a una concentración de 100 ng/µl purificados a través del kit de purificación plasmídica (PureLink Quick plasmid miniprep kit, Invitrogen, USA). Los resultados de las secuenciaciones se compararon con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

3.1.2 TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS DE ESCHERICHIA COLI DH5α.

Células de *E. coli* DH5α fueron transformadas con los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP siguiendo el protocolo de la casa comercial (Invitrogen, USA). Específicamente, se mezclaron 50 µl de células competentes de *E. coli* DH5α y 1 µl de ADN plasmídico (10 ng) en Eppendorf de 2 ml y se incubó por 30 minutos en hielo. Para la internalización de los plásmidos se realizó un choque térmico a 42°C por 20 segundos sin agitación, seguido de una incubación de 2 minutos en hielo. Para la expresión del gen marcador de selección, se adicionó 250 µl de medio Luria Bertani (LB) (10 gr de NaCl, 10 gr de peptona bacteriológica y 5 gr de extracto de levadura) y se incubó en agitación (300 rpm) a 37°C por 1 hora. En placas Petri con agar LB y antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina, ambos a una

concentración de 100 µg/ml) se inoculó 200 µl del cultivo y se extendió sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

3.1.3 PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

Una colonia de *E. coli* DH5α transformada con el plásmido de interés se inoculó en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml del antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina) y se incubó por 6 horas en agitación (300 rpm) a 37°C. Al cabo de las 6 horas, se realizó una dilución 1:1000 del pre-cultivo en 250 ml de medio LB con 100 µg/ml del antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina) y se incubó toda la noche en agitación (300 rpm) a 37°C sin que la absorbancia del cultivo bacteriano a 600 nm alcance 0.6. El pellet resultante de una centrifugación a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos del cultivo bacteriano fue vigorosamente resuspendido en 5 ml de tampón de homogeneización (25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM glucosa, 1% lisozima, ARNasa 100 µg/ml) utilizando un vortex (Labnet, USA) y se incubó 30 minutos en hielo. Después se añadió 5 ml de tampón de lisis (0.2 M NaOH y 1% de SDS) y la mezcla se incubó por 5 minutos en hielo sin agitar. Para detener la hidrólisis promovida por la base, se agregó 5 ml de tampón de neutralización (3M NaC₂H₃O₂, pH=4.8) y se mezcló de forma suave e inmediatamente se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los plásmidos presentes en el sobrenadante fueron precipitados con isopropanol al 70% y centrifugados a 14.590 rpm por 1 hora a 4°C. El pellet que se obtuvo se lavó con 10 ml de etanol al 70% recién preparado y se centrifugó en las mismas condiciones. Una vez que se decantó el sobrenadante, los restos de etanol fueron eliminados por evaporación en una cámara extractora de gases. El pellet se resuspendió en 200 µl de buffer TE1X (10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 0.01 mM EDTA).

Para obtener un ADN plasmídico de mejor calidad se realizó una purificación a través de un kit comercial de purificación de ADN plasmídico (PureLink Quick plasmid miniprep kit) según las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA). Para evaluar la pureza y la cantidad de ADN plasmídico obtenido se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, USA).

3.1.4 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.

La calidad del ADN plasmídico purificado se comprobó mediante una electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa. Concretamente, 1 µl de ADN plasmídico (100 ng) fueron mezclados con 1 µl de buffer de carga 6x de ADN (Sigma Aldrich, USA) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% (p/v en tampón TAE1X) que contenía 0.01% (v/v) de SyberSafe. Como marcador de peso molecular se utilizó el patrón High Mass Leader de 1-10 Kb (Invitrogen, USA). La electroforesis se corrió a 80V por 40 minutos. Para observar las bandas correspondientes al ADN plasmídico se utilizó el sistema de imágenes ChemiDoc™MP (Bio-Rad, USA).

3.1.5 CULTIVO CELULAR Y CRIOCONSERVACIÓN.

Las células HeLa (ATCC®CCL-2™) fueron cedidas amablemente por la Dra. Mileidys Pérez Alea del Grupo de investigación de Modelos Animales y Cáncer de la Fundación Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España. Las células HeLa se cultivaron en placas de 6 pocillos y en frascas de 75 cm² en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda. Las células HeLa se crioconservaron en nitrógeno líquido en medio de criocongelación (90% FBS y 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO)), según las recomendaciones de la casa comercial (American Type Culture Collection, Manassas, USA).

3.1.6 TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS HELA.

Las células HeLa fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en las condiciones descritas anteriormente durante 24 horas antes de la transfección con el ADN plasmídico. Las células se transfectaron con los plásmidos OxTR-GFP y CB1R-YFP por el método de Lipofectamina™2000 según lo recomendado por la casa comercial (Invitrogen, USA).

Para las transfecciones simples se utilizó 1 µg total de ADN y para las transfecciones dobles se utilizó 2 µg totales de ADN (1 µg de cada uno de los vectores).

En todos los casos se utilizó una relación ADN/Lipofectamina™2000 de 1:2. Específicamente, se resuspendió 1-2 µg de ADN plasmídico y 2-4 µl de Lipofectamina™2000 en 50 µl de medio DMEM sin complementos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se mezclaron las dos soluciones y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Al cabo de este tiempo la mezcla se añadió a las células en crecimiento. Las células fueron cultivadas por 48 horas antes de comprobar la expresión de los receptores marcados con las proteínas fluorescentes.

3.1.7 ENSAYOS DE CO-LOCALIZACIÓN.

Las células HeLa fueron co-transfectadas con los plásmidos OxTR-GFP y el CB1R-YFP empleando el reactivo de Lipofectamina, según lo descrito anteriormente. Al cabo de las 48 horas de incubación las células se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS 1X) y se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 4% (PFA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con PBS 1X, se secaron y fueron montados sobre portaobjetos. Para la tinción de los núcleos se utilizó medio de montaje con 4',6 diamino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, USA). Para el análisis de la expresión de los receptores marcados con proteínas fluorescentes, las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania).

3.1.8 ENSAYOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR.

Las células HeLa fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en las condiciones descritas anteriormente durante 24 horas antes de la transfección con el ADN plasmídico. La transfección se realizó con los plásmidos OxTR-GFP y CB1R utilizando el reactivo Lipofectamina™2000, según lo recomendado por la casa comercial (Invitrogen, USA). Al cabo de las 48 horas de incubación las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y fueron incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente con anandamida (AEA), un agonista específico de los CB1R, a 270nM. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se fijaron con 1 ml de PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron lavados 3

veces con PBS 1X, se secaron y montaron sobre láminas portaobjetos. Para el análisis de la internalización de OxTR-GFP las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (Leica Microsystems, Alemania). Como controles se utilizaron células HeLa transfectadas con OxTR-GFP y CB1R-YFP sin tratamiento de anandamida y células HeLa transfectadas únicamente con OxTR-GFP con tratamiento de anandamida.

3.2 ESTADÍSTICA Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos se presentan mediante imágenes captadas a través del microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (Leica Microsystems, Alemania). Todas las muestras se observaron con el objetivo de inmersión utilizando una magnificación total de 630X y los filtros DAPI (489-513 nm), GFP (475-509 nm) y YFP (514-527 nm). El número de muestras (n) en cada condición experimental se indica en los pies de figura.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS.

4.1.1 OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO PARA LA TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HELA.

Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP fueron purificados obteniendo una cantidad suficiente de ADN para los diferentes ensayos experimentales.

Las células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas ambos plásmidos según se describe en la sección de materiales y métodos (**Figura 5**).

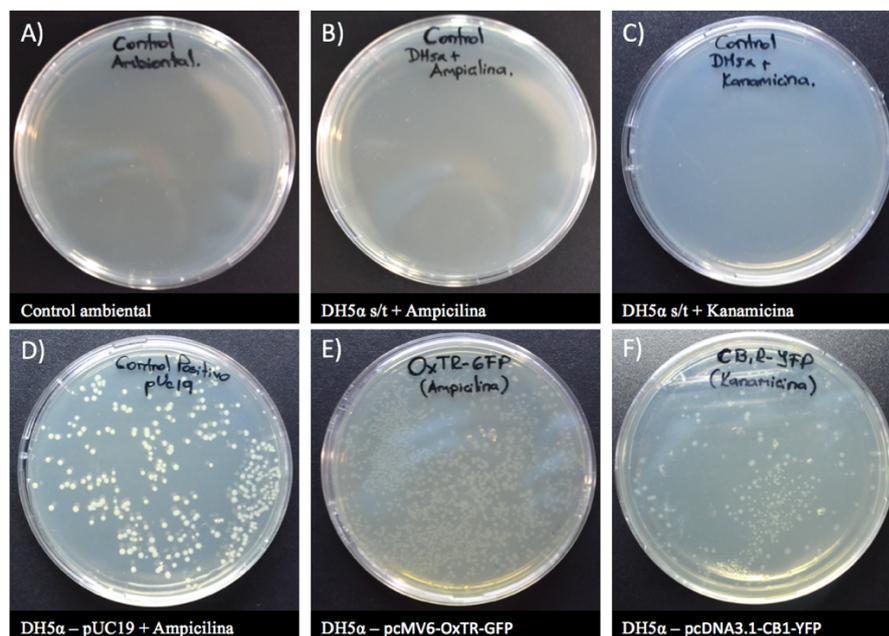


Figura 5. Transformación de *E. coli* DH5 α con los ADN plasmídicos. La figura muestra la transformación de *E. coli* DH5 α con los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP. A) Control de contaminación ambiental (placa sin células). B) Control de resistencia a ampicilina en *E. coli* DH5 α sin transformar (s/t). C) Control de resistencia a kanamicina en *E. coli* DH5 α sin transformar (s/t). D) Transformación de *E. coli* DH5 α con el plásmido pUC19 (para evaluar el protocolo de transformación). E) *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pcMV6-OxTR-GFP. F) *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3).

Los resultados obtenidos muestran una correcta transformación de *E. coli* DH5 α con los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP. Adicionalmente, la ausencia de crecimiento bacteriano en el control ambiental confirma que no existe contaminación en la incubadora utilizada para el cultivo bacteriano. De la misma forma, la ausencia de crecimiento bacteriano en células sin transformar muestra la eficacia de los antibióticos utilizados.

Posteriormente, a partir de los cultivos obtenidos se procedió a la purificación de ADN plasmídico. Para ello se utilizó el kit de purificación de ADN plasmídico (Invitrogen, USA) según las recomendaciones de la casa comercial (**Figura 6**).

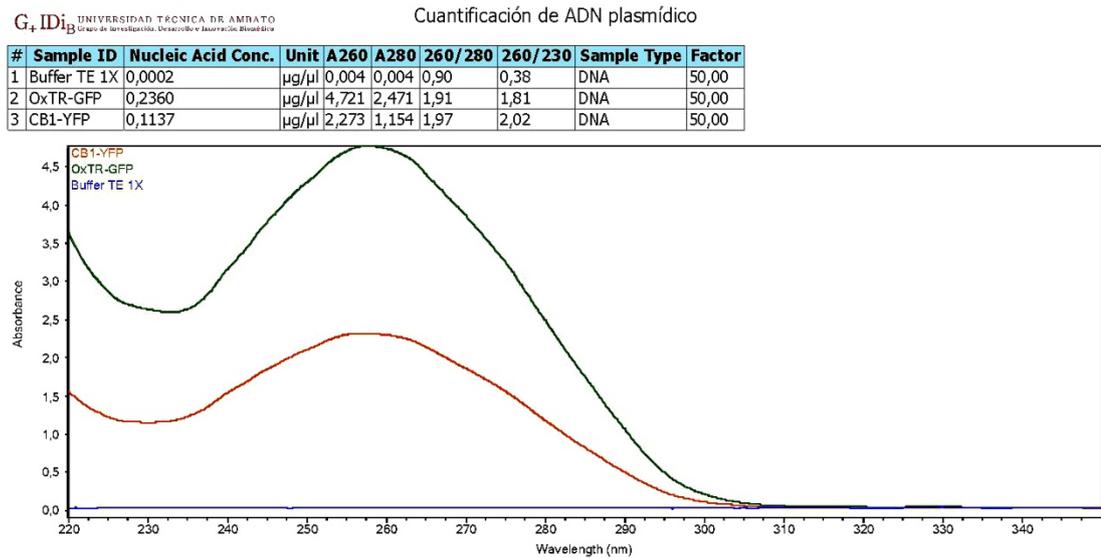


Figura 6. Cuantificación y calidad del ADN plasmídico. La figura muestra el rendimiento y calidad del ADN plasmídico obtenido con el kit de purificación. La imagen es representativa de tres experimentos realizados de forma independiente.

Los valores de las relaciones 260/280 y 260/230 indican que no existen contaminaciones con proteínas o con solventes orgánicos utilizados en la purificación. Sin embargo, el rendimiento ha estado por debajo de lo esperado según la información proporcionada por la casa comercial. En experimentos puntuales se obtuvieron entre 15-20 μg totales de ADN y según la casa comercial la cantidad máxima de ADN que se podría obtener es alrededor de 30 μg totales. No obstante, en el protocolo de transfección de células eucariotas se utiliza 1 μg de plásmido en lo cual este bajo rendimiento no afectó el uso del ADN purificado en la transfección de las células eucariotas.

Se ha descrito que la pureza del ADN plasmídico afecta significativamente la eficacia de los procesos de transfección. Para evaluar la calidad y conformación del ADN plasmídico purificado se realizó una electroforesis de ADN en geles de agarosa (**Figura 7**).

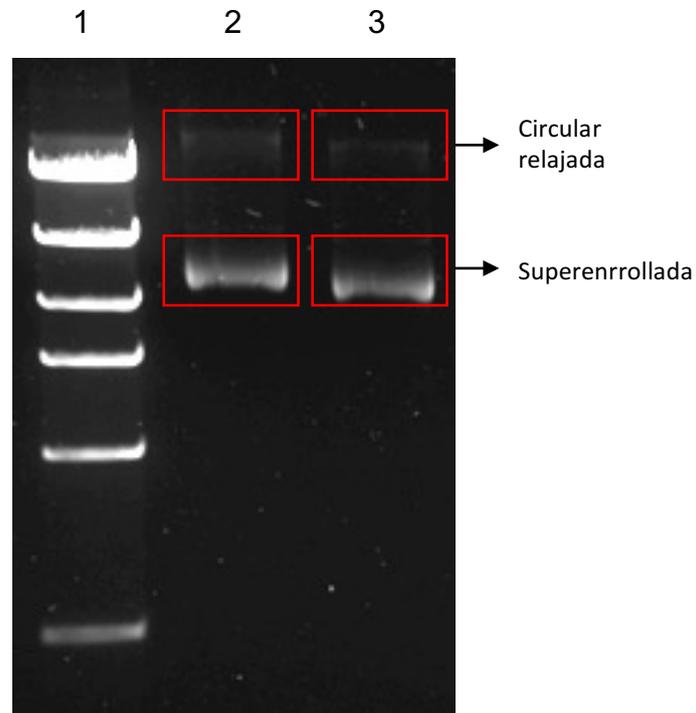


Figura 7. Electroforesis de ADN plasmídico en gel de agarosa al 1%. La figura muestra la calidad del ADN plasmídico obtenido a través del kit de purificación. Carril 1: Patrón de peso molecular High mass leader (Invitrogen, USA). Carril 2: pcMV6-OxTR-GFP. Carril 3: pcDNA3.1-CB1-YFP. La imagen es representativa de tres experimentos realizados de forma independiente.

El resultado obtenido en la electroforesis en gel de agarosa al 1% corresponde a la corrida electroforética típica de un ADN plasmídico. En nuestros resultados se obtuvo una banda intensa que corresponde al ADN superenrollado y una banda que podría corresponder a la forma circular relajada. En ninguno de los experimentos realizados se obtuvo una tercera banda que podría sugerir la linealización del plásmido. Tampoco, se obtuvieron imágenes que apuntasen a una degradación de la muestra.

Por otra parte, para descartar la presencia de inserciones, deleciones, sustituciones o corrimiento del marco de lectura en los vectores a utilizar. Por ello, se realizó la secuenciación de los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP (**Figura 8 y 9**).

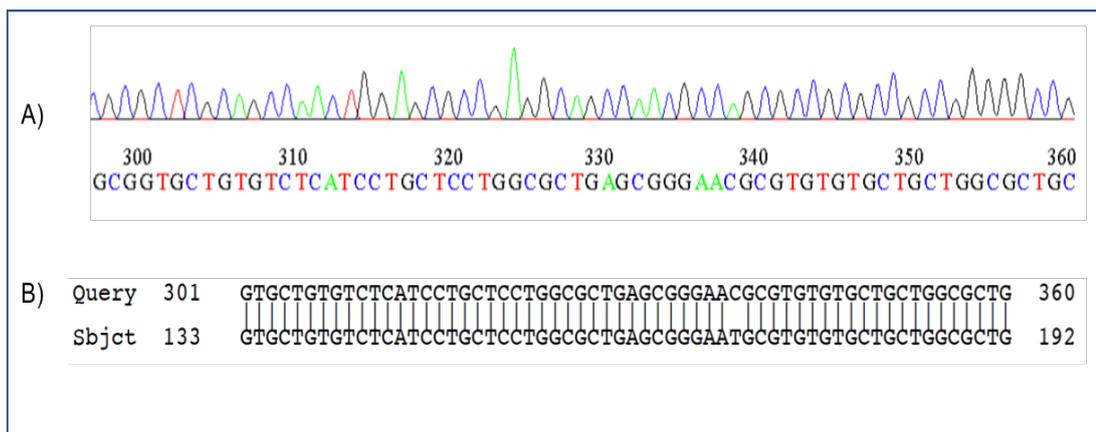


Figura 8. Homología de secuencia de un segmento de ADN plasmídico correspondiente al plásmido pcMV6-OxTR-GFP. La figura muestra la homología de secuencia entre un segmento de ADN plasmídico correspondiente al plásmido pcMV6-OxTR-GFP con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA). A) Segmento representativo de la secuencia de ADN plasmídico obtenido para el plásmido pcMV6-OxTR-GFP. B) Homología de secuencia entre la secuencia obtenida para el plásmido pcMV6-OxTR-GFP (Query) comparada con los Datos del NCBI (Sbjct). El ADN plasmídico fue transformado en células *E. coli* DH5 α , purificado a través de una columna de afinidad, cuantificado por espectrometría y su conformación fue determinada en geles de agarosa. 100 ng/ μ l de la solución de ADN plasmídico fue secuenciado a través de un servicio externo (*Ver Anexo I*).

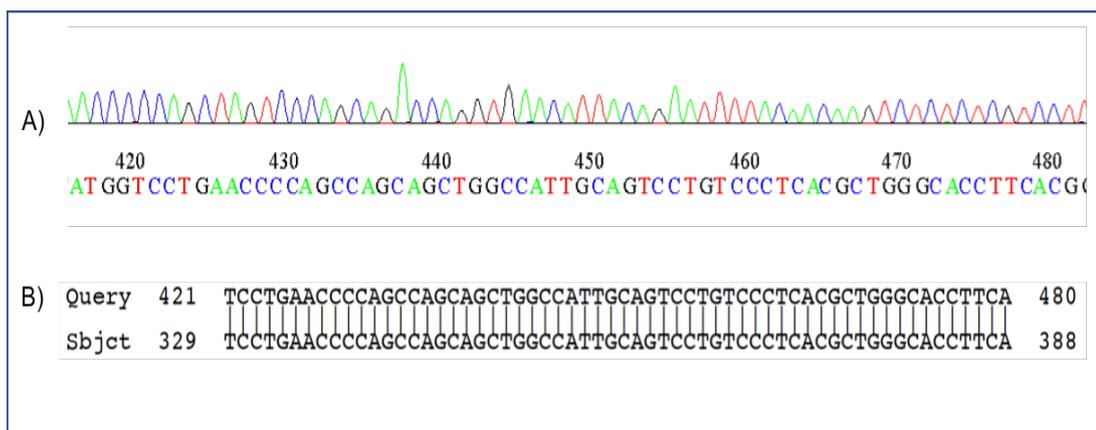


Figura 9. Homología de secuencia de un segmento de ADN plasmídico correspondiente al plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP. La figura muestra la homología de secuencia entre un segmento de ADN plasmídico correspondiente al plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA). A) Segmento representativo de la secuencia de ADN plasmídico obtenido para el plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP. B) Homología de secuencia entre de la secuencia obtenido para el plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP (Query) comparada con los Datos del NCBI (Sbjct). El ADN plasmídico fue transformado en células *E. coli* DH5 α , purificado a través de una columna de afinidad, cuantificado por espectrometría y su conformación fue determinada en geles de agarosa. 100 ng/ μ l de la solución de ADN plasmídico fue secuenciado a través de un servicio externo (*Ver Anexo II*).

Las secuencias obtenidas se compararon con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA) (*Anexo III, IV*), obteniendo una alineación perfecta con los receptores de interés. La correcta conformación de las proteínas fluorescentes que marcan a los receptores de interés se comprobó por microscopía de fluorescencia (*ver resultados 4.1.2*). Por todo ello, se corroboró que la secuencia de ambos plásmidos es correcta y pueden ser utilizados para la transfección en células eucariotas.

4.1.2 EXPRESIÓN TRANSCIENTE DE OXTR-GFP Y CB1R-YFP EN CÉLULAS HELA.

Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP fueron transfectados en células HeLa según lo descrito en materiales y métodos. En las figuras 10 y 11 se puede observar que existe una señal fluorescente específica a nivel de la membrana celular de las células HeLa lo que indica que existe una correcta expresión transciente de OxTR-GFP y CB1R-YFP.

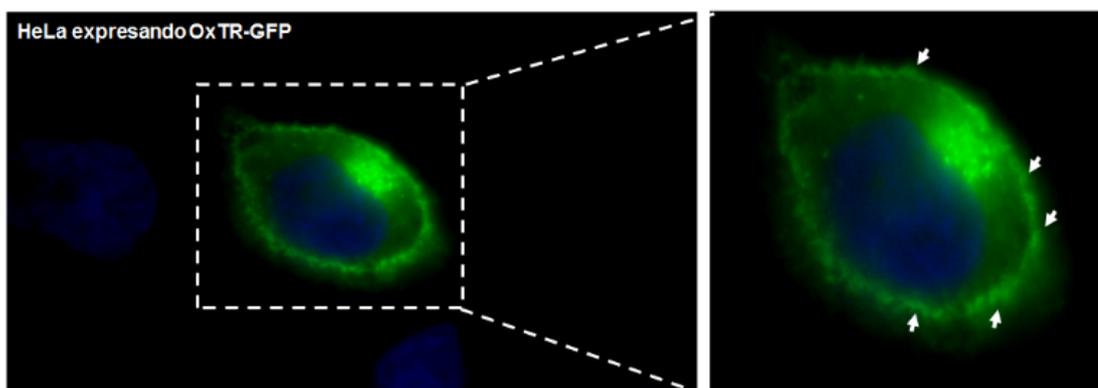


Figura 10. Expresión de receptores marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa. La figura muestra la expresión transciente de los receptores de oxitocina marcado con proteínas fluorescentes GFP (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las flechas señalan la expresión de los receptores en la membrana celular. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

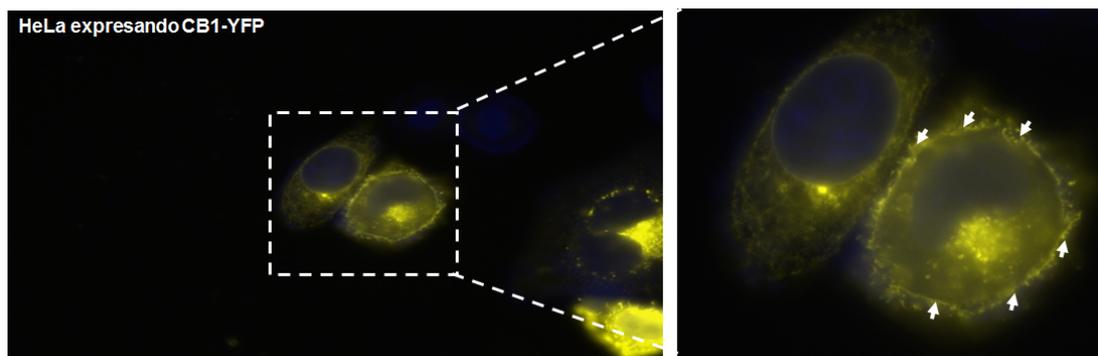


Figura 11. Expresión de receptores marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa. La figura muestra la expresión transiente de los receptores de CB1 marcados con proteínas fluorescentes YFP (amarillo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las flechas señalan la expresión de los receptores en la membrana celular. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

El patrón de fluorescencia muestra positividad en el citoplasma de las células que podría corresponder a los receptores ensamblados en el retículo endoplasmático que aún no han migrado a la membrana celular, tomando en cuenta que la eficiencia de la transfección fue baja. Por lo tanto, los plásmidos OxTR-GFP y CB1R-YFP y la transfección con el reactivo de lipofectamina se podrían utilizar para realizar ensayos de co-localización e internalización.

4.1.3 CO-LOCALIZACIÓN DE OXTR Y CB1R.

Una vez que se estandarizaron las transfecciones simples de los vectores que codifican para las proteínas de interés, se procedió a realizar las transfecciones dobles. Para ello, en todos los casos se utilizó 1 μg de ADN plasmídico de cada uno de los plásmidos a transfectar (2 μg totales) con el fin de evitar el estrés de retículo endoplasmático y que la mayoría de los receptores se expresen a nivel de la membrana celular.

Los resultados indican que las células HeLa co-transfectadas con OxTR-GFP y CB1R-YFP expresan correctamente ambos receptores marcados con proteínas fluorescentes en la membrana celular (**Figura 12**). Adicionalmente, la co-localización en zonas específicas de la membrana celular podrían ser las primeras evidencias que sugieren la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R (**Figura 12**).

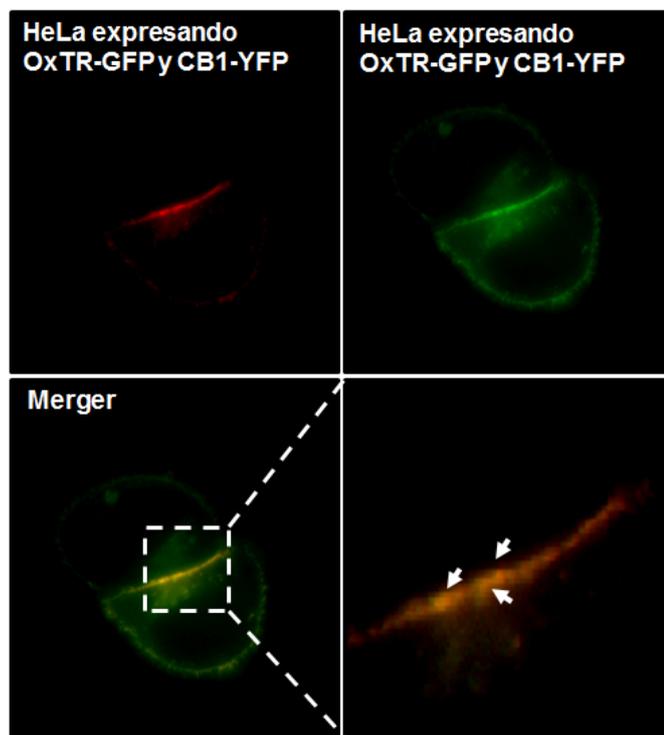


Figura 12. Co-localización de los receptores de oxitocina y los receptores de cannabinoide CB1 en la membrana citoplasmática de células HeLa que co-expresan ambos receptores. Panel superior izquierdo: La figura muestra la expresión transiente de los receptores de cannabinoide CB1 marcados con proteínas fluorescentes YFP (rojo) en células HeLa que co-expresan OxTR-GFP y CB1R-YFP. Panel superior derecho: La figura muestra la expresión transiente de los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) en células HeLa que co-expresan OxTR-GFP y CB1R-YFP. Panel inferior izquierdo: La formación de zonas de color amarillo-naranja indican la co-localización de los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) con los receptores de cannabinoide CB1 marcados con proteínas fluorescentes YFP (rojo). Panel inferior derecho: Magnificación de una imagen donde las flechas indican la co-localización de los receptores en algunas regiones específicas de la membrana citoplasmática de las células HeLa (amarillo-naranja). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

4.1.4 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR.

Dado que las señalizaciones de los receptores OxTR y CB1R están asociadas con la fisiología y fisiopatología de la ansiedad resulta interesante conocer la naturaleza de la posible regulación alostérica que tiene lugar en la interacción proteína-proteína dentro de este heteroreceptor. Para ello, células HeLa que co-expresan OxTR y CB1R fueron incubadas con un agonista específico de CB1R (**Figura 13**).

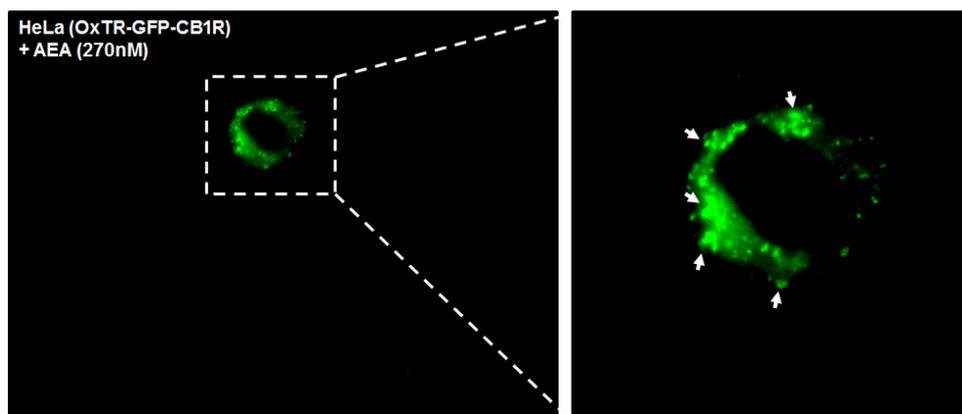


Figura 13. El tratamiento con un agonista específico del receptor cannabinoide CB1 promueve la internalización del receptor de oxitocina. Células HeLa que co-expresan los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP y los receptores de cannabinoides sin marca fluorescente tratadas con 270 nM de anandamida por 5 minutos a temperatura ambiente. Las flechas indican la formación de los endosomas de internalización de los receptores de oxitocina. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

Para comprobar que la internalización de OxTR se debe a la regulación alostérica en el heteroreceptor OxTR/CB1R, células HeLa que expresan solo el OxTR fueron tratadas con el mismo agonista específico de CB1R (**Figura 14**).

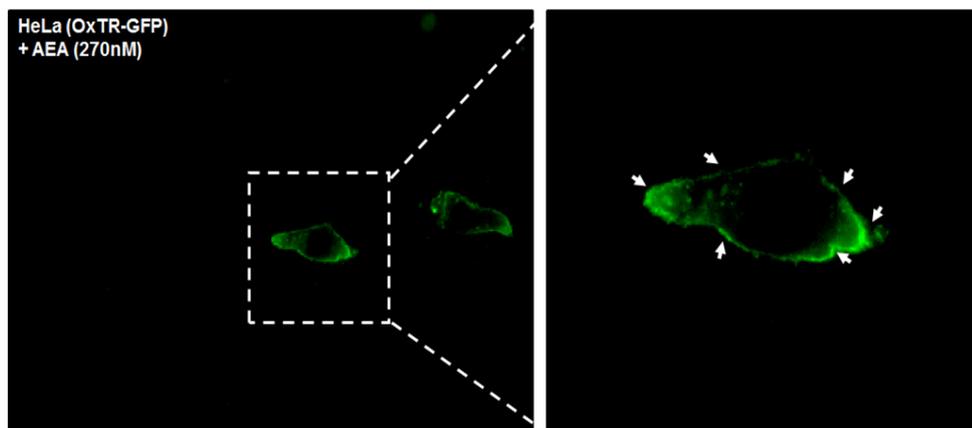


Figura 14. El tratamiento con un agonista específico del receptor cannabinoide CB1 no promueve la internalización del receptor de oxitocina en células HeLa que expresan solo el receptor de oxitocina. Células HeLa que solo expresan los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP incubadas con 270 nM de anandamida. Las flechas muestran la no internalización de los receptores de oxitocina. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

Por último, se comprobó que la co-transfección del plásmido (CB1 sin marca fluorescente) no afecta la expresión de OxTR, mediante la co-transfección de OxTR-GFP y CB1R en células HeLa. (Figura 15).

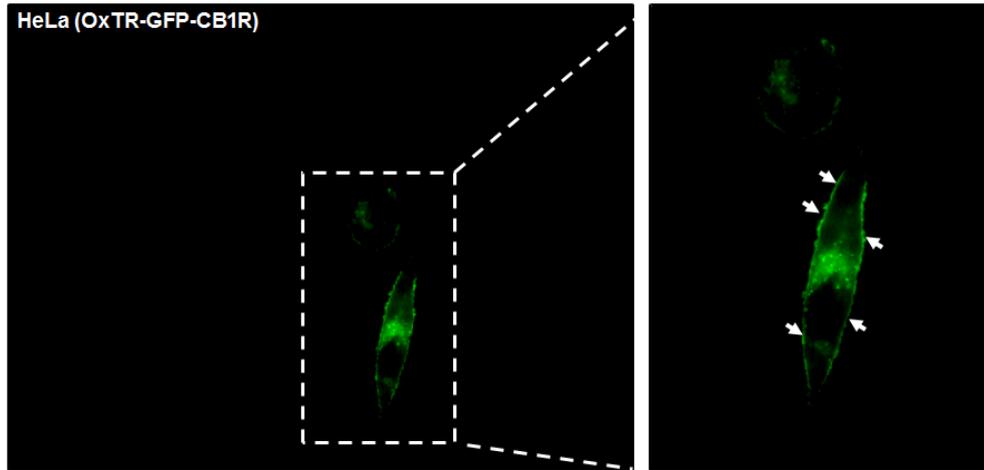


Figura 15. Co-transfección de OxTR-GFP y CB1R en células HeLa no afecta la expresión de receptor de oxitocina en la membrana celular. Células que co-expresan los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP y los receptores de cannabinoide CB1 sin marca fluorescente. Las flechas muestran la correcta expresión receptores de oxitocina en la superficie de las células. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

4.2 DISCUSIÓN.

En la actualidad, la identificación y utilización de heterómeros de GPCRs como blancos para el diseño de fármacos representa una interesante alternativa para el tratamiento de diferentes patologías mentales (Fuxe, Borroto-Escuela, Fisone, Agnati, & Tanganelli, 2014; Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014). Así mismo, la modulación alostérica que ejerce un protómero sobre otro dentro de estas complejas estructuras puede modificar considerablemente la señalización celular comparada al receptor en forma de monómero, representando otro acercamiento a nuevas estrategias de tratamiento en estas patologías mentales (Borroto-Escuela et al., 2013).

En este trabajo se obtuvieron evidencias experimentales que enfatizan la importancia del uso de los heteroreceptores y la modulación alostérica de la interacción proteína-proteína para el tratamiento de estas enfermedades. Los resultados obtenidos

proporcionan las primeras evidencias de la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R. Sin embargo, tanto el OxTR (Romero-Fernandez et al., 2013) como el CB1R (Callen et al., 2012) son capaces de formar heterómeros con otros GPCRs de la familia A. Dado que las señalizaciones independientes a través de OxTR y CB1R han sido implicadas con la fisiopatología y fisiopatología de la ansiedad, el hecho de que estén formando un heteroreceptor no solo podría contribuir a mejorar la comprensión de las bases neurofisiológicas de la ansiedad, sino que también podrían ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos ansiolíticos.

En este sentido, se aporta datos que demuestran que el tratamiento con un agonista específico de CB1R promueve la internalización de OxTR, lo que podría sugerir que existe una regulación alostérica positiva en la interacción receptor-receptor en el heteroreceptor OxTR/CB1R. En los últimos años se ha especulado sobre el uso terapéutico potencial de los ligandos bivalentes (Tena-Campos et al., 2014), basado en el efecto alostérico de un protómero sobre otro en el heterómero. Un reciente estudio muestra la síntesis de un ligando bivalente que se une a los receptores μ -opioide y CB1R y funciona como un potente analgésico (Le Naour et al., 2013). En este sentido, resulta novedoso la síntesis de compuestos bivalentes que de forma conjunta mejoren los efectos ansiolíticos y antidepresivos modulados por la señalización individual de la oxitocina y los cannabinoides.

La relevancia de este estudio inédito radica en la evidencia biofísica de la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R, lo cual podría ser de vital importancia para el diseño de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas para el tratamiento de los trastornos de ansiedad. Sin embargo, es indispensable corroborar los resultados a través de técnicas y modelos de experimentación que brinden evidencias más contundentes acerca de la formación de este heteroreceptor y la naturaleza de la modulación alostérica que se establece entre estos receptores.

4.3 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.

4.3.1 FORMACIÓN DEL HETERORECEPTOR OxTR/CB1R.

Hipótesis Nula:

No existe la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R.

Hipótesis Alternativa:

Existe la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R.

Una vez concluidos los ensayos de expresión transiente y co-localización de los receptores de interés, se determinó que los OxTR-GFP y CB1R-YFP co-localizan en ciertas áreas de la membrana celular. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa que indica que existe la formación del heteroreceptor OxTR/CB1R.

4.3.2 REGULACIÓN ALOSTÉRICA EN EL HETERORECEPTOR OxTR/CB1R

Hipótesis Nula:

La activación del CB1R no regula alostéricamente al OxTR.

Hipótesis Alternativa:

La activación del CB1R regula alostéricamente al OxTR.

Después de realizar los ensayos de internalización, se determinó que en células que co-expresan OxTR-GFP y CB1R, la activación de CB1R con un agonista específico induce la internalización de OxTR-GFP, lo que da indicios de una regulación alostérica dentro del heteroreceptor OxTR/CB1R. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa que indica que la activación del CB1R regula alostéricamente al OxTR.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CB1-YFP que codifican para los OxTR y CB1R respectivamente, se transfectan correctamente en células HeLa, y promueven que estas células eucariotas expresen los receptores marcados con fluorescencia en la membrana celular.
2. Se obtuvieron las primeras evidencias *in vitro* de la formación del heterómero entre OxTR y CB1R.
3. Se aportan datos que sugieren la existencia de una regulación alostérica facilitadora del protómero CB1 hacia el protómero OxTR en el heteroreceptor OxTR/CB1R.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Utilizar técnicas tales como la transferencia de energía de fluorescencia de Förster, transferencia de energía de bioluminiscencia, co-inmunoprecipitación y ensayos de proximidad de ligando que permitan corroborar la formación del heteroreceptor OxTR/CB1.
2. Estudiar la señalización a través de segundos mensajeros y genes reporteros para confirmar la naturaleza de la modulación alostérica que tiene lugar en el heterodímero OxTR/CB1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amico, J. A., Mantella, R. C., Vollmer, R. R., & Li, X. (2004). Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *J Neuroendocrinol*, *16*(4), 319-324. doi: 10.1111/j.0953-8194.2004.01161.x
- Baskerville, T. A., & Douglas, A. J. (2010). Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther*, *16*(3), e92-123. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00154.x
- Blume, A., Bosch, O. J., Miklos, S., Torner, L., Wales, L., Waldherr, M., & Neumann, I. D. (2008). Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci*, *27*(8), 1947-1956. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06184.x
- Borroto-Escuela, D. O., Correia, P. A., Romero-Fernandez, W., Narvaez, M., Fuxe, K., Ciruela, F., & Garriga, P. (2011). Muscarinic receptor family interacting proteins: role in receptor function. *J Neurosci Methods*, *195*(2), 161-169. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.11.025
- Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Garcia-Negredo, G., Correia, P. A., Garriga, P., Fuxe, K., & Ciruela, F. (2011). Dissecting the conserved NPxxY motif of the M3 muscarinic acetylcholine receptor: critical role of Asp-7.49 for receptor signaling and multiprotein complex formation. *Cell Physiol Biochem*, *28*(5), 1009-1022. doi: 10.1159/000335788
- Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Garriga, P., Ciruela, F., Narvaez, M., Tarakanov, A. O., . . . Fuxe, K. (2013). G protein-coupled receptor heterodimerization in the brain. *Methods Enzymol*, *521*, 281-294. doi: 10.1016/B978-0-12-391862-8.00015-6
- Bosch OJ, Wldherr, M, Nair HP, Hermanth PJ, Young LJ, Neumann ID. (2006). Viral-vector mediated expression of oxytocin receptors in the amygdala of virgin rats increases aggression and reduces anxiety. *Front. Neuroendocrinol.* *27*, 124-1215.
- Cabello, N., Gandia, J., Bertarelli, D. C., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., . . . Ciruela, F. (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem*, *109*(5), 1497-1507. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06078.x
- Callen, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortes, A., Mallol, J., . . . McCormick, P. J. (2012). Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem*, *287*(25), 20851-20865. doi: 10.1074/jbc.M111.335273
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C., & Luthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, *62*(6), 757-771. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.026
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D., Fisone, G., Agnati, L. F., & Tanganelli, S. (2014). Understanding the role of heteroreceptor complexes in the central nervous system. *Curr Protein Pept Sci*, *15*(7), 647.
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Marcellino, D., Romero-Fernandez, W., Frankowska, M., Guidolin, D., . . . Tanganelli, S. (2012). GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions. *Curr Med Chem*, *19*(3), 356-363.

- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Palkovits, M., Tarakanov, A. O., Ciruela, F., & Agnati, L. F. (2014). Moonlighting proteins and protein-protein interactions as neurotherapeutic targets in the G protein-coupled receptor field. *Neuropsychopharmacology*, *39*(1), 131-155. doi: 10.1038/npp.2013.242
- Fuxe, K., Dahlstrom, A., Hoistad, M., Marcellino, D., Jansson, A., Rivera, A., . . . Agnati, L. F. (2007). From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission. *Brain Res Rev*, *55*(1), 17-54. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.02.009
- Fuxe, K., O. Borroto-Escuela, D., Marcellino, D., Romero-Fernandez, W., Frankowska, M., Guidolin, D., . . . Tanganelli, S. (2012). GPCR Heteromers and their Allosteric Receptor-Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, *19*, 356-363. doi: 10.2174/092986712803414259
- Huber, D., Veinante, P., & Stoop, R. (2005). Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science*, *308*(5719), 245-248. doi: 10.1126/science.1105636
- Jimenez, A., Young, L. J., Triana-Del Rio, R., LaPrairie, J. L., & Gonzalez-Mariscal, G. (2015). Neuroanatomical distribution of oxytocin receptor binding in the female rabbit forebrain: Variations across the reproductive cycle. *Brain Res*, *1629*, 329-339. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.043
- Jurek, B., Slattery, D. A., Maloumy, R., Hillerer, K., Koszinowski, S., Neumann, I. D., & van den Burg, E. H. (2012). Differential contribution of hypothalamic MAPK activity to anxiety-like behaviour in virgin and lactating rats. *PLoS One*, *7*(5), e37060. doi: 10.1371/journal.pone.0037060
- Katona, István, Rancz, Ede A., Acsády, László, Ledent, Catherine, Mackie, Ken, Hájos, Norbert, & Freund, Tamás F. (2001). Distribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Amygdala and their Role in the Control of GABAergic Transmission. *The Journal of Neuroscience*, *21*, 9506-9518.
- Koch, S. B., van Zuiden, M., Nawijn, L., Frijling, J. L., Veltman, D. J., & Olf, M. (2015). Intranasal Oxytocin Administration Dampens Amygdala Reactivity towards Emotional Faces in Male and Female PTSD Patients. *Neuropsychopharmacology*. doi: 10.1038/npp.2015.299
- Laszlo, K., Kovacs, A., Zagoracz, O., Ollmann, T., Peczely, L., Kertes, E., . . . Lenard, L. (2016). Positive reinforcing effect of oxytocin microinjection in the rat central nucleus of amygdala. *Behav Brain Res*, *296*, 279-285. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.021
- Le Naour, M., Akgun, E., Yekkirala, A., Lunzer, M. M., Powers, M. D., Kalyuzhny, A. E., & Portoghese, P. S. (2013). Bivalent ligands that target mu opioid (MOP) and cannabinoid1 (CB1) receptors are potent analgesics devoid of tolerance. *J Med Chem*, *56*(13), 5505-5513. doi: 10.1021/jm4005219
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, *23*, 155-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- Majidi, J., Kosari-Nasab, M., & Salari, A. A. (2016). Developmental minocycline treatment reverses the effects of neonatal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors, hippocampal inflammation, and HPA axis activity in adult mice. *Brain Res Bull*, *120*, 1-13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.10.009

- Manzanares, Jorge, Urigüen, Leyre, Rubio, Gabriel, & Palomo, Tomás. (2004). Role of endocannabinoid system in mental diseases. *Neurotoxicity Research*, 6(3), 213-224. doi: 10.1007/bf03033223
- Marshall, F. H., Jones, K. A., Kaupmann, K., & Bettler, B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci*, 20(10), 396-399.
- Martin, Elizabeth I., Ressler, Kerry J., Binder, Elisabeth, & Nemeroff, Charles B. (2010). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30, 865-891. doi: 10.1016/j.cll.2010.07.006
- Martin, Miquel, Ledent, Catherine, Parmentier, Marc, Maldonado, Rafael, & Valverde, Olga. (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology*, 159, 379-387. doi: 10.1007/s00213-001-0946-5
- Moreira, Fabrício A., & Wotjak, Carsten T. (2010). Cannabinoids and Anxiety. In M. B. Stein & T. Steckler (Eds.), *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment* (pp. 429-450). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Navarro, G., Carriba, P., Gandia, J., Ciruela, F., Casado, V., Cortes, A., . . . Franco, R. (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal*, 8, 1088-1097. doi: 10.1100/tsw.2008.136
- Neumann, I. D. (2008). Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol*, 20(6), 858-865. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01726.x
- Brain oxytocin: A key regulator of emotional and social behaviours in both females and males, 20 858-865 (2008).
- Paz, R., & Pare, D. (2013). Physiological basis for emotional modulation of memory circuits by the amygdala. *Curr Opin Neurobiol*, 23(3), 381-386. doi: 10.1016/j.conb.2013.01.008
- Probst, W. C., Snyder, L. A., Schuster, D. I., Brosius, J., & Sealfon, S. C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol*, 11(1), 1-20. doi: 10.1089/dna.1992.11.1
- Rey, A. A., Purrio, M., Viveros, M. P., & Lutz, B. (2012). Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Neuropsychopharmacology*, 37(12), 2624-2634. doi: 10.1038/npp.2012.123
- Ring, R. H., Malberg, J. E., Potestio, L., Ping, J., Boikess, S., Luo, B., . . . Rosenzweig-Lipson, S. (2006). Anxiolytic-like activity of oxytocin in male mice: behavioral and autonomic evidence, therapeutic implications. *Psychopharmacology (Berl)*, 185(2), 218-225. doi: 10.1007/s00213-005-0293-z
- Romero-Fernandez, W., Borroto-Escuela, D. O., Agnati, L. F., & Fuxe, K. (2013). Evidence for the existence of dopamine D2-oxytocin receptor heteromers in the ventral and dorsal striatum with facilitatory receptor-receptor interactions. *Mol Psychiatry*, 18(8), 849-850. doi: 10.1038/mp.2012.103
- Schechter, M., Weller, A., Pittel, Z., Gross, M., Zimmer, A., & Pinhasov, A. (2013). Endocannabinoid receptor deficiency affects maternal care and alters the dam's hippocampal oxytocin receptor and brain-derived neurotrophic factor expression. *Journal of Neuroendocrinology*, 25, 898-909. doi: 10.1111/jne.12082

- Sobota, R., Mihara, T., Forrest, A., Featherstone, R. E., & Siegel, S. J. (2015). Oxytocin reduces amygdala activity, increases social interactions, and reduces anxiety-like behavior irrespective of NMDAR antagonism. *Behav Neurosci*, *129*(4), 389-398. doi: 10.1037/bne0000074
- Tena-Campos, M., Ramon, E., Rivera, D., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Fuxe, K., & Garriga, P. (2014). G-protein-coupled receptors oligomerization: emerging signaling units and new opportunities for drug design. *Curr Protein Pept Sci*, *15*(7), 648-658.
- Van Craenenbroeck, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Skieterska, K., Rondou, P., Lintermans, B., . . . Haegeman, G. (2011). Dopamine D4 receptor oligomerization--contribution to receptor biogenesis. *FEBS J*, *278*(8), 1333-1344. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08052.x
- Van Soest, P. F., Lodder, J. C., & Kits, K. S. (2000). Activation of protein kinase C by oxytocin-related conopressin underlies pacemaker current in *Lymnaea* central neurons. *J Neurophysiol*, *84*(5), 2541-2551.
- Verty, A. N A, McFarlane, J. R., McGregor, I. S., & Mallet, P. E. (2004). Evidence for an interaction between CB1 cannabinoid and oxytocin receptors in food and water intake. *Neuropharmacology*, *47*, 593-603. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.06.002
- Viveros, M. P., Marco, Eva M., & File, Sandra E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *81*, 331-342. doi: 10.1016/j.pbb.2005.01.029
- Vrachnis, N., Malamas, F. M., Sifakis, S., Deligeoroglou, E., & Iliodromiti, Z. (2011). The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents. *Int J Endocrinol*, *2011*, 350546. doi: 10.1155/2011/350546
- Windle, R. J., Shanks, N., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (1997). Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology*, *138*(7), 2829-2834. doi: 10.1210/endo.138.7.5255

ANEXOS

Anexo I: Secuenciación del plásmido pcMV6-OxTR-GFP



Anexo II: Secuenciación del plásmido pcDNA3.1-CB1-YFP



Anexo III Homología de secuencia:

Secuencia de ADN plasmídico de OxTR comparada con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

15/3/2017

NCBI Blast:170221-041_G22_M1_CMV-F.ab1 1300

[BLAST](#) » [Global Alignment](#) » RID-CJPP95VB113

BLAST Results

Needleman-Wunsch alignment of two sequences

Job title: 170221-041_G22_M1_CMV-F.ab1#1300

RID [CJPP95VB113](#) (Expires on 03-16 23:16 pm)
Query ID Icl|Query_170489
Description 170221-041_G22_M1_CMV-F.ab1
Molecule type nucleic acid
Query Length 1300

Subject ID Icl|Query_170491
Description ENA|CAA56562|CAA56562.1 Homo sapiens (human) partial oxytocin receptor : Location:1..924
[See details](#)
Molecule type nucleic acid
Subject Length 924
Program BLASTN 2.6.1+

[Dot Matrix View](#)



Plot of Icl|Query_170489 vs Icl|Query_170491

[\[?\]](#)



[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Score	Percent Ident	Accession
ENA CAA56562 CAA56562.1 Homo sapiens (human) partial oxytocin receptor : Location:1..924	1041	70%	Query_170491

[Alignments](#)

ENA|CAA56562|CAA56562.1 Homo sapiens (human) partial oxytocin receptor : Location:1..924
Sequence ID: Query_170491 Length: 924 Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 924

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

1/3

NW Score	Identities	Gaps	Strand	Frame
1041	916/1300(70%)	376/1300(28%)	Plus/Plus	
Features:				
Query 1	GCGAATGGGCAGTTTATAGCAGAGCTCTCGGCTAACTAGAGAACCCTACTGCTTACTGGC			60
Query 61	TTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGTAGCGTTTAAACTTAA			120
Query 121	GCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTACACCATGGAGGGCGCG			180
Sbjct 1				12 ATGGAGGGCGCG
Query 181	CTCGCAGCCAACTGGAGCGCCGAGGCGCAACGCCAGCCGCGCGCGCGGGGGCCGAG			240
Sbjct 13	CTCGCAGCCAACTGGAGCGCCGAGGCGCAACGCCAGCCGCGCGCGCGGGGGCCGAG			72
Query 241	GGCAACCGCACCGCGGACCCCGCGCGCAACGAGGCCCTGGCGCGCTGGAGGTGGCG			300
Sbjct 73	GGCAACCGCACCGCGGACCCCGCGCGCAACGAGGCCCTGGCGCGCTGGAGGTGGCG			132
Query 301	GTGCTGTGTCTCATCTGCTCCTGGCGCTGAGCGGGAACGCGTGTGTGCTGGCGCTG			360
Sbjct 133	GTGCTGTGTCTCATCTGCTCCTGGCGCTGAGCGGGAATGCGTGTGTGCTGGCGCTG			192
Query 361	CGCACCACAGCCAGAAGCACTCGCGCCTTCTTCTTCATGAAGCACCTAAGCATCGCC			420
Sbjct 193	CGCACCACAGCCAGAAGCACTCGCGCCTTCTTCTTCATGAAGCACCTAAGCATCGCC			252
Query 421	GACCTGGTGGTGGCAGTGTTCAGGTGCTGCCGCAAGTGTGTGGGACATCACCTTCCGC			480
Sbjct 253	GACCTGGTGGTGGCAGTGTTCAGGTGCTGCCGCAAGTGTGTGGGACATCACCTTCCGC			312
Query 481	TTCTACGGGCCCAGCTGCTGTGCGCGCTGGTCAAGTACTTGCAGTGGTGGGCATGTTT			540
Sbjct 313	TTCTACGGGCCCAGCTGCTGTGCGCGCTGGTCAAGTACTTGCAGTGGTGGGCATGTTT			372
Query 541	GCCTCAACCTACCTGCTGCTCATGTCCCTGGACCGCTGCTGGCCATCTGCCAGCCG			600
Sbjct 373	GCCTCAACCTACCTGCTGCTCATGTCCCTGGACCGCTGCTGGCCATCTGCCAGCCG			432
Query 601	CTGCGCTCGCTGCGCCCGCACCGACCGCTGGCAGTCTGCCACGTGGCTCGGCTGC			660
Sbjct 433	CTGCGCTCGCTGCGCCCGCACCGACCGCTGGCAGTCTGCCACGTGGCTCGGCTGC			492
Query 661	CTGGTGGCCAGCGCGCCGAGGTGCACATCTTCTCTCGCGAGGTGGCTGACGGCGTC			720
Sbjct 493	CTGGTGGCCAGCGCGCCGAGGTGCACATCTTCTCTCGCGAGGTGGCTGACGGCGTC			552
Query 721	TTGACTGCTGGGCGCTTTCATCCAGCCCTGGGGACCAAGGCCTACATCACATGGATC			780
Sbjct 553	TTGACTGCTGGGCGCTTTCATCCAGCCCTGGGGACCAAGGCCTACATCACATGGATC			612
Query 781	ACGCTAGCTGTACATCGTGCCTGCTCATCGTGCCTGCTACGGCCTTATCAGC			840
Sbjct 613	ACGCTAGCTGTACATCGTGCCTGCTCATCGTGCCTGCTACGGCCTTATCAGC			672
Query 841	TTCAAGATCTGGCAGAACTTGGCGCTCAAGACCGCTGCAGCGCGCGCGCGGAGCGCCA			900
Sbjct 673	TTCAAGATCTGGCAGAACTTGGCGCTCAAGACCGCTGCAGCGCGCGCGCGGAGCGCCA			732
Query 901	AAAGCGCGCGCGCTGGCGATGGGGGGCCCTGGCCCTGGCGGCTGTCAGCAGCTCAAG			960
Sbjct 733	GAGGCGCGCGCGCTGGCGATGGGGGGCCCTGGCCCTGGCGGCTGTCAGCAGCTCAAG			792
Query 961	CTCATCTCCAAGGCCAAGATCCGCACGGTCAAGATGACTTTCATCATCGTGGCCTTC			1020
Sbjct 793	CTCATCTCCAAGGCCAAGATCCGCACGGTCAAGATGACTTTCATCATCGTGGCCTTC			852
Query 1021	ATCGTGTCTGGACGCCCTTCTTCTTCGTGCAGATGTGGAGCGCTGGGATGCCAACGCG			1080
Sbjct 853	ATCGTGTCTGGACGCCCTTCTTCTTCGTGCAGATGTGGAGCGCTGGGATGCCAACGCG			912
Query 1081	CCCAAGGAAGCCTCGGGCTTCATCATCGTCTCTGGGCGCCTCAACAGTGTGTC			1140
Sbjct 913	CCCAAGGAAG-----GT			924
Query 1141	AACCCCTGGATTTACATGCTTGTTCATGGGCCACCTCTTTCACCAAACCTGGCACGGC			1200
Query 1201	TTTCTCGGGCTTGTCTGCGCACCTTACTTGAAAGGGCAAACCCCTGGGAAAAACAAA			1260
Query 1261	TGCCCCCAAGAAGACAAACCTGTCTTCTTTGTTTCGG			1300

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center Mailing list](#)

[YouTube](#)



- [National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

NCBI

[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)

Anexo III Homología de secuencia:

Secuencia de ADN plasmídico de CB1R comparada con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

15/3/2017

NCBI Blast:170221-041_K22_M2_CMV-F.ab1 640

[BLAST®](#) » [Global Alignment](#) » RID-CJS068DM113

BLAST Results

Needleman-Wunsch alignment of two sequences

Job title: 170221-041_K22_M2_CMV-F.ab1#640

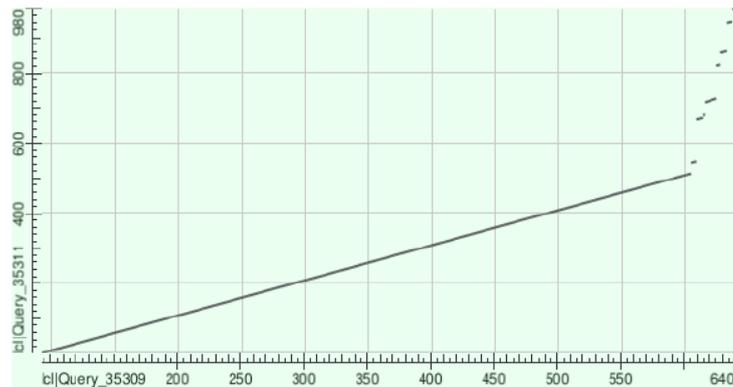
RID	CJS068DM113 (Expires on 03-16 23:38 pm)	Subject ID	lcl Query_35311
Query ID	lcl Query_35309	Description	ENA AAB18200 AAB18200.1 Homo sapiens (human) CB1 cannabinoid receptor : Location:1..1000
Description	170221-041_K22_M2_CMV-F.ab1		See details
Molecule type	nucleic acid	Molecule type	nucleic acid
Query Length	640	Subject Length	1000
		Program	BLASTN 2.6.1+

[Dot Matrix View](#)



Plot of lcl|Query_35309 vs lcl|Query_35311

[2]



[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Score	Percent Ident	Accession
ENA AAB18200 AAB18200.1 Homo sapiens (human) CB1 cannabinoid receptor : Location:1..1000	-77.0	50%	Query_35311

[Alignments](#)

ENA|AAB18200|AAB18200.1 Homo sapiens (human) CB1 cannabinoid receptor : Location:1..1000
Sequence ID: Query_35311 Length: 1000 Number of Matches: 1
Range 1: 1 to 1000

NW Score	Identities	Gaps	Strand	Frame
-77	542/1092(50%)	524/1092(47%)	Plus/Plus	
Features:				
Query 1	CGCGAATGGGTAGCAATAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACC			60
Query 61	GGA			120
Sbjct 1	ATGAAGTCGATCCTAGATGGCCCTGCAG			28
Query 121	ATACCACCTTCCGCACCATCACCACTGACCTCCTGTACGTGGGCTCAAATGACATTCAGT			180
Sbjct 29	ATACCACCTTCCGCACCATCACCACTGACCTCCTGTACGTGGGCTCAAATGACATTCAGT			88
Query 181	ACGAAGACATCAAAGGTGACATGGCATCCAAATAGGGTACTTCCCACAGAAATTCCTT			240
Sbjct 89	ACGAAGACATCAAAGGTGACATGGCATCCAAATAGGGTACTTCCCACAGAAATTCCTT			148
Query 241	TAACTTCCTTTAGGGGAAGTCCCTTCCAAGAGAAGATGACTCGGGAGACAACCCACGC			300
Sbjct 149	TAACTTCCTTTAGGGGAAGTCCCTTCCAAGAGAAGATGACTCGGGAGACAACCCACGC			208
Query 301	TAGTCCCAGCAGACCAGGTGAACATTACAGAATTTTACAACAAGTCTCTCGTCCCTCA			360
Sbjct 209	TAGTCCCAGCAGACCAGGTGAACATTACAGAATTTTACAACAAGTCTCTCGTCCCTCA			268
Query 361	AGGAGAATGAGGAGAACATCCAGTGTGGGGAGAACTTCATGGACATAGAGTGTTCATGG			420
Sbjct 269	AGGAGAATGAGGAGAACATCCAGTGTGGGGAGAACTTCATGGACATAGAGTGTTCATGG			328
Query 421	TCCTGAACCCAGCCAGCAGCTGGCCATTGCAGTCTGTCCCTCACGCTGGGCACCTTCA			480
Sbjct 329	TCCTGAACCCAGCCAGCAGCTGGCCATTGCAGTCTGTCCCTCACGCTGGGCACCTTCA			388
Query 481	CGGTCTGGAGAACCTCCTGGTGTGTGCTCATCTCCACTCCCGCAGCCTCAGCTGCA			540
Sbjct 389	CGGTCTGGAGAACCTCCTGGTGTGTGCTCATCTCCACTCCCGCAGCCTCAGCTGCA			448
Query 541	GGCTTCCTACCACTTCATCGGCAGCTGCGGTGGCAAACATCCTGGGAGCGTCATTT			600
Sbjct 449	GGCTTCCTACCACTTCATCGGCAGCTGCGGTGGCAAACATCCTGGGAGCGTCATTT			508
Query 601	TAGTC-----CGCA-----			609
Sbjct 509	TTGTCTACAGCTTCATTGACTTCCACGTGTTCCACCCCAAAGATAGCCGCAACGTGTTT			568
Query	-----			
Sbjct 569	TGTTCAAACCTGGTGGGTACGGCCCTCCTTCACTGCCTCCGTGGGCAGCCTGTTCTCA			628
Query 610	-----GCCTA-----AT-----			616
Sbjct 629	CAGCCATCGACAGGTACATATCCATTACAGGCCCTGGCCATAAAGAGGATTGTCACCA			688
Query 617	-----GATGT-----ACCA-----			625
Sbjct 689	GGCCCAAGGCCGTGGTAGCGTTTTGCCTGATGTGGACCATAGCCATTGTGATCGCCGTGC			748
Query	-----			
Sbjct 749	TGCTCTCTGGGCTGGAAGTGCAGAACTGCAATCTGTTGCTCAGACATTTCCAC			808
Query 626	-----CTA-----GCTTC-----			633
Sbjct 809	ACATTGATGAAACCTACCTGATGTTCTGGATCGGGTCACCAGCGTACTGCTTCTGTTC			868
Query	-----			
Sbjct 869	TCGTGATGCGTACATGTATATCTCTGGAAGGCTCACAGCCACGCGTCCGCATGATTC			928
Query 634	-----CCAG-----GGT-----			640
Sbjct 929	AGCGTGGCACCAGAAGAGCATCATCCACAGTCTGAGGATGGGAAGGTACAGGTGA			988
Sbjct 989	CCCGCCAGACC 1000			

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine



[Support center](#) [Mailing list](#)

[YouTube](#)



[National Library Of Medicine](#)



- [National Institutes Of Health](#)



- [U.S. Department of Health & Human Services](#)



- [USA.gov](#)

NCBI

[National Center for Biotechnology Information](#), [U.S. National Library of Medicine](#) 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
[Policies and Guidelines](#) | [Contact](#)