



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



---

**Formación del heteroreceptor oxitocina-serotonina 5-HT1A: Relevancia de la interacción receptor-receptor en el tratamiento de trastornos de ansiedad.**

---

Trabajo de Titulación, modalidad 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 Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Autor:** Darwin Israel Manjarrés Raza.

**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, Darwin Israel Manjarrés Raza, 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.



---

Sr. Darwin Israel Manjarrés Raza

C.I: 180463716-1

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de 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. Marisel De Lucca Osorio, PhD.

C.I:175781830-5



---

Dra. Yenddy Nayghit Carrero, PhD.

C.I: 175740457-7

Ambato, 16 de marzo del 2017

## **DERECHOS DEL 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 ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



St. Darwin Israel Manjarrés Raza  
C.I: 180463716-1

**AUTOR**

## DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mi amada familia, porque siempre han estado ahí para hacerme compañía y darme muchos ánimos para afrontar este reto. Gracias por soportar mis buenos y malos ratos en el transcurso de este proyecto. Infinitas gracias a mi hermosa madre Bélgica Raza por todo su apoyo y por ser el más grande ejemplo de lucha y superación, inculcándome los mejores valores con su ejemplo y dedicación. Gracias a mi “enano” mi hermano Joe Manjarrés Raza por ser el principal motor para alcanzar mis metas. Infinitas gracias a mi tío José Ernesto Raza López por ser mi padre y amigo desde que tengo memoria, gracias por enseñarme a ser un guerrero en la vida haciendo el mayor esfuerzo y poniéndolo todo en las manos de Dios, cuando todo lo malo vino sobre mí usted me dio la llave del éxito, gracias tío por todo el apoyo en el transcurso de mi carrera ya que sin su apoyo nada de esto sería posible.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero y profundo agradecimiento al jefe Dr. Wilber Romero Fernández PhD. por permitirme realizar este increíble proyecto en su prestigioso grupo de investigación y por su valiosa amistad, gracias por la paciencia, comprensión, así como la gran visión científica en cada consejo y conocimientos que me ha impartido como supervisor y respetable científico.

Gracias al Dr. Dasiel Oscar Borroto-Escuela del Departamento de Neurociencia del Instituto Karolinska (Suecia) por donarnos los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP los cuales han sido la base de esta investigación. Infinitas gracias a 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 por donarnos las células HeLa (ATCC<sup>®</sup>CCL-2<sup>™</sup>) indispensables en esta investigación.

Infinitas gracias a todos quienes conforman el Grupo de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica de la Universidad Técnica de Ambato. Mis agradecimientos más sinceros para al Lic. Mg. Yunis Pérez Betancourt y al PhD. Orestes López Hernández por confiar en mí y haberme recomendado para realizar mi Trabajo de Titulación en este prestigioso grupo de investigación. A la PhD. Soledad Sánchez Mateos por sus valiosos consejos y por toda la ayuda que me ha brindado, muchas gracias Mg. Elizabeth Proaño por ser como mi madre desde que me incorpore al laboratorio de investigación, a la Lic. Vanessa Naranjo y Lic. María Belén Velasteguí gracias por su increíble amistad y valiosos consejos. Gracias Johanna Morales por ser mi apoyo incondicional en el transcurso de este proyecto y compartir tantas alegrías junto a mí. A mis compañeros y amigos tesistas, Cristian Carvajal, David Cabrera, Andrés Tayo y a los compitas de la FCIAL gracias a todos el ambiente de trabajo ha sido enriquecedor, ameno y divertido.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA .....	I
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.....	IV
DERECHOS DEL AUTOR.....	V
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I	
1.1 TEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.31 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.32 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPITULO II	
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.2 HIPÓTESIS.....	11
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	11
CAPITULO III	
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.2 ESTADÍSTICA Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	16
CAPITULO IV	
4.1 RESULTADOS.....	17
4.2 DISCUSIÓN.....	25
4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	27
CAPITULO V	
5.1 CONCLUSIONES.....	28
5.2 RECOMENDACIONES.....	28
REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	29
ANEXOS.....	38



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA.1	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL RECEPTOR MUSCARÍNICO M3 HUMANO (GPCR DE LA FAMILIA A).....	6
FIGURA.2	UNA VISIÓN EN LA ESTRUCTURA Y EL ESTUDIO DE LOS GPCRS.....	7
FIGURA.3	CASCADA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DEL NEUROPEPTIDO OXITOCINA.....	8
FIGURA.4	CASCADA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	9
FIGURA.5	OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE LA TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> DH5 $\alpha$ .....	17
FIGURA.6	DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD Y PUREZA DEL ADN PLASMÍDICO OBTENIDO.....	18
FIGURA.7	ELECTROFORESIS DE LOS ADN PLASMÍDICOS EN GEL DE AGAROSA AL 1% CORRESPONDIENTE A LOS VECTORES pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP.....	19
FIGURA.8	SECUENCIA DE ADN CORRESPONDIENTE AL PLÁSMIDO pcMV6-OxTR-GFP.....	20
FIGURA.9	SECUENCIA DE ADN CORRESPONDIENTE AL PLÁSMIDO pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP.....	21
FIGURA.10	EXPRESIÓN DE LOS OxTR MARCADOS CON FLUORESCENCIA EN LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE CÉLULAS HeLa .....	22
FIGURA.11	EXPRESIÓN DE LOS 5-HT1AR MARCADOS CON FLUORESCENCIA EN LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE CÉLULAS HeLa.....	22
FIGURA.12	COLOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE OXITOCINA Y LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT1A EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS HeLa.....	23
FIGURA.13	TRATAMIENTO CON UN AGONISTA DEL RECEPTOR SEROTONINA 5-HT1A INDUCE LA INTERNALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE OXITOCINA.....	24
FIGURA.14	TRATAMIENTO CON UN AGONISTA DEL RECEPTOR SEROTONINA 5-HT1A NO INDUCE LA INTERNALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE OXITOCINA EN CÉLULAS HeLa QUE SOLO EXPRESAN EL RECEPTOR DE OXITOCINA.....	24

## RESUMEN

Los trastornos de ansiedad y depresión representan las patologías mentales de mayor prevalencia en la población por lo que constituyen un serio problema de salud pública a nivel mundial. En la actualidad se ha descrito que tanto la formación de homodímeros y heterodímeros como la regulación alostérica que tiene lugar entre los protómeros implicados en las interacciones receptor-receptor representan importantes dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mentales.

La presente investigación se basó en demostrar la interacción física entre el receptor de oxitocina (OxTR) y el receptor serotonina 5-HT1A (5-HT1AR). Los resultados obtenidos mostraron la expresión de los receptores OxTR-GFP y 5-HT1AR-YFP en la membrana citoplasmática de células HeLa. Además, se demostró a través de una técnica con fundamento biofísico que estos receptores colocalizan en zonas discretas de la membrana celular así mismo, el tratamiento de células HeLa que coexpresan ambos receptores con un agonista específico de 5-HT1AR (8-OH-DPAT, 10nM) induce la internalización del OxTR.

Los resultados obtenidos indican la formación de un heterodímero OxTR/5-HT1AR y sugieren que existe una regulación alostérica positiva en la interacción receptor-receptor, por lo tanto este heteroreceptor podría constituir una diana terapéutica para trastornos de ansiedad y depresión.

**Palabras claves:** Oxitocina, Serotonina, Receptor de oxitocina, Receptor de serotonina, Interacción receptor-receptor, Heteroreceptor, Regulación alostérica, Ansiedad.

## ABSTRACT

Anxiety and depression disorders represent the mental pathologies of higher prevalence in the population making it a serious public health problem worldwide. It has now been reported that both homodimer and heterodimer formation and allosteric regulation occurring among the protomers involved in receptor-receptor interactions represent important therapeutic targets for the treatment of mental illness.

The present investigation was based on demonstrating the physical interaction between the oxytocin receptor (OxTR) and the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor (5-HT<sub>1A</sub>R). The results show the expression of OxTR-GFP and 5-HT<sub>1A</sub>R-YFP receptors in the cytoplasmic membrane of HeLa cells. In addition, it is demonstrated through a technique with the biophysical basis that these receptors colocalize in the discrete zones of the cell membrane as well, the treatment of HeLa cells that coexpress both receptors with a specific agency of 5-HT<sub>1A</sub>R (8-OH- DPAT, 10nM) induce the internalization of OxTR.

The results indicate the formation of an OxTR / 5-HT<sub>1A</sub>R heterodimer and suggest that there is a positive regulation in the receptor-receptor interaction, therefore this heteroreceptor may constitute a therapeutic target for anxiety and depression disorders.

**Key words:** Oxytocin, Serotonin, Oxytocin receptor, Serotonin receptor, Receptor-receptor interaction, Heteroreceptor, Allosteric regulation, Anxiety

## INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud estima que cada año más de 300 millones de personas a nivel mundial experimentan episodios de ansiedad, y que entre el 10-15% de la población mundial ha experimentado algún tipo de trastornos de ansiedad durante su vida (Wittchen et al., 2011). Esta patología se ha convertido en un serio problema a nivel mundial, por lo que se ha hecho necesario explorar nuevas estrategias terapéuticas.

En este sentido, los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) representan una diana terapéutica accesible y cuya función juega un papel clave en la comunicación celular. Por ello más del 50% de los medicamentos que actualmente se comercializan o están en fase de investigación están dirigidos a estas proteínas.

Actualmente, es aceptada la teoría de que los GPCRs pueden formar homodímeros, heterodímeros y mosaicos de interacciones (interacción entre más de dos receptores) en las superficies celulares. Por otro parte, se sabe que puede existir regulación alostérica entre los protómeros implicados en la formación de estas complejas estructuras. Sin duda, el estudio de la comunicación celular a través de los GPCRs abre una nueva forma de comprender la fisiología y fisiopatología de las enfermedades mentales.

El neuropéptido oxitocina se ha descrito que juega un papel crítico en la regulación de las alteraciones del comportamiento. Al parecer el mecanismo implicado en el efecto ansiolítico de la oxitocina podría ser más complejo de lo que se ha descrito hasta la fecha, involucrando la interacción física con otros sistemas de receptores como el serotoninérgico y en especial el sistema 5-HT1A.

# **CAPITULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN**

Formación del heteroreceptor oxitocina-serotonina 5-HT1A: Relevancia de la interacción receptor-receptor en el tratamiento de trastornos de ansiedad.

### **1.2 JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades psiquiátricas y trastornos de la conducta representan un importante problema de Salud Pública. Se estima que cada año más de 300 millones de personas en el mundo sufren algún trastorno de ansiedad y depresión. Según la Organización Mundial de la Salud, entre los años 1990 y 2013, el número de personas con ansiedad y depresión se incrementó en un 50%, llegando alrededor de 615 millones de personas afectadas, una cifra cercana al 10% de la población mundial (Abellan et al., 2004).

La ansiedad adaptativa o no patológica es fundamental para el manejo normal de ciertas situaciones cotidianas que generan estrés, sin embargo cuando los mecanismos fisiológicos no responden de manera adecuada o el estímulo supera la capacidad de adaptación del individuo, la ansiedad se convierte en patológica. Los trastornos de la ansiedad producen un malestar significativo que se manifiesta a través de diversos síntomas físicos, psicológicos y conductuales que ocasionan el deterioro de la salud de la persona. La depresión suele ser una de las patologías comórbidas a los trastornos de ansiedad.

Se ha descrito que varias regiones del cerebro tales como la amígdala, el hipotálamo y el núcleo accumbens están involucradas en la modulación de la fisiología y fisiopatología de la ansiedad (Ehrlich et al., 2009). La información sensorial que procede del medio ambiente es procesada por la amígdala lateral y baso lateral y transmitida al núcleo accumbens y al núcleo amigdalino centro medial donde

ocurren una serie de respuestas hormonales y autonómicas como respuesta fisiológica al estímulo sensorial (Koch et al., 2015).

Numerosos estudios han demostrado que la oxitocina desempeña un papel ansiolítico (Neumann, 2008), así mismo se ha sugerido que el efecto ansiolítico regulado por oxitocina resulta complejo y que puede involucrar otros sistemas de neurotransmisores, tales como, el dopaminérgico y el serotoninérgico. Respecto a este último, se ha demostrado que el sistema de serotonina 5-HT, y en especial el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, juega un papel crítico en la etiología y el tratamiento de las enfermedades mentales (Dawson & Watson, 2009; Harvey, Naciti, Brand, & Stein, 2004; Savitz, Lucki, & Drevets, 2009).

La oxitocina y la serotonina realizan su señalización celular a través de los GPCRs. Estos receptores representan la mayor familia de receptores de membrana involucrados en la señalización celular, por lo que desempeñan una importante función en la comunicación celular (Fuxe et al., 2007). Fuxe y colaboradores demostraron *in vitro* y *ex vivo* que los GPCRs pueden encontrarse en la superficie celular en forma de monómeros, dímeros (homodímeros y heterodímeros) e incluso son capaces de establecer mosaicos de interacciones (interacción entre más de dos receptores). Se ha subrayado que la existencia de heterómeros y la regulación alostérica que tiene lugar entre los protómeros involucrados en estas interacciones receptor-receptor incrementan notablemente la diversidad de reconocimiento, el tráfico y la señalización de los GPCR. Por lo tanto, es de vital importancia profundizar en el conocimiento del papel fisiológico de las interacciones físicas receptor-receptor en los heterómeros y los mecanismos de regulación alostérica en estas complejas estructuras, los cuales tendrían un impacto en la biomedicina y podrían conducir a nuevas propuestas para el tratamiento de enfermedades en todos los campos de la medicina.

Tomando en cuenta la relevancia de los aspectos anteriormente descritos, se plantean los siguientes puntos: i) los OxTR y los 5-HT<sub>1A</sub>R se coexpresan en áreas cerebrales que regulan el miedo y la ansiedad (Jimenez, Young, Rio, LaPrairie, & Gonzalez-Mariscal, 2015; Stein, Davidowa, & Albrecht, 2000); ii) la activación serotoninérgica incrementa la síntesis de oxitocina (OxT); iii) la existencia de

heterómeros en el cerebro abre un nuevo campo para una mejor comprensión de la neurofisiología y neuropatología de los trastornos mentales, a partir de estas afirmaciones surgen las siguientes preguntas científicas:

- ¿Es posible que el OxTR forme un heterómero con el 5-HT1AR?
- ¿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 OxTR/5-HT1AR y que este heterodímero se pueda convertir en un importante blanco para el diseño de nuevos fármacos?
- ¿Es posible utilizar la modulación alostérica que podría ocurrir en el heterodímero OxTR/5-HT1AR como estrategia terapéutica para el tratamiento de los trastornos de ansiedad?

Por todo ello, la posible interacción receptor-receptor dentro de un heteroreceptor OxTR/5-HT1AR y la naturaleza de la regulación alostérica de los protómeros implicados es el tema principal de la presente propuesta.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

**Describir la formación de un heteroreceptor OxTR/5-HT1AR, y establecer la naturaleza de la regulación alostérica de la interacción receptor-receptor.**

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.3.2.1 Comprobar la correcta expresión de los receptores OxTR y 5-HT1AR en células HeLa.

1.3.2.2 Describir *in vitro* la formación del heterómero OxTR/5-HT1AR.

1.3.2.3 Elucidar la naturaleza de la modulación alostérica resultado de la interacción receptor-receptor en el heterómero OxTR/5-HT1AR.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

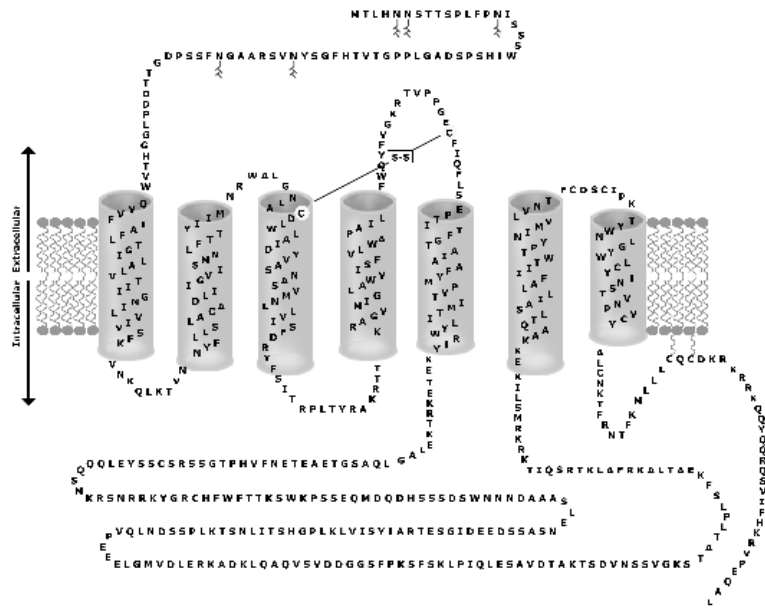
#### 2.1 ANTECEDENTE DE LA INVESTIGACIÓN

Los GPCRs representan la mayor superfamilia de receptores de membrana involucrados en la señalización celular (**Figura 1**), los cuales son activados por un amplio número de ligandos endógenos y exógenos, cuya variedad y diversidad química es excepcional. De esta forma los GPCRs regulan un gran número de procesos fisiológicos tales como: el metabolismo celular, la secreción, la diferenciación y crecimiento celular, la respuesta inflamatoria e inmunitaria, la neurotransmisión entre otras. Dado su localización en la superficie de la membrana celular, la variedad de procesos fisiológicos en los que participan y su implicación en diversas patologías, los GPCRs son considerados importantes blancos terapéuticos para el diseño de fármacos. De hecho, cerca del 50% de los fármacos que actualmente se comercializan o están en fase de experimentación, están dirigidos a estos receptores (agonistas o antagonistas). Por lo tanto, podemos deducir que el conocimiento de los mecanismos moleculares de la señalización celular a través de los GPCRs tendrá un impacto en la medicina y permitirá desarrollar fármacos que representen nuevas estrategias terapéuticas en prácticamente todos los campos de la biomedicina.

La señalización celular a través de los GPCRs es más compleja de lo que se pensó en un inicio, novedosos trabajos de Fuxe y colaboradores demostraron que estos receptores no solo se pueden encontrar en forma de monómeros en las superficies celulares, sino que también son capaces de formar dímeros (homodímeros y heterodímeros) e incluso establecer mosaicos de interacciones (interacción entre más de dos receptores) (Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014) (**Figura 2**). Se ha descrito que la existencia de regulación alostérica en las interacciones receptor-receptor incrementan notablemente la diversidad de reconocimiento, el tráfico y la señalización de los GPCRs (Fuxe et al., 2012; Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014). Investigaciones recientes sugieren que la formación de dímeros pueden ocurrir desde la síntesis de los GPCRs en el



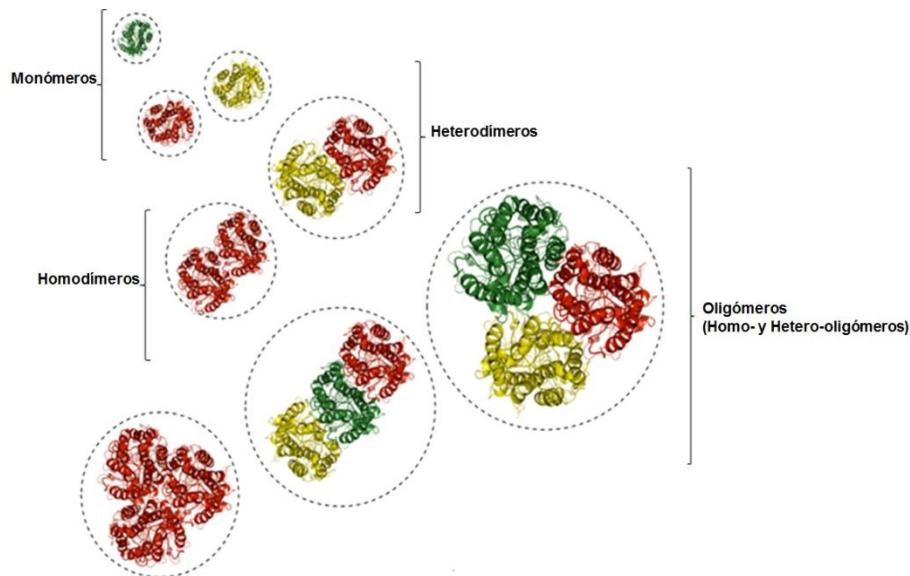
retículo endoplasmático, y plantean que esta interacción tiene un importante papel en el tráfico de los GPCRs hacia la membrana celular (Van Craenenbroeck et al., 2011).



**Figura 1. Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria del receptor muscarínico M3 humano (GPCR de la familia A).** Esta familia de receptores contiene alrededor del 90% de todos los GPCRs e incluye entre otros a los receptores aminérgicos (serotonina, muscarínico, dopamina, histamina, adrenérgico), receptores peptídicos (oxitocina, vasopresina, colecistocinina) y rodopsina. La homología entre los receptores de la familia A es baja y se limita a diferentes motivos altamente conservados e importantes para la estructura-función de los receptores como el DRY (Asp-Arg-Tyr), localizado en la parte citoplasmática del dominio transmembrana III e implicado en la activación de la proteína G (Probst, Snyder, Schuster, Brosius, & Sealfon, 1992) y el NPxxY, localizado en la parte citoplasmática del dominio transmembrana VII e involucrado en la conformación del receptor para garantizar una correcta señalización celular y formación de complejos multiproteicos intracelulares (Borrotto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2011). Otra de las características estructurales de los GPCRs es la presencia de residuos de cisteínas localizadas en los lazos extracelulares para establecer puentes disulfuro cruciales que mantienen la estructura de la proteína. Además, estos receptores pueden sufrir unas series de modificaciones post-transcripcionales como la N-glicosilación en el extremo N-terminal y la palmitoilación en el extremo C-terminal. Figura adaptada de Borrotto-Escuela y colaboradores (Borrotto-Escuela, Correia, et al., 2011).

Otros trabajos asocian alteraciones específicas en las interacciones receptor-receptor a mecanismos patogénicos que conducen a trastornos neuropsiquiátricos. Por lo tanto, avanzar en el conocimiento del papel fisiológico de la interacción física receptor-receptor y los mecanismos de regulación alostérica que tienen lugar en los heterómeros en el cerebro, sin duda, tendrá relevancia a la hora de establecerlos

como blanco para el tratamiento de las enfermedades mentales (Fuxe, Borroto-Escuela, Fisone, Agnati, & Tanganelli, 2014; Fuxe et al., 2012).



**Figura 2. Una nueva visión en la estructura y en el estudio de los GPCRs.** Evidencias experimentales han demostrado que los GPCRs no sólo se pueden expresar en las superficies celulares en forma de monómeros o entidades únicas, sino que también son capaces de interactuar con otros protómeros para formar homodímeros y heterodímeros (Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014). Recientemente, se ha confirmado que los GPCR tienen la capacidad de formar oligómeros más de dos protómeros, por ejemplo, oligómeros de mGluR5-A2AR-D2R (Cabello et al., 2009)). Figura adaptada de Fuxe y colaboradores (Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014).

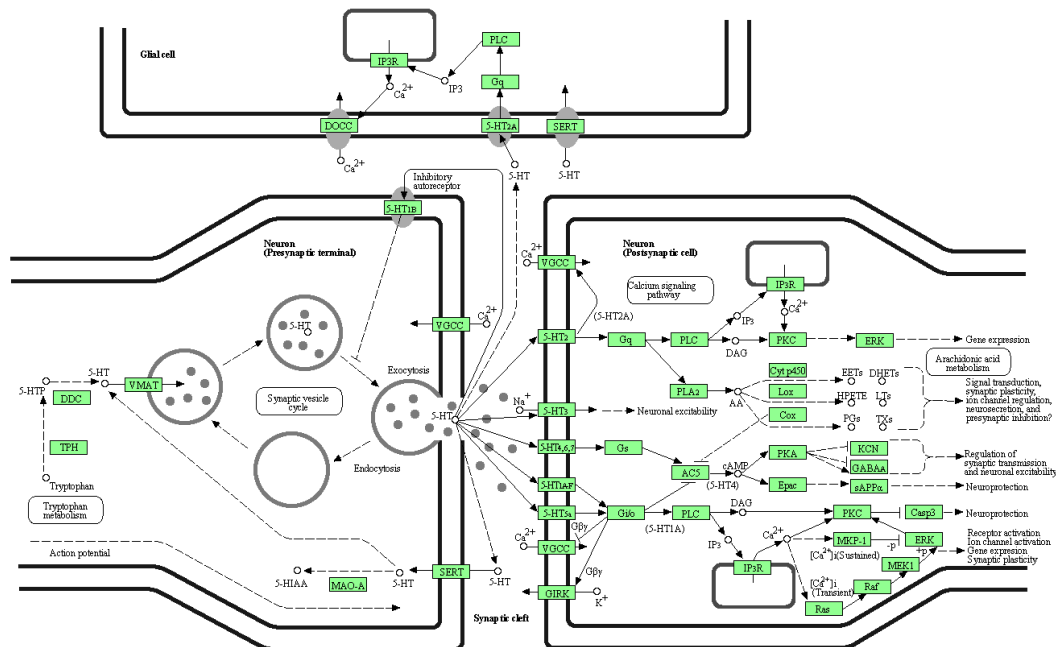
La ansiedad no patológica es una respuesta fisiológica ante estímulos sensoriales tanto endógenos como exógenos que el individuo reconoce como dañinos y que pueden afectar su integridad. Sin embargo, cuando falla esta respuesta adaptativa o el estímulo supera cierto umbral, la ansiedad se convierte en patológica. Esta enfermedad mental se manifiesta a través de diversos síntomas físicos, psicológicos y conductuales que deterioran significativamente la salud del individuo.

Varias regiones del cerebro tales como la amígdala, el hipotálamo, núcleo rafe y el núcleo accumbens están involucradas en la modulación de esta respuesta (Pagani et al., 2015). La amígdala lateral y baso lateral, reguladas por el cortisol, la norepinefrina y otros neurotransmisores, juegan papel significativo en el procesamiento de la información sensorial procedente del tálamo y la corteza cerebral. Esta información se transmite al núcleo accumbens y al núcleo amigdalino centro medial donde las respuestas hormonales y autonómicas se implementan para



ansiedad y un aumento en el nivel de corticosterona (Amico, Mantella, Vollmer, & Li, 2004). Por el contrario, la sobreexpresión de OxTR en la amígdala de ratas reduce la ansiedad (Bosch OJ, 2006). Al parecer los efectos ansiolíticos de la oxitocina implican la activación cascada de señalización de Raf, MAPK y ERK1/2 (Blume et al., 2008; Jurek et al., 2012) y el reclutamiento de neuronas GABA dentro del núcleo central de la amígdala que inhiben la actividad ansiogénica (Huber, Veinante, & Stoop, 2005) (**Figura 3**). Sin duda, es necesario continuar investigando el papel de la oxitocina en la regulación de la ansiedad, debido a la complejidad de su función que incluye la interacción con otros sistemas de neurotransmisores, tales como, el dopaminérgico y el serotoninérgico.

Se conoce que el sistema 5-HT, y en especial el receptor serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, desempeña un papel crítico en la etiología y tratamiento de enfermedades mentales (Dawson & Watson, 2009; Harvey et al., 2004; Savitz et al., 2009). Además se ha descrito que la serotonina se une a su receptor 5-HT<sub>1A</sub>R conduciendo a la activación la proteína G<sub>i/o</sub> que inhibe la vía de la adenil ciclasa (AC)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC)-proteína quinasa A (PKA) (Stroth et al., 2015) (**Figura 4**).



**Figura 4. Cascada de señalización celular del sistema serotoninérgico.**

La depleción del sistema serotoninérgico, mejora la actividad glutamatérgica en el núcleo lateral de la amígdala lo que conduce a potenciar el miedo y la ansiedad (Tran, Lasher, Young, & Keele, 2013). Por el contrario, la administración de un agonista parcial de 5-HT<sub>1A</sub>R reduce el miedo en ratones (Risbrough, Brodtkin, & Geyer, 2003), y se ha sugerido que el sistema 5-HT en hipocampo y amígdala regula el miedo y la ansiedad (Almada, Borelli, Albrechet-Souza, & Brandao, 2009). Así mismo la activación de 5-HT<sub>1A</sub>R en el hipocampo dorsal (Li et al., 2006; Stiedl, Misane, Spiess, & Ogren, 2000), zona dorsal periacueductal (Broiz, Oliveira, & Brandao, 2008) y la amígdala (Li et al., 2006) reduce el miedo en animales de experimentación.

Resulta interesante que los OxTR y 5-HT<sub>1A</sub>R estén ampliamente expresados en regiones del cerebro relacionadas con la regulación del miedo y la ansiedad, tales como, la amígdala (Campbell-Smith, Holmes, Lingawi, Panayi, & Westbrook, 2015; Li et al., 2006), el hipocampo (Cohen et al., 2010; Li et al., 2006), el núcleo accumbens (Dolen, Darvishzadeh, Huang, & Malenka, 2013; Ma et al., 2005) y el núcleo rafe (Kasahara et al., 2015; Ma et al., 2005). Sin embargo, se ha sugerido que la expresión del OxTR en el núcleo rafe no está relacionada con la regulación de la ansiedad (Pagani et al., 2015). Por otra parte, varios estudios demuestran una estrecha relación entre el sistema de OxT y 5HT<sub>1A</sub>. Thompson y colaboradores en el año 2007 encontraron que la activación serotoninérgica incrementa la síntesis de oxitocina (Thompson, Callaghan, Hunt, Cornish, & McGregor, 2007), sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito interacción receptor-receptor entre OxTR y 5-HT<sub>1A</sub>R.

Por lo antes expuesto se plantea la hipótesis que el papel ansiolítico y antidepresivo mediado por la oxitocina, en parte se debe a la formación del heterómero OxTR/5-HT<sub>1A</sub>R y que la activación del 5-HT<sub>1A</sub>R modula alostéricamente de forma positiva al OxTR por lo que incrementa su señalización celular y por lo tanto, mejora el papel ansiolítico del neuropéptido en regiones del cerebro claves implicadas en la regulación del miedo, la ansiedad y la depresión. Creemos que los resultados de este trabajo podrían ser relevantes para establecer la

existencia del heterómero OxTR/5-HT1AR y su regulación alostérica como blanco para el diseño de fármacos útiles en el tratamiento de los trastornos de ansiedad.

## **2.2 HIPÓTESIS**

### **2.2.1 FORMACIÓN DEL HETERORECEPTOR OxTR/ 5-HT1AR.**

#### **Hipótesis Nula:**

No existe la formación de un heteroreceptor OxTR/5-HT1AR.

#### **Hipótesis Alternativa:**

Existe la formación de un heteroreceptor OxTR/5-HT1AR.

### **2.2.2 LA ACTIVACIÓN SEROTONINÉRGICA DENTRO DEL HETERÓMERO OxTR/5-HT1AR CONDUCE A LA INTERNALIZACIÓN DEL OxTR.**

#### **Hipótesis Nula:**

La activación de 5-HT1AR no induce internalización de OxTR.

#### **Hipótesis Alternativa:**

La activación de 5-HT1AR induce internalización de OxTR.

## **2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.**

### **Formación del heteroreceptor OxTR/5-HT1AR,**

- Secuenciación plasmídica.
- Transformación en células de *E coli* DH5 $\alpha$ .
- Purificación y cuantificación del ADN plasmídico.
- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.
- Cultivo celular y crio-conservación.
- Transfección de plásmidos en células HeLa.
- Ensayos de colocalización.

### **Regulación alostérica en la interacción receptor-receptor.**

- Ensayos de señalización celular (internalización).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **3.1.1 SECUENCIACIÓN PLASMÍDICA.**

Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP fueron donados por el Dr. Dasiel Oscar Borroto-Escuela del Departamento de Neurociencia del Instituto Karolinska, Suecia. Para comprobar que los vectores a utilizar no contenían inserciones, deleciones, sustituciones o corrimiento del marco de lectura, se procedió a la secuenciación de las regiones que contienen las secuencias de los receptores y los insertos fluorescentes. Esta secuenciación se la realizó a través de un servicio externo (Macrogen, Corea del Sur), el cual utiliza un secuenciador “3730x1 DNA analyzer” y el cebador CMV-F (5´-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3´). Se enviaron 50 µl del ADN plasmídico con una concentración de 100 ng/ µl. Los resultados de las secuenciaciones se compararon con datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

##### **3.1.2 TRANSFORMACIÓN EN ESCHERICHIA COLI DH5α**

Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP que contienen las secuencias que codifican para los receptores de interés fueron transformados en *E. coli* DH5α según las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA). En un vial de 1.5 ml se mezclaron 50 µl de *E. coli* DH5α y 1 µl de ADN plasmídico (10 ng) y se incubó por 30 minutos en hielo. Para la internalización de los plásmidos se realizó un choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguido de una incubación de 3 minutos en hielo. Para la expresión del gen de selección, se adicionaron 250 µl de medio Luria Bertani (LB) (10 g de NaCl, 10 g de peptona bacteriológica y 5 g de extracto de levadura) y se incubó en agitación (300 rpm) a 37°C por 1 hora. En placas Petri con agar LB que contenían el antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina, ambos a una concentración de 100 µg/ml) se inocularon 200 µl del cultivo y con un asa de siembra de Drigalski se

extendió el inóculo sobre la superficie del agar hasta su completa distribución. Las placas fueron incubadas invertidas a 37°C por 24 horas.

### 3.1.3 PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con los plásmidos se inoculó en 5 ml de medio LB con 100  $\mu$ g/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 precultivo en 250 ml de medio LB con 100  $\mu$ g/ml del antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina) y se incubó toda la noche en agitación (300 rpm) a 37°C. Se controló que la absorbancia del cultivo bacteriano a 600 nm no superase la densidad óptica de 0.6. El pellet resultante de una centrifugación a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos del cultivo bacteriano fue completamente resuspendido en tampón de homogeneización (25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM glucosa, 100  $\mu$ g/ml de RNAasa y 1% lisozima) utilizando un agitador (Labnet, USA) y se incubó 30 minutos en hielo. Después se añadieron 5 ml de tampón de lisis (0.2 M NaOH y 1% de SDS), la mezcla se incubó por 5 minutos en hielo sin agitación. Para detener la hidrólisis promovida por la base, se agregaron 5 ml de tampón de neutralización (3M NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, pH=4.8) y se mezcló de forma suave hasta la separación del moco de la fase acuosa e inmediatamente se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los plásmidos presentes en el sobrenadante se precipitaron con isopropanol (0.7 volumen de isopropanol) y fueron centrifugados a 16590 rpm por 1 hora a 4°C. El pellet que se obtuvo se lavó con 10 ml de etanol al 70% frío y recién preparado. Una vez que se decantó el sobrenadante, los restos de etanol se eliminaron por evaporación en una cámara extractora de gases. El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer TE1X (10 mM tris-HCl, pH=8.0, 0.01 mM EDTA).

Para obtener un ADN plasmídico de calidad óptima para su transfección en las células HeLa se procedió a su purificación utilizando un kit comercial (PureLink Quick plasmid miniprep kit) según recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA).



Para evaluar la pureza y cantidad del ADN plasmídico obtenido se determinó la absorbancia de las muestras a 230, 260 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 evaluó mediante una electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa. Específicamente, 1 µl de ADN plasmídico (100 ng) se mezclaron con 1 µl buffer de carga de ADN 6x (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 (Invitrogen, USA). Como marcador de peso molecular se utilizó el High DNA mass leader 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 foto documentación ChemiDoc™MMP (Bio-Rad, USA).

#### **3.1.5 CULTIVO CELULAR Y CRIOCONSERVACIÓN**

Las células HeLa (ATCC®CCL-2™) donados 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 cm<sup>2</sup> en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda. Las células HeLa se crioconservaron en nitrógeno líquido en medio de criocongelación (90% suero fetal bovino (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. En todos los experimentos las células se cultivaron durante 24 horas antes de la transfección del ADN plasmídico. Las células

se transfectaron con los plásmidos del OxTR-GFP y el 5-HT1AR-YFP empleando el reactivo Lipofectamina™2000 según las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA). En 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. Básicamente, 1-2 µg de ADN se resuspendieron en 50 µl de medio DMEM sin complementos y fueron mezclados con 50 µl de medio DMEM sin complementos que contenían 2-4 µl de Lipofectamina™2000 e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Se mezcló el ADN sobre la lipofectamina y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. La mezcla se añadió a las células en crecimiento y se incubaron por 48 horas. Al cabo de este tiempo se comprobó la expresión de los receptores marcados con las proteínas fluorescentes.

### **3.1.7 ENSAYOS DE COLOCALIZACIÓN**

Las células HeLa se cotransfectaron con los plásmidos de OxTR-GFP y el 5-HT1AR-YFP empleando el reactivo Lipofectamina™2000 según lo descrito anteriormente. Al cabo de 48 horas de incubación las células se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS1X) y se fijaron con 1 ml paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS1X, secados y montados sobre portaobjetos. En ocasiones se realizó la tinción de los núcleos utilizando un medio de montaje con 4',6 diamino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, USA). Para verificar la expresión de los receptores marcados con proteínas fluorescentes OxTR-GFP y 5-HT1AR-YFP, las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania).

### **3.1.8 ENSAYOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR**

Las células HeLa se cultivaron sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en las condiciones descritas anteriormente durante 24 horas antes de la transfección con el ADN plasmídico. Se realizó la transfección de las células con los plásmidos de OxTR-GFP y 5-HT1AR-YFP utilizando el reactivo Lipofectamina™2000, según lo

recomendado por la casa comercial (Invitrogen, USA). Las células se incubaron por 48 horas antes de realizar los experimentos de internalización. Las células se lavaron 3 veces con PBS1X y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente con 8-OH-DPAT (10nM), un agonista específico de los receptores 5-HT1A. Los cubreobjetos fueron extensamente lavados con PBS1X y se fijaron las células con 1 ml paraformaldehído (PFA 4%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS1X, secados y montados sobre portaobjetos. Para evaluar la internalización de OxTR-GFP las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania). Como control se utilizaron células HeLa transfectadas solo con OxTR-GFP.

### **3.2 ESTADÍSTICA Y PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Los resultados se presentan a través de imágenes de microscopia de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemania). Todas las muestras fueron observadas con el microscopio de inmersión utilizando una magnificación total de 630X y los filtros DAPI (489-513 nm), GFP (475-509 nm) y el filtro YFP (514-527 nm). El número de muestras (n) en cada condición experimental se indica en los pies de figura.

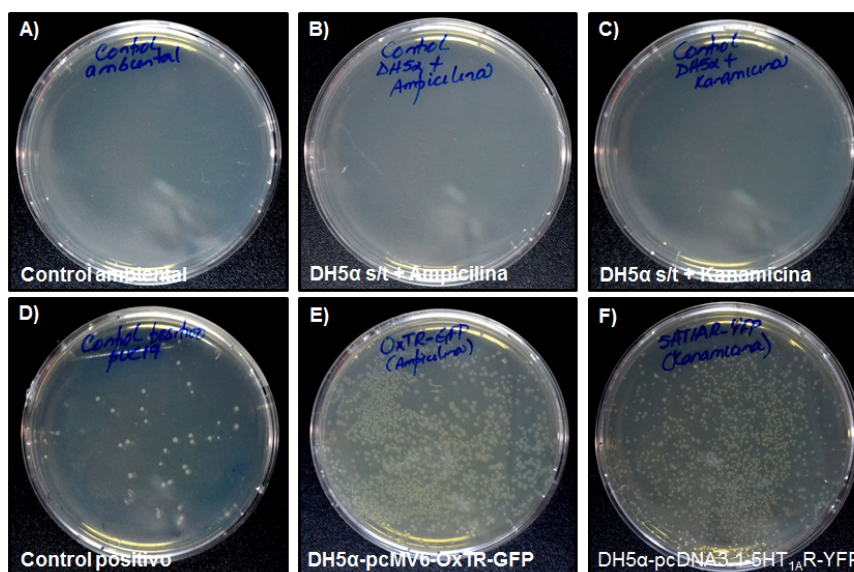
## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 RESULTADOS

##### 4.1.1 OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO A PARTIR DE LA TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* DH5 $\alpha$ .

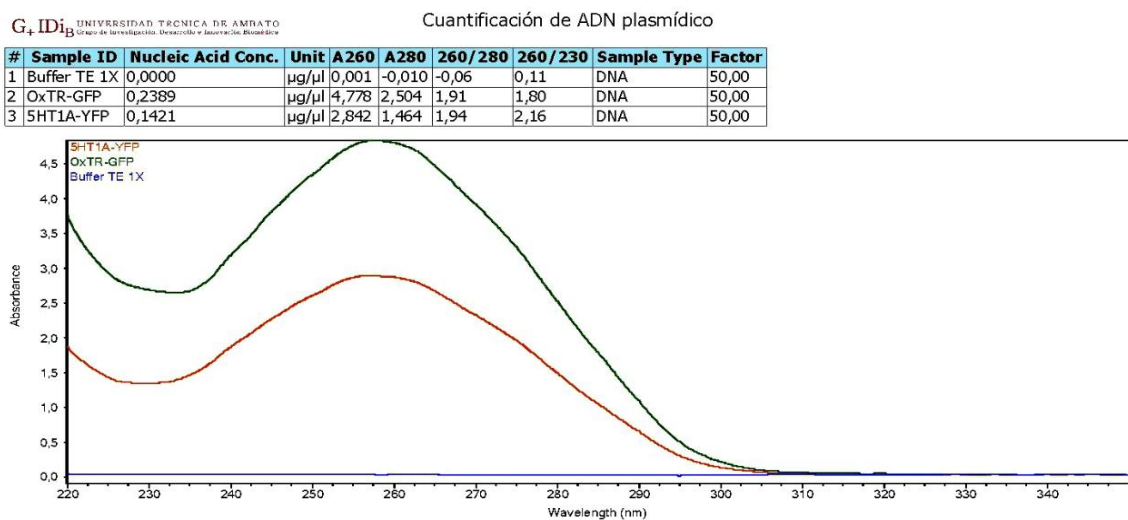
Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP fueron donados por el Dr. Dasiel Oscar Borroto-Escuela del Departamento de Neurociencia del Instituto Karolinska, Suecia. Con el propósito de obtener una cantidad de ADN necesaria para todos experimentos se realizó una purificación de los ADN plasmídicos según se describe en la sección de materiales y métodos. Por otra parte, la calidad del ADN plasmídico que garantice una alta eficiencia en la transfección de las células HeLa esta se obtuvo a través de un kit comercial. La figura muestra los resultados obtenidos en un experimento de transformación bacteriana (**Figura 5**).



**Figura 5. Obtención de ADN plasmídico a partir de la transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ .** Transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP. A) Control de contaminación ambiental (placa sin células DH5 $\alpha$  expuesta/abierta durante 1 minutos en la incubadora de cultivo bacteriano). B) Control de resistencia de las *E. coli* DH5 $\alpha$  a ampicilina (100  $\mu$ g/ml) en células sin transformar (s/t). C) Control de resistencia de las *E. coli* DH5 $\alpha$  a kanamicina (100  $\mu$ g/ml) en células sin transformar (s/t). D) Como control positivo se transformaron las *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pUC19. E) Colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  resistentes a la ampicilina transformadas con el plásmido pcMV6-OxTR-GFP. F) Colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  resistentes a la kanamicina transformadas con el plásmido pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3).

Los resultados obtenidos en las transformaciones de *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pUC19 demuestran que todos los pasos del protocolo de transformación están correctamente estandarizados, esto garantizó lograr un gran número de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1A-R-YFP. Los resultados indican que las *E. coli* DH5 $\alpha$  son sensibles a ampicilina y kanamicina, al menos a las concentraciones utilizadas en los experimentos, por lo que se espera que las colonias obtenidas en los diferentes ensayos corresponden a la resistencia adquirida por las transformaciones con los plásmidos. Por último, el control de contaminación ambiental en ninguno de los tres experimentos independientes realizados mostró crecimiento bacteriano.

Posteriormente, a partir de las colonias transformadas y de cultivos bacterianos en Erlenmeyer se realizó la purificación del ADN plasmídico utilizando un kit comercial donde se siguieron las recomendaciones del fabricante. La figura 6 muestra una representación esquemática de una réplica experimental (**Figura 6**).



**Figura 6. Determinación de la cantidad y pureza del ADN plasmídico obtenido.** Se muestra la cantidad y pureza del ADN plasmídico. La imagen es representativa de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3).

Los resultados obtenidos muestran que el ADN purificado es de buena calidad. Los valores de la relación 260/280 indican que no existe contaminación con proteínas. De la misma forma, los valores de la relación 260/230 sugieren que no hay presencia de los solventes orgánicos utilizados en la purificación presentes en el kit

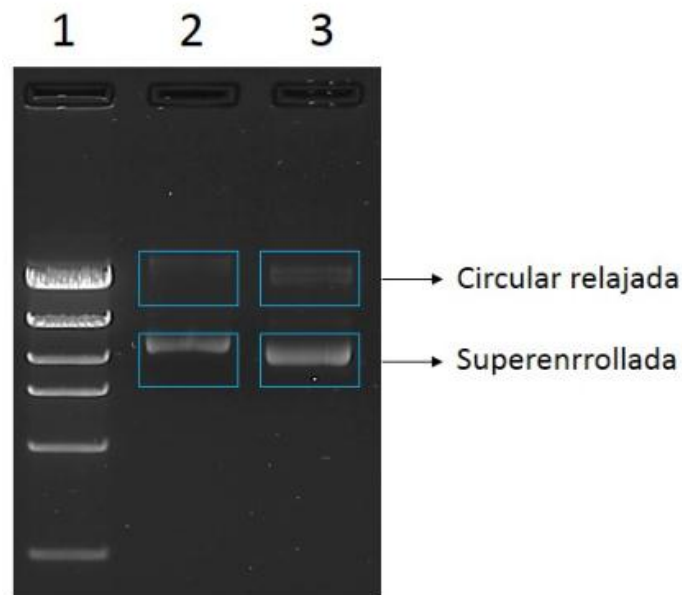
comercial. Sin embargo, el rendimiento logrado es inferior la cantidad referida por el fabricante (30 µg totales de ADN plasmídico). La media obtenida de tres experimentos independientes osciló entre 10-20 µg totales de ADN.

Se conoce que algunos de los parámetros importantes para lograr un alto número de células transfectadas es la pureza y conformación del ADN plasmídico a utilizar. Por ello, el siguiente paso estuvo dirigido a analizar la calidad del ADN plasmídico purificado

mediante

electroforesis de  
geles de agarosa

7).



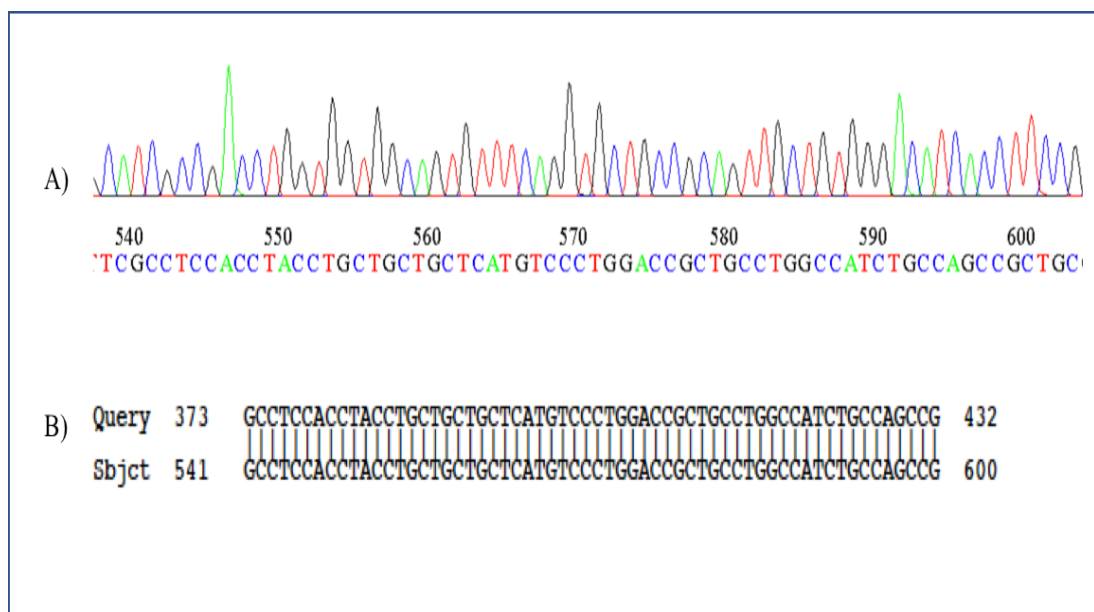
ADN en  
(Figura

**Figura 7. Electroforesis de los ADN plasmídico en gel de agarosa al 1% correspondiente a los vectores pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT<sub>1A</sub>R-YFP.** Se muestran las diferentes conformaciones del ADN plasmídico. Carril 1: Patrón de peso molecular High DNA mass leader (1-10 kb) (Invitrogen, USA). Carril 2: pcMV6-OxTR-GFP. Carril 3: pcDNA3.1-5-HT<sub>1A</sub>R-YFP. La imagen es representativa de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3).

Los resultados que se muestran en la figura 7, hacen referencia a las diferentes conformaciones que podemos encontrar en una corrida electroforética típica de un ADN plasmídico. La banda más intensa que corresponde al ADN en su conformación superenrollada y una de las bandas menos intensa podría

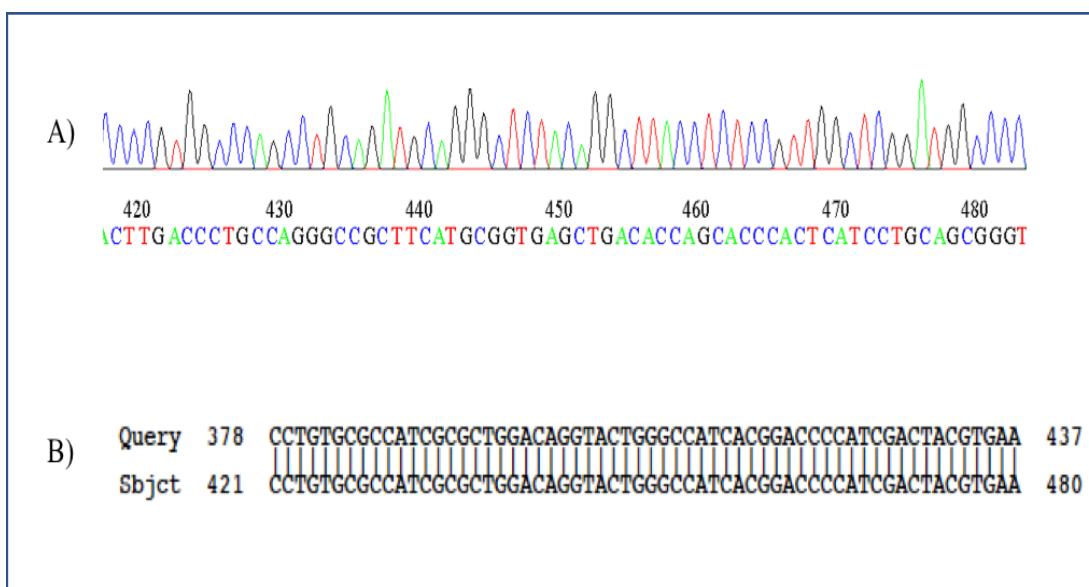
corresponder a la forma circular relajada del ADN plasmídico. En varios de los experimentos realizados se obtuvo una banda débil que podría sugerir que en algunos de los pasos de la purificación plasmídica el ADN se linealizó. No obstante, se consideró que esta pequeña porción de ADN plasmídico linealizado no afectase notablemente el proceso de transfección.

También hemos considerado la necesidad de analizar la secuenciación de los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP que codifican para los receptores de interés, así como las secuencias de las proteínas fluorescentes que marcan a estos receptores. Con ello pretendemos verificar que no contenían inserciones, deleciones, sustituciones o corrimiento del marco de lectura. Adicionalmente, la funcionalidad de las proteínas fluorescentes así como indirectamente su secuencia se comprobó por la emisión de fluorescencia en las células transfectadas con los vectores marcados con dichas proteínas. Para la secuenciación de los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP se utilizó un servicio externo. La Figura 8 y 9 muestran los resultados obtenidos de la



secuenciación de los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP.

**Figura 8. Secuencia de ADN correspondiente al plásmido pcMV6-OxTR-GFP.** A) Fragmento representativo de la secuenciación del OxTR contenida en el plásmido pcMV6-OxTR-GFP. B) Alineamiento entre la secuencia del OxTR contenido en el plásmido pcMV6-OxTR-GFP comparada con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).



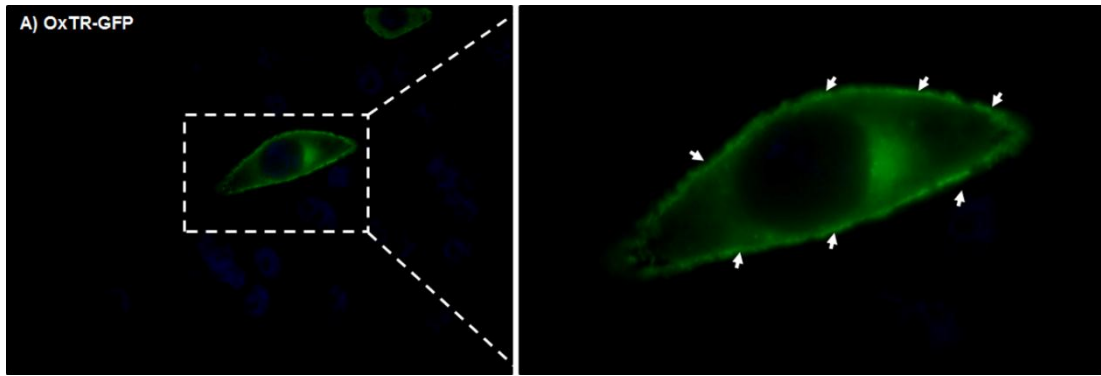
**Figura 9. Secuencia de ADN correspondiente al plásmido pcDNA3.1-5HT1AR-YFP. .**  
A) Fragmento representativo de la secuenciación del 5-HT1AR contenida en el plásmido pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP. B) Alineamiento entre la secuencia del 5-HT1AR contenida en el plásmido pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP comparada con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

Las secuencias obtenidas del servicio externo mostrados en los Anexos I y II. Fueron comparadas con datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA) y los resultados de este alineamiento indican que un 70% para el OxTR y un 55% para el 5-HT1AR de las secuencias de los plásmidos pertenecen a las secuencias nucleotídicas que codifican para los receptores de interés (*Anexos III y IV*). Sin embargo, hay que señalar que la presencia de ARN contaminante dificultó la obtención de mejores resultados. Adicionalmente, por microscopia de fluorescencia se procedió a comprobar la expresión de las proteínas fluorescente que marcan los receptores de interés.

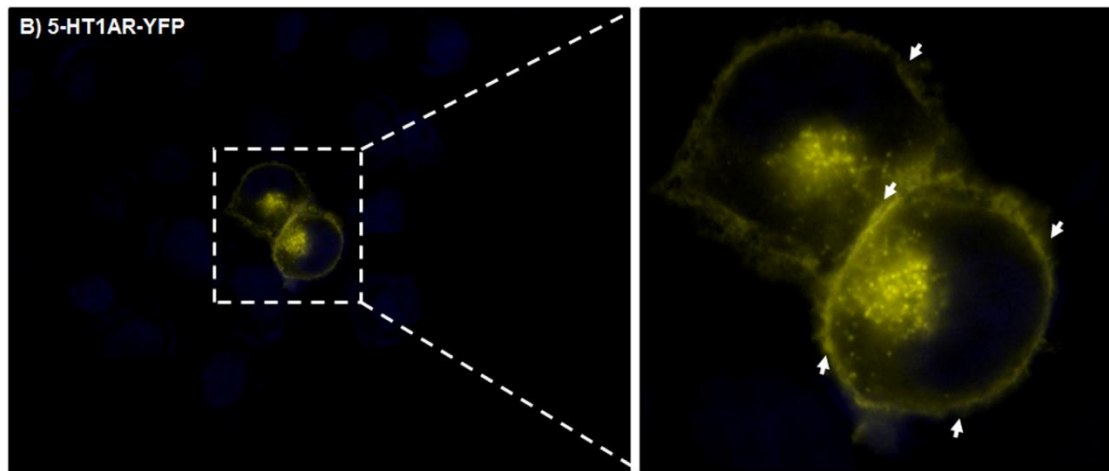
#### **4.1.2 EXPRESIÓN DE OxTR-GFP Y 5HT1AR-YFP EN CÉLULAS HELA.**

Para estandarizar la expresión transciente de los receptores en las células HeLa, estas células se transfectaron con cada plásmido (OxTR-GFP y el 5-HT1AR-YFP) por separado utilizando el reactivo Lipofectamina™2000 siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA) (**Figuras 10 y 11**). Se mantuvo el FBS al 10% durante todo el proceso para evitar un incremento en la muerte celular.





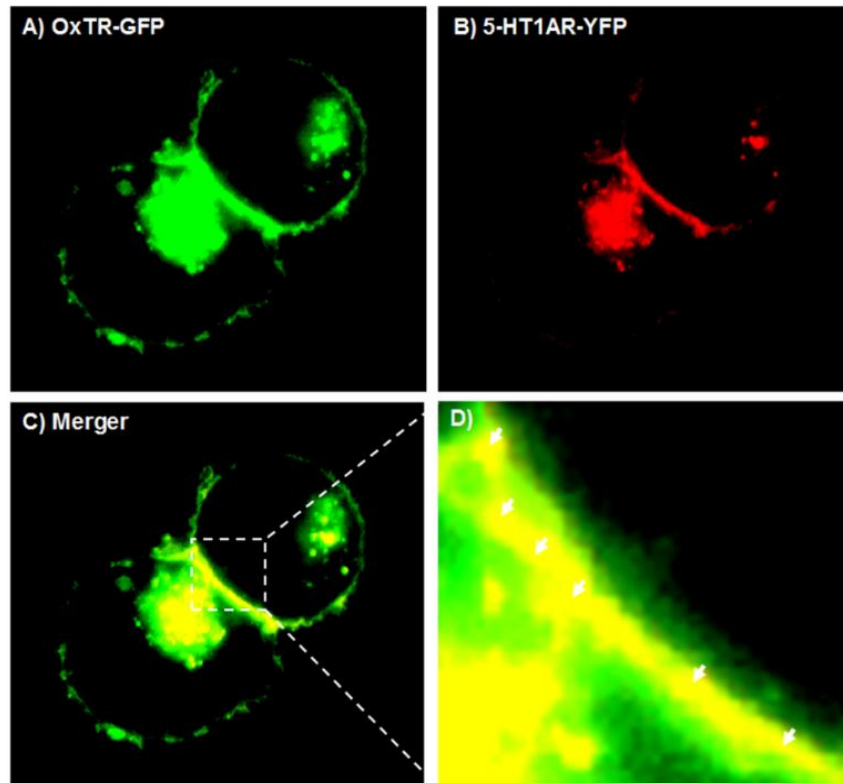
**Figure 10. Expresión de los OxTR marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.** Expresión transiente de los OxTR marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) en la membrana celular. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independientes (n=3). Las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.



**Figure 11. Expresión de los 5-HT1AR marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.** Expresión transiente de los 5-HT1AR marcados con proteínas fluorescentes YFP (amarillo) en la membrana celular. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos independiente (n=3). Las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

#### 4.1.3 ENSAYOS DE COLOCALIZACIÓN Y SEÑALIZACIÓN CELULAR.

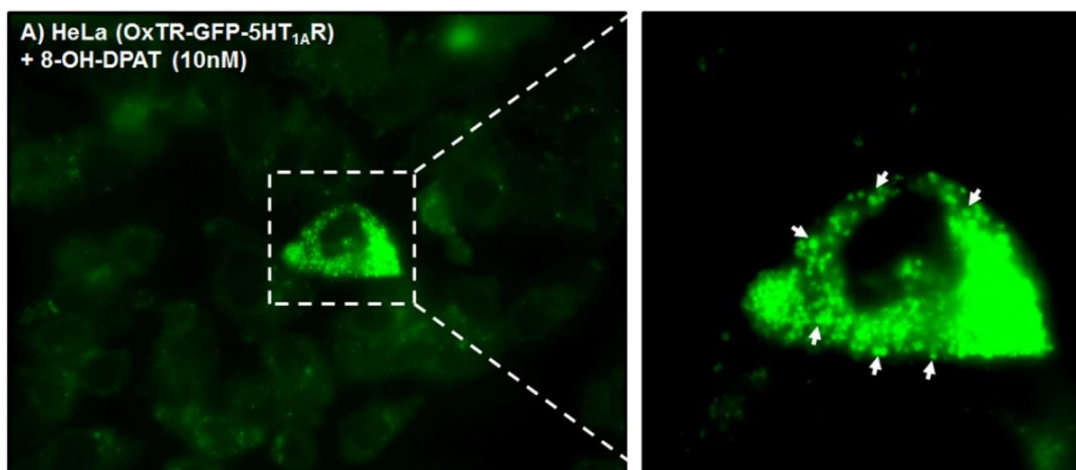
Las células se cotransfectaron con los plásmidos OxTR-GFP y 5-HT1AR-YFP utilizando el reactivo Lipofectamina™2000 siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA) (**Figuras 12**).



**Figura 12. Colocalización de los receptores de oxitocina y los receptores de serotonina 5-HT1A en la superficie de células HeLa.** A). Expresión transiente de los OxTR marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) en células HeLa que co-expresan OxTR-GFP y 5-HT1AR-YFP. B) Expresión transiente de los 5-HT1AR marcados con proteínas fluorescentes YFP (rojo) en células HeLa que co-expresan OxTR-GFP y 5-HT1AR-YFP. C) La formación de zonas de color amarillo indican la colocalización de los OxTR marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) con los 5-HT1AR marcados con proteínas fluorescentes YFP (rojo). D) Magnificación de una imagen donde las flechas indican la colocalización de los receptores en algunas regiones de la membrana citoplasmática de las células HeLa (amarillo). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente (n=3). Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

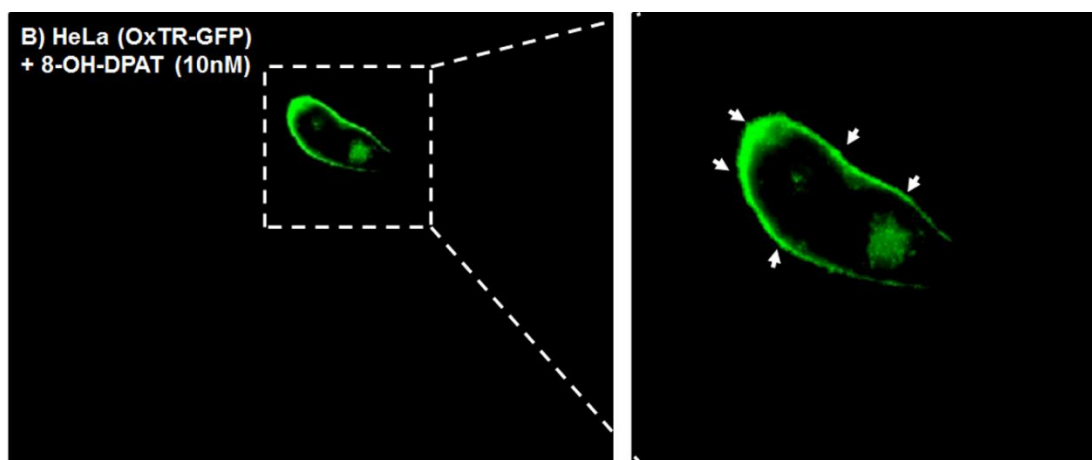
Los resultados obtenidos apuntan en la dirección correcta ya que se obtuvo evidencias biofísicas de la formación de un heteroreceptor entre el OxTR y el 5-HT1AR. Dada la implicación de estos receptores en la modulación de la ansiedad resulta interesante explorar la naturaleza de la posible regulación alostérica que tiene lugar en la interacción proteína-proteína dentro de este heterodímero.

Para ello, células HeLa que co-expresan OxTR y 5-HT1AR fueron incubadas con un agonista específico de 5-HT1AR (**Figura 13**).



**Figura 13. Tratamiento con un agonista específico del receptor serotonina 5-HT1A induce la internalización del receptor de oxitocina.** Células HeLa que co-expresan los OxTR marcados con proteínas fluorescentes GFP y los 5-HT1AR sin marca fluorescente fueron tratadas con 8-OH-DPAT. Las flechas indican la formación de los endosomas de internalización de los OxTR. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes (n=3). Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

Se utilizó, como control células HeLa que expresan solo el OxTR y que fueron tratadas con el agonista específico de 5-HT1AR (**Figura 14**).



**Figura 14. Tratamiento con un agonista específico del receptor serotonina 5-HT1A no induce la internalización del receptor de oxitocina en células HeLa que expresan solo el receptor de oxitocina.** Células HeLa que solo expresan los OxTR marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) fueron tratadas con 8-OH-DPAT. Los OxTR no se internalizan y se mantienen en la membrana celular. 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, los inhibidores de la recaptación de serotonina son uno de los fármacos antidepresivos más prescritos a nivel mundial (Wong, Bymaster, & Engleman, 1995). La mayoría de los ansiolíticos y antidepresivos inhiben la recaptación de serotonina presináptica lo que incrementa en alguna medida la neurotransmisión serotoninérgica a través de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> postsinápticos (Borroto-Escuela et al., 2012; Riad et al., 2004).

Sin embargo, el uso de estas drogas se ha discutido debido a sus numerosos efectos secundarios y la demora de su acción antidepresiva (Fournier et al., 2010; Segraves & Balon, 2014; Taylor, Freemantle, Geddes, & Bhagwagar, 2006). Esto ha llevado a la comunidad científica a explorar nuevas estrategias para el tratamiento de los trastornos de ansiedad y depresión que representan un serio problema de salud pública.

En esta dirección, se ha subrayado que tanto la formación de homodímeros y heterodímeros, como la regulación alostérica que tiene lugar en la interacción receptor-receptor abren una nueva visión para comprender la fisiología y fisiopatología de estos trastornos mentales (Fuxe et al., 2012; Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014; Fuxe et al., 2007; Fuxe et al., 2010). De hecho, en la actualidad los heteroreceptores representan una importante diana terapéutica (Borroto-Escuela et al., 2013; Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014; Fuxe et al., 2010).

Un novedoso estudio muestra que el OxTR es capaz de establecer un heterodímero con el receptor dopamina D<sub>2</sub>, dos neurotransmisores implicados en la modulación de la ansiedad (Romero-Fernandez, Borroto-Escuela, Agnati, & Fuxe, 2013). Este mismo estudio demostró que el neuropéptido a través de una regulación alostérica positiva en la interacción receptor-receptor incrementa la señalización dopaminérgica lo que ha sugerido que podría mejorar el papel ansiolítico mediado por la dopamina (Romero-Fernandez et al., 2013).

Resulta interesante que la administración de 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) eleva los niveles plasmáticos de oxitocina en ratas y que este incremento puede ser bloqueado por un antagonista específico de 5-HT1AR. También, la administración de un agonista específico de 5-HT1AR (8-OH-DPAT), en ratas, se observa una mejora en el comportamiento social similar al obtenido con el tratamiento con MDMA (Thompson et al., 2007). Dado que el incremento de oxitocina inducido por MDMA y 8-OH-DPAT parece estar asociado con los 5-HT1AR y la importancia del OxTR para la fisiopatología de la ansiedad y su tratamiento, en este trabajo hemos explorado si estos receptores pueden formar un heterómero.

En este sentido, los resultados obtenidos muestran las primeras evidencias de la formación del heteroreceptor OxTR/5-HT1AR, por lo que se podría convertir en una novedosa diana para el diseño de nuevos tratamientos de las patologías mentales.

Los trabajos de Fuxe y colaboradores, han demostrado que el heteroreceptor FGFR1/5-HT1A está involucrado en la regulación de la neuroplasticidad del hipocampo de ratas (Borrito-Escuela et al., 2012) y que la administración aguda de FGF-2 y 8-OHDPAT, agonistas de los receptores de FGFR1 y 5-HT1A respectivamente, producen un efecto antidepresivo sinérgico en animales de experimentación (Borrito-Escuela et al., 2012).

Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo podría ser interesante valorar si un cotratamiento con agonistas de OxTR y 5-HT1AR tendría un efecto antidepresivo más efectivo y que actúen más rápidamente que los inhibidores de la recaptación de serotonina utilizados actualmente.

Adicionalmente, en los últimos años se ha discutido sobre el uso de compuestos bivalentes que activen o inhiban a uno de los protómeros dentro de un heteroreceptor y regulen la actividad del otro protómero en función de la regulación alostérica de la interacción receptor-receptor (Tena-Campos et al., 2014). Otro aspecto notorio de este trabajo es que se demuestra que el tratamiento con un agonista específico de 5-HT1AR induce la internalización del OxTR, lo que podría

sugerir que existe una regulación alostérica facilitadora en la interacción receptor-receptor en el heteroreceptor OxTR/5-HT1AR. Por ello, podría resultar interesante explorar la síntesis de compuestos bivalentes que de forma sinérgica mejoren los efectos ansiolíticos y antidepresivos modulados por la señalización individual de oxitocina y serotonina.

Sin duda los hallazgos científicos obtenidos en este trabajo dirigen la atención al heterodímero OxTR/5-HT1AR los cuales podrían convertirse en un importante objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos aplicables en el tratamiento de los trastornos de ansiedad y depresión.

#### **4.3. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS**

##### **4.3.1 FORMACIÓN DEL HETERORECEPTOR DE OxTR/5-HT1AR.**

###### **Hipótesis Alternativa:**

Existe la formación de un heteroreceptor OxTR/5-HT1AR. Se acepta la hipótesis alternativa al obtener evidencias experimentales en el ensayo biofísico donde se observa una colocalización de estos receptores.

###### **Hipótesis Nula:**

No existe la formación de un heteroreceptor OxTR/5-HT1AR se rechaza.

##### **4.1.1 LA ACTIVACIÓN SEROTONINÉRGICA DENTRO DEL HETERÓMERO OxTR/5-HT1A CONDUCE A LA INTERNALIZACIÓN DEL OxTR.**

###### **Hipótesis Alternativa:**

La activación del 5-HT1AR induce internalización de OxTR. Los resultados experimentales muestran que al activar el protómero de serotonina 5-HT1A en el heterodímero OxTR/5-HT1AR este induce la internalización del OxTR, por lo que se acepta la hipótesis alternativa.

###### **Hipótesis Nula:**

La activación de 5-HT1AR no induce internalización de OxTR se rechaza.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1 CONCLUSIONES**

1. Se estandarizó la correcta expresión transciente de los OxTR marcados con GFP y los 5-HT1AR marcados con YFP en la membrana citoplasmática de células HeLa.
2. Se obtuvo evidencias experimentales que indican la formación *in vitro* del heterómero entre los OxTR y los 5-HT1AR.
3. Se obtuvo resultados experimentales que exponen la naturaleza de la regulación alostérica en la interacción receptor-receptor dentro del heterómero OxTR/5-HT1AR.

#### **5.2 RECOMENDACIONES**

1. Emplear otras técnicas como transferencia de energía de fluorescencia de Förster (FRET), transferencia de energía de bioluminiscencia (BRET), co-inmunoprecipitación y los ensayos de proximidad de ligando para corroborar la formación del heteroreceptor OxTR/5-HT1AR.
2. Evaluar la señalización a través de segundos mensajeros para confirmar la naturaleza de la modulación alostérica que tiene lugar en el heterodímero OxTR/5-HT1AR.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abellan, R., Ventura, R., Pichini, S., Remacha, A. F., Pascual, J. A., Pacifici, R., . . . Segura, J. (2004). Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. *J Pharm Biomed Anal*, 35(5), 1169-1177. doi: 10.1016/j.jpba.2004.02.001
- Almada, R. C., Borelli, K. G., Albrechet-Souza, L., & Brandao, M. L. (2009). Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res*, 203(2), 279-287. doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.017
- 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
- 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
- Bosch OJ, Wldherr, M, Nair HP, Hermanth PJ, Young LJ, Neumann ID. (2006). Viral-vector mediated expression of oxytocin receptors in the amygdala of vorigin rats increases aggression and reduces anxiety. *Front. Neuroendocrinol*. 27, 124-1215.
- Broiz, A. C., Oliveira, L. C., & Brandao, M. L. (2008). Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT1A receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*, 89(1), 76-84. doi: 10.1016/j.pbb.2007.11.002
- 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
- Campbell-Smith, E. J., Holmes, N. M., Lingawi, N. W., Panayi, M. C., & Westbrook, R. F. (2015). Oxytocin signaling in basolateral and central amygdala nuclei differentially regulates the acquisition, expression, and extinction of context-conditioned fear in rats. *Learn Mem*, 22(5), 247-257. doi: 10.1101/lm.036962.114
- Cohen, H., Kaplan, Z., Kozlovsky, N., Gidron, Y., Matar, M. A., & Zohar, J. (2010). Hippocampal microinfusion of oxytocin attenuates the behavioural response to stress by means of dynamic interplay with the glucocorticoid-catecholamine responses. *J Neuroendocrinol*, 22(8), 889-904. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02003.x



- Dawson, L. A., & Watson, J. M. (2009). Vilazodone: a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist/serotonin transporter inhibitor for the treatment of affective disorders. *CNS Neurosci Ther*, 15(2), 107-117.
- Dolen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., & Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, 501(7466), 179-184. doi: 10.1038/nature12518
- 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. 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., Marcellino, D., Guidolin, D., Woods, A. S., & Agnati, L. (2009). Brain receptor mosaics and their intramembrane receptor-receptor interactions: molecular integration in transmission and novel targets for drug development. *J Acupunct Meridian Stud*, 2(1), 1-25. doi: 10.1016/S2005-2901(09)60011-X
- Harvey, B. H., Naciti, C., Brand, L., & Stein, D. J. (2004). Serotonin and stress: protective or malevolent actions in the biobehavioral response to repeated trauma? *Ann N Y Acad Sci*, 1032, 267-272. doi: 10.1196/annals.1314.035
- 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., Rio, R. T., 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*. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.043
- Jurek, B., Slattey, 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
- Kasahara, Y., Tateishi, Y., Hiraoka, Y., Otsuka, A., Mizukami, H., Ozawa, K., . . . Nishimori, K. (2015). Role of the Oxytocin Receptor Expressed in the Rostral Medullary Raphe in Thermoregulation During Cold Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6, 180. doi: 10.3389/fendo.2015.00180
- 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
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23, 155-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- Li, X., Inoue, T., Abekawa, T., Weng, S., Nakagawa, S., Izumi, T., & Koyama, T. (2006). 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist affects fear conditioning through stimulations of the postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the hippocampus and amygdala. *Eur J Pharmacol*, 532(1-2), 74-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.008
- Ma, Z., Strecker, R. E., McKenna, J. T., Thakkar, M. M., McCarley, R. W., & Tao, R. (2005). Effects on serotonin of (-)nicotine and dimethylphenylpiperazinium in the dorsal raphe and nucleus accumbens of freely behaving rats. *Neuroscience*, 135(3), 949-958. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.074
- 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
- 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
- Pagani, J. H., Williams Avram, S. K., Cui, Z., Song, J., Mezey, E., Senerth, J. M., . . . Young, W. S. (2015). Raphe serotonin neuron-specific oxytocin receptor knockout reduces aggression without affecting anxiety-like behavior in male mice only. *Genes Brain Behav*, 14(2), 167-176. doi: 10.1111/gbb.12202
- 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
- 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
- Risbrough, V. B., Brodtkin, J. D., & Geyer, M. A. (2003). GABA-A and 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists block expression of fear-potentiated startle in mice. *Neuropsychopharmacology*, 28(4), 654-663. doi: 10.1038/sj.npp.1300079
- Savitz, J., Lucki, I., & Drevets, W. C. (2009). 5-HT<sub>1A</sub> receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*, 88(1), 17-31. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.01.009
- 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

- Stein, C., Davidowa, H., & Albrecht, D. (2000). 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. *Synapse*, 38(3), 328-337. doi: 10.1002/1098-2396(20001201)38:3<328::aid-syn12>3.0.co;2-t
- Stiedl, O., Misane, I., Spiess, J., & Ogren, S. O. (2000). Involvement of the 5-HT1A receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. *J Neurosci*, 20(22), 8515-8527.
- Stroth, N., Niso, M., Colabufo, N. A., Perrone, R., Svenningsson, P., Lacivita, E., & Leopoldo, M. (2015). Arylpiperazine agonists of the serotonin 5-HT1A receptor preferentially activate cAMP signaling versus recruitment of beta-arrestin-2. *Bioorg Med Chem*, 23(15), 4824-4830. doi: 10.1016/j.bmc.2015.05.042
- Thompson, M. R., Callaghan, P. D., Hunt, G. E., Cornish, J. L., & McGregor, I. S. (2007). A role for oxytocin and 5-HT(1A) receptors in the prosocial effects of 3,4 methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Neuroscience*, 146(2), 509-514. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.032
- Tran, L., Lasher, B. K., Young, K. A., & Keele, N. B. (2013). Depletion of serotonin in the basolateral amygdala elevates glutamate receptors and facilitates fear-potentiated startle. *Transl Psychiatry*, 3, e298. doi: 10.1038/tp.2013.66
- 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.
- 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
- Abellan, R., Ventura, R., Pichini, S., Remacha, A. F., Pascual, J. A., Pacifici, R., . . . Segura, J. (2004). Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. *J Pharm Biomed Anal*, 35(5), 1169-1177. doi: 10.1016/j.jpba.2004.02.001
- Almada, R. C., Borelli, K. G., Albrechet-Souza, L., & Brandao, M. L. (2009). Serotonergic mechanisms of the median raphe nucleus-dorsal hippocampus in conditioned fear: Output circuit involves the prefrontal cortex and amygdala. *Behav Brain Res*, 203(2), 279-287. doi: 10.1016/j.bbr.2009.05.017
- 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
- 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
- Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Mudo, G., Perez-Alea, M., Ciruela, F., Tarakanov, A. O., . . . Fuxe, K. (2012). Fibroblast growth factor receptor 1- 5-hydroxytryptamine 1A heteroreceptor complexes and their enhancement of hippocampal plasticity. *Biol Psychiatry*, *71*(1), 84-91. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.09.012
- Bosch OJ, Wldherr, M, Nair HP, Hermanth PJ, Young LJ, Neumann ID. (2006). Viral-vector mediated expression of oxytocin receptors in the amygdala of vargin rats increases aggression and reduces anxiety. *Front. Neuroendocrinol.* *27*, 124-1215.
- Broiz, A. C., Oliveira, L. C., & Brandao, M. L. (2008). Regulation of conditioned and unconditioned fear in rats by 5-HT1A receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*, *89*(1), 76-84. doi: 10.1016/j.pbb.2007.11.002
- 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
- Campbell-Smith, E. J., Holmes, N. M., Lingawi, N. W., Panayi, M. C., & Westbrook, R. F. (2015). Oxytocin signaling in basolateral and central amygdala nuclei differentially regulates the acquisition, expression, and extinction of context-conditioned fear in rats. *Learn Mem*, *22*(5), 247-257. doi: 10.1101/lm.036962.114
- Cohen, H., Kaplan, Z., Kozlovsky, N., Gidron, Y., Matar, M. A., & Zohar, J. (2010). Hippocampal microinfusion of oxytocin attenuates the behavioural response to stress by means of dynamic interplay with the glucocorticoid-catecholamine responses. *J Neuroendocrinol*, *22*(8), 889-904. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02003.x
- Dawson, L. A., & Watson, J. M. (2009). Vilazodone: a 5-HT1A receptor agonist/serotonin transporter inhibitor for the treatment of affective disorders. *CNS Neurosci Ther*, *15*(2), 107-117.
- Dolen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., & Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*, *501*(7466), 179-184. doi: 10.1038/nature12518
- 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

- Fournier, J. C., DeRubeis, R. J., Hollon, S. D., Dimidjian, S., Amsterdam, J. D., Shelton, R. C., & Fawcett, J. (2010). Antidepressant drug effects and depression severity: a patient-level meta-analysis. *JAMA*, *303*(1), 47-53. doi: 10.1001/jama.2009.1943
- 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., Marcellino, D., Borroto-Escuela, D. O., Frankowska, M., Ferraro, L., Guidolin, D., . . . Agnati, L. F. (2010). The changing world of G protein-coupled receptors: from monomers to dimers and receptor mosaics with allosteric receptor-receptor interactions. *J Recept Signal Transduct Res*, *30*(5), 272-283. doi: 10.3109/10799893.2010.506191
- Harvey, B. H., Naciti, C., Brand, L., & Stein, D. J. (2004). Serotonin and stress: protective or malevolent actions in the biobehavioral response to repeated trauma? *Ann N Y Acad Sci*, *1032*, 267-272. doi: 10.1196/annals.1314.035
- 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., Rio, R. T., 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*. 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
- Kasahara, Y., Tateishi, Y., Hiraoka, Y., Otsuka, A., Mizukami, H., Ozawa, K., . . . Nishimori, K. (2015). Role of the Oxytocin Receptor Expressed in the Rostral Medullary Raphe in Thermoregulation During Cold Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *6*, 180. doi: 10.3389/fendo.2015.00180
- 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
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, *23*, 155-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- Li, X., Inoue, T., Abekawa, T., Weng, S., Nakagawa, S., Izumi, T., & Koyama, T. (2006). 5-HT1A receptor agonist affects fear conditioning through stimulations of the postsynaptic 5-HT1A receptors in the hippocampus and amygdala. *Eur J Pharmacol*, *532*(1-2), 74-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.008
- Ma, Z., Strecker, R. E., McKenna, J. T., Thakkar, M. M., McCarley, R. W., & Tao, R. (2005). Effects on serotonin of (-)nicotine and dimethylphenylpiperazinium in the dorsal raphe and nucleus accumbens of freely behaving rats. *Neuroscience*, *135*(3), 949-958. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.074
- 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
- 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
- Pagani, J. H., Williams Avram, S. K., Cui, Z., Song, J., Mezey, E., Senerth, J. M., . . . Young, W. S. (2015). Raphe serotonin neuron-specific oxytocin receptor knockout reduces aggression without affecting anxiety-like behavior in male mice only. *Genes Brain Behav*, *14*(2), 167-176. doi: 10.1111/gbb.12202
- 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
- Riad, M., Zimmer, L., Rbahr, L., Watkins, K. C., Hamon, M., & Descarries, L. (2004). Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT1A autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J Neurosci*, *24*(23), 5420-5426. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0950-04.2004
- 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
- Risbrough, V. B., Brodtkin, J. D., & Geyer, M. A. (2003). GABA-A and 5-HT1A receptor agonists block expression of fear-potentiated startle in mice. *Neuropsychopharmacology*, *28*(4), 654-663. doi: 10.1038/sj.npp.1300079
- 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
- Savitz, J., Lucki, I., & Drevets, W. C. (2009). 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*, 88(1), 17-31. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.01.009
- Segraves, R. T., & Balon, R. (2014). Antidepressant-induced sexual dysfunction in men. *Pharmacol Biochem Behav*, 121, 132-137. doi: 10.1016/j.pbb.2013.11.003
- 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
- Stein, C., Davidowa, H., & Albrecht, D. (2000). 5-HT(1A) receptor-mediated inhibition and 5-HT(2) as well as 5-HT(3) receptor-mediated excitation in different subdivisions of the rat amygdala. *Synapse*, 38(3), 328-337. doi: 10.1002/1098-2396(20001201)38:3<328::aid-syn12>3.0.co;2-t
- Stiedl, O., Misane, I., Spiess, J., & Ogren, S. O. (2000). Involvement of the 5-HT1A receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. *J Neurosci*, 20(22), 8515-8527.
- Stroth, N., Niso, M., Colabufo, N. A., Perrone, R., Svenningsson, P., Lacivita, E., & Leopoldo, M. (2015). Arylpiperazine agonists of the serotonin 5-HT1A receptor preferentially activate cAMP signaling versus recruitment of beta-arrestin-2. *Bioorg Med Chem*, 23(15), 4824-4830. doi: 10.1016/j.bmc.2015.05.042
- Taylor, M. J., Freemantle, N., Geddes, J. R., & Bhagwagar, Z. (2006). Early onset of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant action: systematic review and meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*, 63(11), 1217-1223. doi: 10.1001/archpsyc.63.11.1217
- 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.
- Thompson, M. R., Callaghan, P. D., Hunt, G. E., Cornish, J. L., & McGregor, I. S. (2007). A role for oxytocin and 5-HT(1A) receptors in the prosocial effects of 3,4 methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Neuroscience*, 146(2), 509-514. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.032
- Tran, L., Lasher, B. K., Young, K. A., & Keele, N. B. (2013). Depletion of serotonin in the basolateral amygdala elevates glutamate receptors and facilitates fear-potentiated startle. *Transl Psychiatry*, 3, e298. doi: 10.1038/tp.2013.66
- 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.
- 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
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., . . . Steinhausen, H. C. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*, *21*(9), 655-679. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.018
- Wong, D. T., Bymaster, F. P., & Engleman, E. A. (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci*, *57*(5), 411-441.

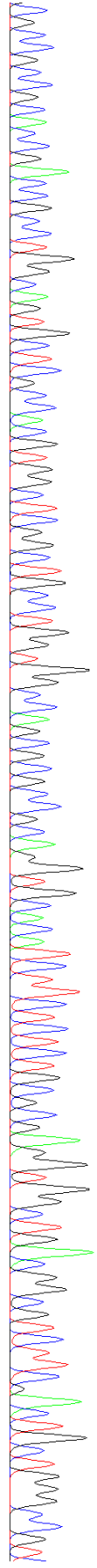


# ANEXOS

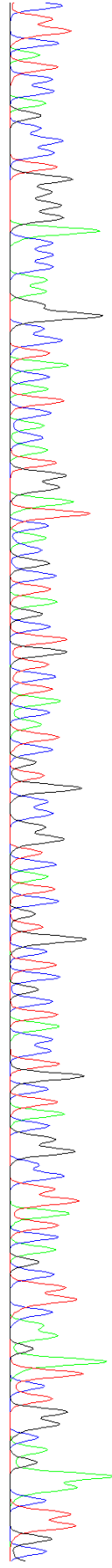
## Anexo I: Secuenciación del plásmido pcMV6-OxTR-GFP



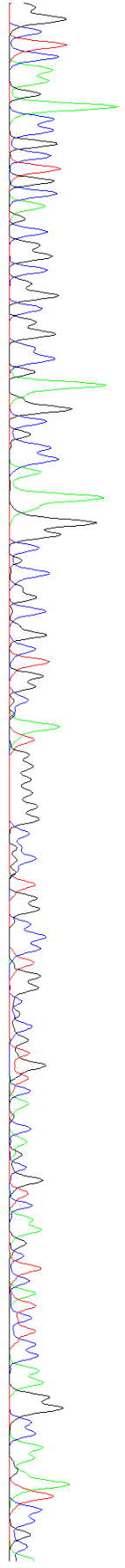
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730  
CGCCCGCCGACCCGACCCGCTGGCAATGCTCCGCCACGTGGCTCCGGCTGGTGCCAGCCGCCAGGTTGCACCATCTTCTCTCTCCGCCGAGGTTGGCTGACGGCTTCCGACTGCTGGCCGT



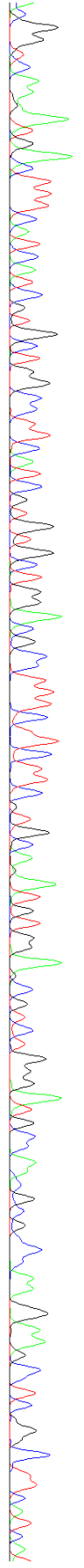
740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860  
CTTCATCCAGCCCTGGGGAAACCAAAGCCCTACATCACATGGATCACCGCTAGCTGTCTACATCTGTGGCCGTCATCCGTGCTCCATACCCTGCTACCGGCCCTTATCAGCTTCAAGATCTGGCAAACTTGGC



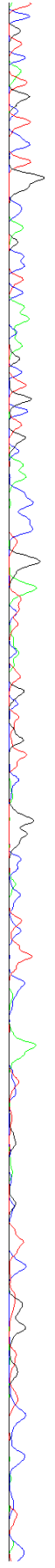
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980  
GGCTCAAGACCCGCTGCAAGCCGGCGGCCGAGGGCCCAAAAAGGCCGCGCTGGCGATGGGGGGCCCCTGGCCCTGGCCGCTGCAGCAAGCTCAATCTCCAAAGCCAAAGATCCGCA



990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100  
CGGTCAAAGATGACTTTCATCATCGTGGCTTTCATCTGTTGGTGGACGCCCTTCTTCTTCCGACAGATGTGGAGCGTCTGGGATGCCAAAGCAAGAGCCCTCGGCCTTCATCA



1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220  
TCGTCATGCTCCTCCAGCCCTCAACAGCTGCTGCCAAACCCTGGATTACATGCTTCTTCAGGCAACCTCCGCAAGGCTTTCTCCGGGCTTGTCTCCACCTTAC



Anexo II: Secuenciación del plásmido pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP



**Anexo III:** Alineamiento entre la secuencia del OxTR contenido en el plásmido pcMV6-OxTR-GFP comparada con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

13/3/2017

NCBI Blast:ENA|CAA56562|CAA56562.1 Homo sapiens (human)...

BLAST® » Global Alignment » RID-CDE6A8A2113

**BLAST Results**

**Needleman-Wunsch alignment of two sequences**

Job title: ENA|CAA56562|CAA56562.1 Homo sapiens (human)...

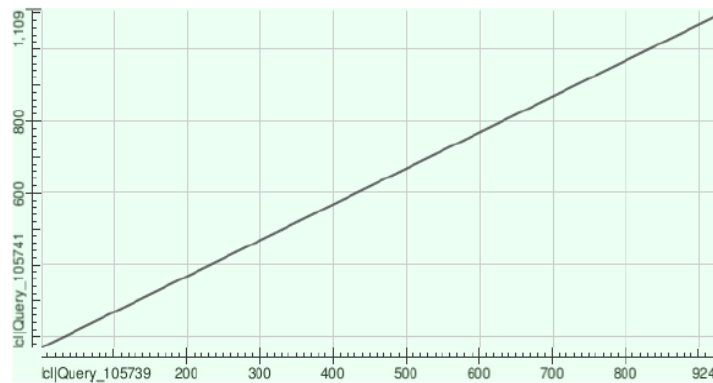
<b>RID</b>	<a href="#">CDE6A8A2113</a> (Expires on 03-14 23:20 pm)	<b>Subject ID</b>	Ic Query_105741
<b>Query ID</b>	Ic Query_105739	<b>Description</b>	None
<b>Description</b>	ENA CAA56562 CAA56562.1 Homo sapiens (human) partial oxytocin receptor : Location:1..924		<a href="#">See details</a>
<b>Molecule type</b>	nucleic acid	<b>Molecule type</b>	nucleic acid
<b>Query Length</b>	924	<b>Subject Length</b>	1300
		<b>Program</b>	BLASTN 2.6.1+

**Dot Matrix View**



Plot of Ic|Query\_105739 vs Ic|Query\_105741

[?] [\[?\]](#)



**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:

Description	Score	Percent Ident	Accession
None provided	1041	70%	Query_105741

**Alignments**

Sequence ID: Query\_105741 Length: 1300 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 1300

NW Score	Identities	Gaps	Strand	Frame
1041	916/1300(70%)	17/1300(1%)	Plus/Plus	

Features:

13/3/2017

NCBI Blast:ENA/CAA56562/CAA56562.1 Homo sapiens (human)...

```

Sbjct 1 GCGAATGGGCAGTTTATAGCAGAGCTCTCTGGCTAAGTAGAGAACCCACTGCTTACTGGC 60
Sbjct 61 TTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAGCTGGCTAGCGTTAAACTTAA 120
Query 1 ATGGAGGGCGCG 12
Sbjct 121 GCTTGGTACCAGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCACCATGGAGGGCGCG 180
Query 13 CTGCGAGCCAACCTGGAGCGCCGAGGCAAGCCAGCGCCGCGCCGGGGGGCCGAG 72
Sbjct 181 CTGCGAGCCAACCTGGAGCGCCGAGGCAAGCCAGCGCCGCGCCGGGGGGCCGAG 240
Query 73 GGCAACCGCACCGCCGACCCCGCGCGCAACGAGGSCCTGGCGCGCTGGAGGTGGCG 132
Sbjct 241 GGCAACCGCACCGCCGACCCCGCGCGCAACGAGGSCCTGGCGCGCTGGAGGTGGCG 300
Query 133 GTGCTGTGCTCATCTGCTCCTGGCGCTGAGCGGGAATGCGTGTGTGCTGCTGGCGCTG 192
Sbjct 301 GTGCTGTGCTCATCTGCTCCTGGCGCTGAGCGGGAACGCGTGTGTGCTGCTGGCGCTG 360
Query 193 CGCACACACGCGCAGAAGCACTCGCGCCTTCTTCTTCATGAAGCACCTAAGCATCGCC 252
Sbjct 361 CGCACACACGCGCAGAAGCACTCGCGCCTTCTTCTTCATGAAGCACCTAAGCATCGCC 420
Query 253 GACCTGGTGGTGGCAGTGTTCAGGTGCTGCCGAGTGTGCTGGGACATCACCTTCGCG 312
Sbjct 421 GACCTGGTGGTGGCAGTGTTCAGGTGCTGCCGAGTGTGCTGGGACATCACCTTCGCG 480
Query 313 TTCTACGGGCCGACCTGCTGTGCCGCTGGTCAAGTACTTGCAGGTGGTGGCATGTTC 372
Sbjct 481 TTCTACGGGCCGACCTGCTGTGCCGCTGGTCAAGTACTTGCAGGTGGTGGCATGTTC 540
Query 373 GCCTCCACCTACCTGCTGCTCATGTCCCTGGACCGTGCTGGCCATCTGCCAGCGG 432
Sbjct 541 GCCTCCACCTACCTGCTGCTCATGTCCCTGGACCGTGCTGGCCATCTGCCAGCGG 600
Query 433 CTGCGCTCGCTGCGCGCCGCAACGACCGCCTGGCAGTGTGCGCCAGTGGCTCGGCTGC 492
Sbjct 601 CTGCGCTCGCTGCGCGCCGCAACGACCGCCTGGCAGTGTGCGCCAGTGGCTCGGCTGC 660
Query 493 CTGGTGGCCAGCGCGCGCAGGTGCACATCTTCTCTCTGCGCGAGGTGGCTGACGGCGTC 552
Sbjct 661 CTGGTGGCCAGCGCGCGCAGGTGCACATCTTCTCTCTGCGCGAGGTGGCTGACGGCGTC 720
Query 553 TTCGACTGCTGGGCGCTTTCATCCAGCCCTGGGGACCAAGGCTACATCACATGGATC 612
Sbjct 721 TTCGACTGCTGGGCGCTTTCATCCAGCCCTGGGGACCAAGGCTACATCACATGGATC 780
Query 613 ACGCTAGCTGTCTACATCGTGGCGGTCACTGTGCTCGCTGCTGCTACGGCCTTATCAGC 672
Sbjct 781 ACGCTAGCTGTCTACATCGTGGCGGTCACTGTGCTCGCTGCTGCTACGGCCTTATCAGC 840
Query 673 TTCAAGATCTGGCAGAACTTGCGGCTCAAGACCGCTGCAGCGCGGGCGGCGAGGCGCA 732
Sbjct 841 TTCAAGATCTGGCAGAACTTGCGGCTCAAGACCGCTGCAGCGCGGGCGGCGAGGCGCA 900
Query 733 GAGGCGCGGGCGGCTGGCGATGGGGGGCGCGTGGCCCTGGCGCGTGTGAGCAGCGTCAAG 792
Sbjct 901 AAAGCGCGGGCGGCTGGCGATGGGGGGCGCGTGGCCCTGGCGCGTGTGAGCAGCGTCAAG 960
Query 793 CTCATCTCCAAGGCAAGATCCGCAAGGCAAGATGACTTTTCATCATCGTGTGGCCTTC 852
Sbjct 961 CTCATCTCCAAGGCAAGATCCGCAAGGCAAGATGACTTTTCATCATCGTGTGGCCTTC 1020
Query 853 ATCGTGTGCTGGACCCCTTCTTCTTCGTCGAGATGTGGAGCGTCTGGGATGCCAAGCGG 912
Sbjct 1021 ATCGTGTGCTGGACCCCTTCTTCTTCGTCGAGATGTGGAGCGTCTGGGATGCCAAGCGG 1080
Query 913 CCCAAGGAAG-----GT 924
Sbjct 1081 CCCAAGGAAGCCTCGGGCTTCATCATCGTCTGCTCCTGGCAGCCTCAACAGCTGCTGC 1140
Sbjct 1141 AACCCCTGGATTACATGCTTGTTCATGGGCCACCTCTTACCAAACTCCTGGCACGGC 1200
Sbjct 1201 TTTCTCGGGCTTGTCTGCGCACCTTACTTGAAGGGCAAACCCCTGGGGAAAAACCAA 1260
Sbjct 1261 TGCCCCCAAAGAAGACAAACCTGTCTCTTCTTGTTCGG 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](#)

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

2/3

13/3/2017

NCBI Blast:ENA/CAA56562/CAA56562.1 Homo sapiens (human)...



- [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 IV:** Alineamiento entre la secuencia del 5-HT1AR contenida en el plásmido pcDNA3.1-5-HT1AR-YFP comparada con los datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA).

13/3/2017

NCBI Blast:ENA|CAH03197|CAH03197.1 Homo sapiens (human)...

[BLAST®](#) » [Global Alignment](#) » RID-CDKYC2UZ113

**BLAST Results**

**Needleman-Wunsch alignment of two sequences**

Job title: ENA|CAH03197|CAH03197.1 Homo sapiens (human)...

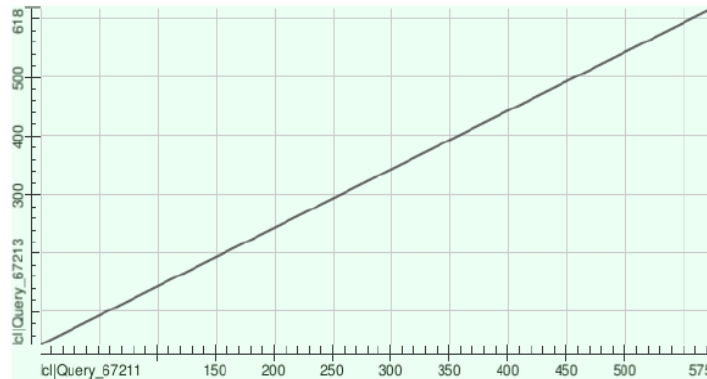
<b>RID</b>	<a href="#">CDKYC2UZ113</a> (Expires on 03-15 00:58 am)	<b>Subject ID</b>	lcl Query_67213
<b>Query ID</b>	lcl Query_67211	<b>Description</b>	None
<b>Description</b>	ENA CAH03197 CAH03197.1 Homo sapiens (human) 5-hydroxytryptamine receptor 1A : Location:1..1000		<a href="#">See details</a>
<b>Molecule type</b>	nucleic acid	<b>Molecule type</b>	nucleic acid
<b>Query Length</b>	1000	<b>Subject Length</b>	618
		<b>Program</b>	BLASTN 2.6.1+

[Dot Matrix View](#)



Plot of lcl|Query\_67211 vs lcl|Query\_67213

[\[?\]](#)



[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Score	Percent Ident	Accession
None provided	204	55%	Query_67213

[Alignments](#)

Sequence ID: Query\_67213 Length: 618 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 618

NW Score	Identities	Gaps	Strand	Frame
204	575/1043(55%)	425/1043(40%)	Plus/Plus	

Features:

13/3/2017

NCBI Blast:ENA/CAH03197/CAH03197.1 Homo sapiens (human)...

```

Query 1 ATGGATGTGCTCAGCCC 17
Sbjct 1 CCAACGAGCAGAGGAGCCAGGTTACCTGGACTGGGCATCAGGATGGATGTGCTCAGCCC 60
Query 18 TGGTCAGGGCAACAACACCACATCACCACCGGCTCCCTTTGAGACCGGGCAACACTAC 77
Sbjct 61 TGGTCAGGGCAACAACACCACATCACCACCGGCTCCCTTTGAGACCGGGCAACACTAC 120
Query 78 TGGTATCTCCGACGTGACCGTCAGTACCAAGTATCACCCTCTCTGCTGCTGGGCACGCT 137
Sbjct 121 TGGTATCTCCGACGTGACCGTCAGTACCAAGTATCACCCTCTCTGCTGCTGGGCACGCT 180
Query 138 CATCTTCTGCGCGGTGCTGGGCAATGCGTGGTGGTGGCCATCGCCTTGGAGCGCTC 197
Sbjct 181 CATCTTCTGCGCGGTGCTGGGCAATGCGTGGTGGTGGCCATCGCCTTGGAGCGCTC 240
Query 198 CCTGCAGAACGTGGCCAAATATCTTATGGCTCTTTGGCGGTACCCGACCTCATGGTGC 257
Sbjct 241 CCTGCAGAACGTGGCCAAATATCTTATGGCTCTTTGGCGGTACCCGACCTCATGGTGC 300
Query 258 GGTGTGGTGTGCTCCCATGGCCGCGCTGTATCAGGTGCTCAACAAGTGGACTGGGCCA 317
Sbjct 301 GGTGTGGTGTGCTCCCATGGCCGCGCTGTATCAGGTGCTCAACAAGTGGACTGGGCCA 360
Query 318 GGTAACTGCGACCTGTTCATCGCCCTCGACGTGCTGTGCTGCACCTCATCCATCTTGA 377
Sbjct 361 GGTAACTGCGACCTGTTCATCGCCCTCGACGTGCTGTGCTGCACCTCATCCATCTTGA 420
Query 378 CCTGTGCGCCATCGCGCTGGACAGGTACTGGGCCATCACGGACCCCATCGACTACGTGAA 437
Sbjct 421 CCTGTGCGCCATCGCGCTGGACAGGTACTGGGCCATCACGGACCCCATCGACTACGTGAA 480
Query 438 CAAGAGGACGCCCCGGCGCGCGCTGCGCTCATCTCGCTCACTTGGCTTATGGCTTCCT 497
Sbjct 481 CAAGAGGACGCCCCGGCGCGCGCTGCGCTCATCTCGCTCACTTGGCTTATGGCTTCCT 540
Query 498 CATCTCTATCCCGCCCATGCTGGGCTGGCGCACCCCGGAAGACCGCTCGGACCCCGACGC 557
Sbjct 541 CATCTCTATCCCGCCCATGCTGGGCTGGCGCACCCCGGAAGACCGCTCGGACCCCGACGC 600
Query 558 ATGCACCATAGCAAGGATCATGGCTACACTATCTATTCCACCTTTGGAGCTTTTACAT 617
Sbjct 601 ATGCACCATAGCAAGGA 618
Query 618 CCCGCTGCTGCTCATGTGTTCTCTATGGGCGCATATCCGAGCTGCGCGCTTCCGCAT 677
Query 678 CCGCAAGACGGTCAAAAAGGTGGAGAAGACCGGAGCGGACACCCGCCATGGAGCATCTCC 737
Query 738 CGCCCCGAGCCCAAGAAGAGTGTGAATGGAGAGTCGGGAGCAGGAAGTGGAGGCTGGG 797
Query 798 CGTGGAGAGCAAGGCTGGGGTGTCTGTGCGCCAATGGCGGGTGGGCAAGGTGACGA 857
Query 858 TGGCGCCGCCCTGGAGGTGATCGAGGTGCACCGAGTGGGCAACTCCAAGAGCACTTGCC 917
Query 918 TCTGCCAGCGAGGCTGCTTACCCCTTGTGCCCGCCCTCTTTGAGAGGAAAAATGA 977
Query 978 GCGCAACCCGAGGCGAAGCGCA 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](#)

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

2/3