



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



---

**Evidencias biofísicas de la formación del heteroreceptor de oxitocina-colecistoquinina B.**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo 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:** Andrés Sebastián Tayo Montenegro

**Tutor:** MSc. Yunys Pérez Betancourt

Ambato - Ecuador

Mayo 2018

MSc. Yunys Pérez Betancourt

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente 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, 21 de Febrero de 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Yunys Pérez Betancourt', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

MSc. Yunys Pérez Betancourt  
C.I.175647174-0  
**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Andrés Sebastián Tayo Montenegro, 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 bibliográficas.



---

Andrés Sebastián Tayo Montenegro  
C.I. 180433537-8  
**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. Yenddy Nayghit Carrero Castillo, PhD.  
C.I. 175740457-7



Dr. Carlos Barba Ostría, PhD.  
Pasaporte: G24101591

Ambato, 27 de Marzo de 2018

## DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su 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 regularizaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Andrés Sebastián Taya Montenegro  
C.I. 180433537-8  
**AUTOR**

## AGRADECIMIENTO

Este proyecto de investigación no hubiera podido ser realizado sin la colaboración técnica y el apoyo de muchas personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento. Al Dr. Wilber Romero-Fernández por su valiosa dirección, por la apertura para trabajar en el Grupo de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica GIDIB de la Universidad Técnica de Ambato, por todos sus conocimientos impartidos y por la estricta forma de transmitir su arte. Al MSc. Yunys Pérez Betancourt por la confianza y apoyo en el desarrollo de este proyecto en calidad de tutor, su predisposición para resolver cualquier duda encaminó a la investigación por el camino correcto.

A mis compañeros y amigos, que han sido muchos, gracias por compartir conmigo ésta experiencia universitaria que perdurará en mis recuerdos. Por haber sido buenos sobretodo como personas les agradezco. Esas palabras de aliento en el momento oportuno han hecho que no desmaye a mitad de camino. Gracias infinitas a todas aquellas personas que apoyaron la realización de éste proyecto, que quisieron verme como un profesional y que ahora comparten mi experiencia. A mi familia por su presión y comprensión en todo el proceso, seguimos en esto...

Gracias a todos ellos, esto se lo dedico a mis padres.

## RESUMEN

Los neuropéptidos oxitocina (OX) y colecistoquinina (CCK) están ampliamente implicados en la respuesta fisiológica y fisiopatológica de la ansiedad, el miedo y la depresión. Así, sus receptores de membrana son blancos específicos a los que se dirigen fármacos. En la actualidad se ha descrito que tanto la formación de homodímeros y heterodímeros de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR) como la regulación alostérica que tiene lugar entre los protómeros implicados, representan nuevas opciones terapéuticas más específicas y eficaces. Por ello, el objetivo de este estudio fue demostrar la formación de un heterodímero entre estos receptores. En este trabajo, se utilizaron células HeLa para la expresión transiente de los receptores marcados con fluorescencia. Los análisis de microscopía demostraron la coexpresión de los receptores en regiones discretas de la membrana citoplasmática. Además, los ensayos de proximidad de ligando ratificaron la interacción biofísica de los receptores esclareciendo la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB. Estos hallazgos se podrían convertir en un punto de partida para explorar el uso de este heteroreceptor como una nueva estrategia para el tratamiento de los trastornos de ansiedad.

**Palabras clave:** Oxitocina, Colecistoquinina, Receptor de oxitocina, Receptor de colecistoquinina B, receptores de membrana, Heteroreceptor, Ansiedad.

## ABSTRACT

The neuropeptides oxytocin (OX) and cholecystokinin (CCK) are widely implicated in the physiological and pathophysiological response of anxiety, fear and depression. Thus, its membrane receptors are specific targets to which drugs are targeted. Actually, it has been described that both the formation of homodimers and heterodimers of membrane receptors coupled to G proteins (GPCR) and the allosteric regulation that takes place between the involved protomers, represent new more specific and effective therapeutic options. Therefore, the objective of this study was to demonstrate the formation of a heterodimer among these receptors. In this work, HeLa cells were used for transient expression of fluorescently labeled receptors. Microscopy analysis showed the coexpression of receptors in discrete regions of the cytoplasmic membrane. In addition, proximity ligation assays confirmed the biophysical interaction of the receptors elucidating the formation of the OxTR / CCKB heteroreceptor. These findings could become a starting point to explore the use of this heteroreceptor as a new strategy for the treatment of anxiety disorders.

**Key Words:** Oxytocin, Colecistokinin, Oxytocin receptor, Cholecystokinin B receptor, membrane receptors, Heteroreceptor, Anxiety.



## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### PÁGINAS PRELIMINARES

Portada.....	i
Aprobación del tutor.....	ii
Declaración de Autenticidad.....	iii
Aprobación de los miembros de tribunal de grado.....	iv
Derechos de Autor.....	v
Agradecimiento.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii

### TEXTO

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.- EL PROBLEMA	
1.1.- Tema.....	3
1.2.- Justificación.....	3
1.3.- Objetivos.....	5
1.3.1.- Generales.....	5
1.3.2.- Específicos.....	5
CAPÍTULO II.- MARCO TEÓRICO	
2.1.- Antecedentes investigativos.....	6
2.2.- Hipótesis.....	16
2.3.- Señalamiento de variables de la hipótesis.....	16
CAPÍTULO III.- MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1- Material.....	17

3.2.- Métodos.....	17
<b>CAPÍTULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1.- Análisis y discusión de los resultados.....	23
4.2.- Verificación de hipótesis.....	32
<b>CAPÍTULO V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
5.1.- Conclusiones.....	33
5.2.- Recomendaciones.....	33
<b>C. MATERIAL DE REFERENCIA</b>	
Referencias Bibliográficas.....	34

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Representación esquemática de un GPCR de la familia A.....	7
Figura 2. Representación esquemática de la unión de ligandos al receptor y las principales vías activadas por diferentes proteínas G.....	8
Figura 3. Conformaciones de los GPCRs en la superficie celular.....	10
Figura 4. Formas moleculares de la colecistoquinina CCK.....	13
Figura 5. Esquema de la detección de interacciones de proteínas por PLA.....	15
Figura 6. Expresión de receptores de oxitocina marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.....	24
Figura 7. Expresión de receptores de colecistoquinina marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.....	25
Figura 8. Co-localización de los receptores de oxitocina y los receptores de colecistocinina B en la membrana citoplasmática de células HeLa que co-expresan ambos receptores.....	27
Figura 9. Control del ensayo de proximidad de ligando.....	28
Figura 10. Ensayos de proximidad de ligando.....	29

## INTRODUCCIÓN

Se estima que aproximadamente el 15% de la población mundial ha padecido durante su vida algún episodio de ansiedad o depresión, por lo tanto, estas patologías representan un serio problema de salud pública según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Cabe resaltar la importancia de proponer nuevas estrategias terapéuticas debido al éxito fallido de muchos de los tratamientos establecidos.

La oxitocina (OX) es un neuropéptido hipotalámico que desempeña un papel crítico en el comportamiento social y tiene un papel ansiolítico en humanos (Blume et al., 2008; I. D. Neumann, 2008). Sin embargo, el mecanismo y la función ansiolítica regulada por OX es en gran parte desconocida. En los últimos años, se han llevado a cabo amplios estudios farmacológicos que sugieren que la colecistoquinina o colecistocinina (CCK) puede participar como un agente ansiogénico en las respuestas neuroendocrinas al estrés (Harro et al 1993, Daugé y Léna 1998). OX y CCK realizan su señalización celular a través de sus respectivos receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR). Un nuevo enfoque acerca de estos receptores muestra que son capaces de formar homodímeros, heterodímeros y mosaicos de interacciones (interacción entre más de dos receptores) en las superficies celulares (Fuxe K. et al., 2010). Si la formación de estas complejas estructuras cambia la visión de la transducción de señal a través de los GPCR, el hecho que de ocurra una regulación alostérica entre los receptores implicados incrementa la complejidad de esta realidad. Estos hallazgos han llevado a plantear nuevos blancos terapéuticos en el diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades (Fuxe, O. Borroto-Escuela, et al., 2012; Fuxe, Borroto-Escuela, Romero-Fernandez, et al., 2014).

Se conoce que los receptores de oxitocina (OxTR) y los receptores de colecistoquinina B (CCKB) se encuentran co-expresados en regiones del cerebro involucradas en la fisiología y fisiopatología de la ansiedad (Jimenez et al., 2015). También, se ha descrito que OxTR es capaz de formar un heterómero con el receptor de dopamina D2 y que la activación mediada por OX incrementa la señalización dopaminérgica (Romero-Fernandez, Borroto-Escuela, Agnati, & Fuxe, 2013). Dado que el papel ansiolítico regulado por OX

resulta complejo y podría involucrar la interacción con otros sistemas, este trabajo propone estudiar la formación del heterómero OxTR/CCKB, determinar la formación de esta estructura resultaría vital para conocer la regulación a través de sus GPCR y su papel en trastornos neuropsiquiátricos, de esta manera se pretende proponer a los heteroreceptores como dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mentales.

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **1. Tema de la investigación**

Evidencias biofísicas de la formación del heteroreceptor de oxitocina-colecistoquinina B.

#### **2. Justificación**

Los receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR) son una superfamilia de proteínas capaces de detectar a una gran diversidad de estímulos endógenos y exógenos dando respuesta en procesos del metabolismo celular, la diferenciación y crecimiento celular, la secreción y especialmente la neurotransmisión, en donde actualmente se sugieren como blancos terapéuticos (Fuxe et al., 2014a). Se ha demostrado que son capaces de establecer estructuras más complejas con la interacción de dos o más proteínas formando homodímeros, heterodímeros e incluso establecer mosaicos de interacciones entre GPCRs (Fuxe et al., 2010). La formación de estas estructuras en el cerebro permite que la señalización tome vías alternas a las que tomaría el protómero como una unidad individual conduciendo a cambios en el reconocimiento de los agonistas, la señalización y el tráfico de

receptores a través de mecanismos alostéricos (Jordan B y Devi L, 1999; Fuxe, K et al., 2012). Esto provocaría que un único receptor pueda participar en diferentes vías de señalización y que múltiples fármacos puedan influir de manera diversa activando cada una de estas vías, esta variabilidad en el reconocimiento y señalización conduce a una reevaluación de la eficacia de los fármacos actuales. Los cambios en las propiedades de señalización que acompañan a la heterodimerización podrían dar lugar a una diversidad farmacológica inesperada, que tendría que considerarse para el desarrollo de compuestos más selectivos que se dirijan a heterodímeros específicos sin afectar a los protómeros individuales (George et al, 2002). Pellissier y colaboradores han demostrado que la activación de un protómero es suficiente para estimular sus proteínas G pero al activar ambos protómeros la eficacia de la respuesta por el acoplamiento del fármaco es mayor. Con esta posibilidad es válido sugerir que los fármacos que fueron o están siendo diseñados a unidades individuales de GPCR podrían resultar obsoletos comparados con compuestos bivalentes (Le Naour, M et al., 2013). Además, es posible bloquear la formación de los dímeros y afectar su función utilizando péptidos sintéticos de interferencia derivados de los dominios transmembrana del receptor (Hebert et al., 1996; Jastrzebska et al., 2015). Un tratamiento dirigido al sistema oxitoinérgico podría resultar efectivo para el tratamiento de la ansiedad y depresión con posibles efectos sinérgicos si el mismo se dirige a los dímeros que el receptor de oxitocina (OxTR) puede establecer (Romero-Fernandez et al., 2013; Terrillon et al., 2003; Díaz-Cabiale et al., 2000; Wrzal et al., 2012). Sin embargo, resulta imprescindible determinar si existe la afinidad de OxTR por establecer estas estructuras e interactuar con otros sistemas, lo cual permitiría comprender por completo la fisiología y fisiopatología de la ansiedad.

Tomando en cuenta i) que OxTR y el receptor de colecistoquinina B (CCKB) se co-expresan en áreas del cerebro asociados con el miedo y la ansiedad (Jimenez et al., 2015; Katona et al., 2001), ii) la manifestación de síntomas secundarios en el tratamiento de la ansiedad con benzodiazepinas y

su estrecha implicación con el sistema colecistoninérgico (Berna M, y Jensen R. 2007), iii) los trastornos alimenticios relacionados con la ansiedad y con la oxitocina (Neumann et al., 1994) iv) que la administración periférica de CCK-8, agonista de CCKB, activa la migración intranuclear de oxitocina en neuronas hipotalámicas en ratas (Hashimoto et al., 2005). Se ha planteado la hipótesis de la posible afinidad de los receptores OxTR y CCKB para formar dímeros de forma constitutiva, esta investigación pretende establecer evidencias biofísicas de la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB *in vitro*. El resultado podría tener un impacto en la medicina molecular y podría sugerir a esta estructura como otra posible diana terapéutica para trastornos de ansiedad.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

Identificar la formación del heteroreceptor oxitocina-colecistoquinina CCKB.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Evaluar el uso de las células HeLa como modelo para la expresión de los receptores de oxitocina OxTR y colecistoquinina CCKB.
2. Determinar la localización de los receptores OxTR y CCKB en la membrana citoplasmática de las células HeLa.
3. Identificar interacciones físicas entre los receptores OxTR/CCKB a través de ensayos de proximidad de ligando en el modelo celular.

## **CAPÍTULO II**

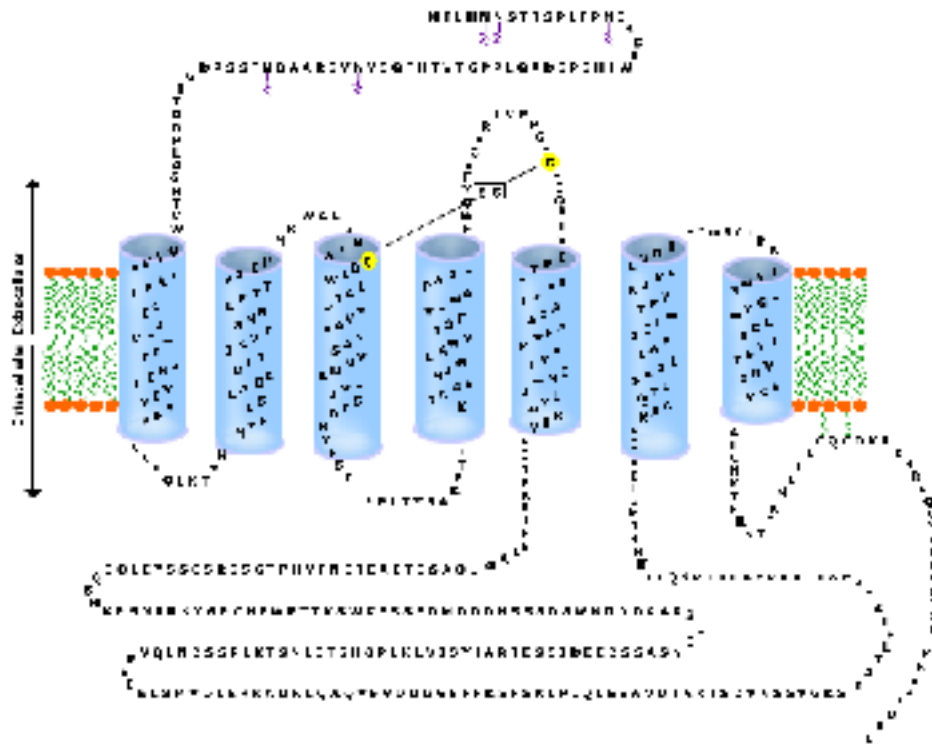
### **MARCO TEÓRICO**

#### **1. Antecedentes Investigativos**

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) representan una gran familia de proteínas integrales de membrana que están codificadas por más de 800 genes en el genoma humano (Zhang et al., 2006). En base a la similitud de secuencias de aminoácidos dentro de los siete dominios transmembrana que posee (Figura 1), los GPCR se dividen en cinco familias (Fredriksson et al., 2003). La familia A incluye entre otros, a los receptores aminérgicos (serotonina, muscarínico, dopamina, histamina, adrenérgico), receptores peptídicos (oxitocina, vasopresina, colecistocinina) y rodopsina.

Estos receptores actúan como transductores de señal al ser capaces de unir con especificidad y selectividad uno o varios ligandos de origen endógenos y exógenos; y responder a esta unión mediante un cambio conformacional que implica su activación o inactivación (Mary, S. et al., 2013). Por su localización en la membrana celular, los GPCR reconocen un elevado número y tipo de señales extracelulares incluyendo fotones, iones, moléculas pequeñas (entre las que se encuentran hormonas, neurotransmisores, nucleótidos, lípidos de distinta complejidad y azúcares), péptidos y proteínas. Por ello se ven envueltos desde procesos tales como el metabolismo celular, la secreción, la diferenciación y crecimiento celular, la respuesta inmuno-inflamatoria y la neurotransmisión, entre otras; consolidándose como blancos terapéuticos para diversas patologías.

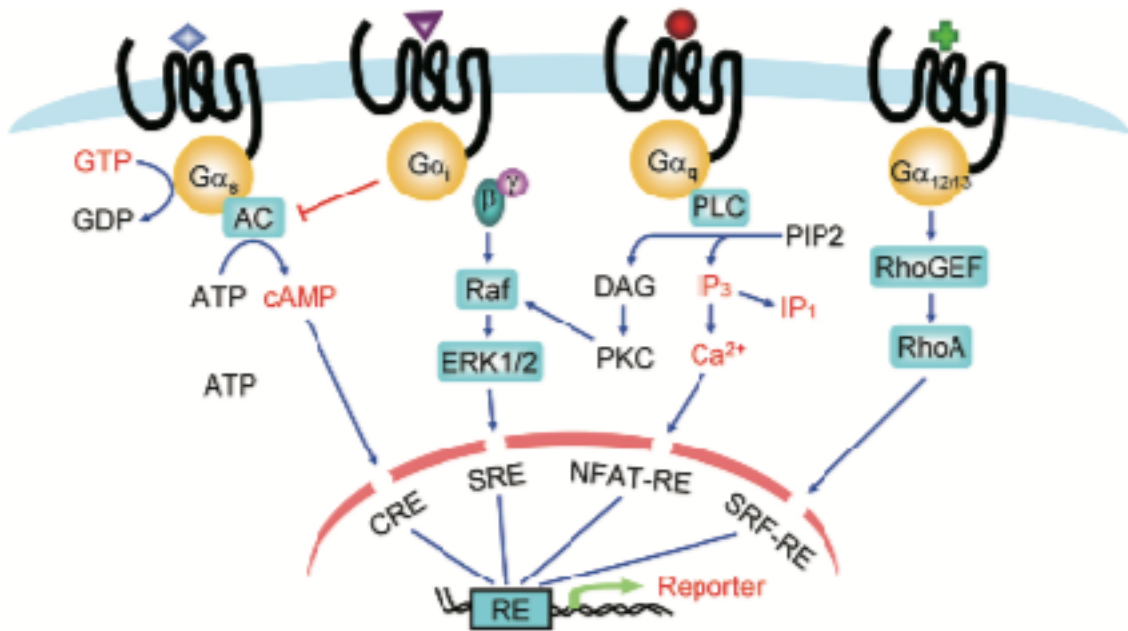




**Figura 1. Representación esquemática de un GPCR de la familia A.** Este tipo de receptores constituye alrededor del 90% de todos los GPCRs. La figura muestra la secuencia de aminoácidos y estructura secundaria del receptor muscarínico M3 humano. La familia A incluye entre otros a los receptores aminérgicos (serotonina, muscarínico, dopamina, histamina, adrenérgico), receptores peptídicos (oxitocina, vasopresina, colecistocinina) y rodopsina. La arquitectura estructural de los GPCRs es altamente específica y se caracteriza por estar formada por  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana siete veces y que están conectadas a través de bucles intracelulares y extracelulares. Cuando se pliegan correctamente, los dominios extracelular e intracelular forman sitios activos muy específicos para la unión de ligandos y de las proteínas G, respectivamente. La orientación de los extremos N-terminal y C-terminal también se conserva en todos los GPCRs. El extremo N-terminal se expone al medio extracelular y el extremo C-terminal se encuentra en el citosol de la célula. Los puentes disulfuro pueden formar el dominio extracelular y son claves para conservar la estructura-función de la proteína. Figura adaptada de Borroto-Escuela y colaboradores (Borroto-Escuela, Correia, et al., 2011).

En el año de 1999, Jeffery C. proponía la importancia del estudio de la plurifuncionalidad de ciertas proteínas, el paradigma que un gen equivale a una proteína y esta a su vez a una función desapareció y tras ello el entendimiento de la señalización a través de los GPCR se facilitó. En el modelo clásico de señalización de GPCR, la estimulación de sus siete dominios transmembrana

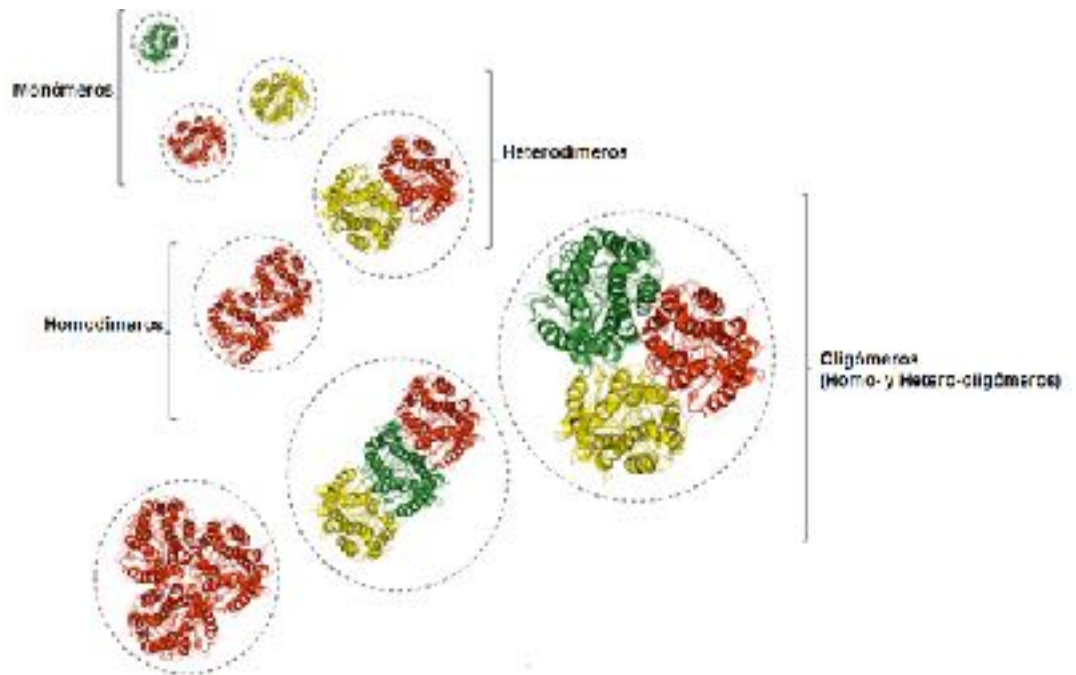
conduce a la activación de proteínas G heterotriméricas, que se disocian en las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta\gamma$  (Cabrera-Vera, T. et al., 2003). Las subunidades activan moléculas efectoras y estas a su vez a segundos mensajeros, dando lugar a una cascada de reacciones responsables de la respuesta celular. Sin embargo, estos receptores pueden señalizar no sólo a través de proteínas G sino también a través de las proteínas denominadas *b*-arrestinas produciendo efectos bioquímicos y funcionales totalmente distintos (Rajagopal, S., Rajagopal, K., y Lefkowitz, R. J. 2010). En contraste con la gran cantidad de GPCR, la cantidad de efectores que estos activan es considerablemente menor (Figura 2), lo que deriva en una regulación cruzada entre GPCR (Hur E, y Kim K. 2002) dificultando el diseño de drogas tomando en consideración que en dependencia del ligando que active al receptor, éste podría provocar que un mismo GPCR tome una u otra vía de señalización (Galandrin, Oligny-Longpré y Bouvier. 2007).



**Figura 2. Representación esquemática de la unión de ligandos al receptor y las principales vías activadas por diferentes proteínas G. La gran cantidad de**

receptores de membrana acoplados a proteínas G efectúan su señalización a través de limitados efectores intracelulares, en rojo se indica los puntos de detección de los ensayos de alto impacto comúnmente utilizados: unión a GTP $\gamma$ S, detección de cAMP, detección de IP3 / IP1 y expresión de Ca<sup>2</sup>. Figura adaptada de Zhang, R., y Xie, X. (2012).

La plurifuncionalidad de los GPCR incrementó cuando se estableció que dos receptores opioides completamente funcionales, los subtipos  $\kappa$  y  $\delta$ , se asocian entre sí, resultando en la generación de un receptor heterodimérico (Jordan B y Devi L, 1999) que es capaz de potenciar y diversificar la señal de transducción con una unión del ligando con propiedades funcionales distintas de las de cualquiera de los receptores por separado. El agonista selectivo de este dímero se une sinérgicamente e induce respuestas funcionales aún mayores en el organismo, la actividad biológica de una droga dirigida a esta estructura sería superior a cualquiera que se una independientemente a los receptores. Fuxe y colaboradores (2010) demostraron que los GPCR son capaces de formar dímeros (homodímeros y heterodímeros) e incluso establecer mosaicos de interacciones formando estructuras aún más complejas (Figura 3). Estas conformaciones protéicas pueden expresarse de manera constitutiva (Canals, M et al., 2003) por la afinidad de los receptores para interactuar. En este caso su heterodimerización ocurre desde la síntesis de los GPCR en el retículo endoplasmático (Van Craenenbroeck et al., 2011). Sin embargo, la heterodimerización puede también inducirse por la unión de ligandos (Gupta, A et al., 2010; Latif, R., Graves, P., y Davies, T. 2002) como el caso del receptor de dopamina D2 y el receptor de somatostatina SSAT5, en el que su forma de heterodímero es la más activa (Rocheville et al. 2000).



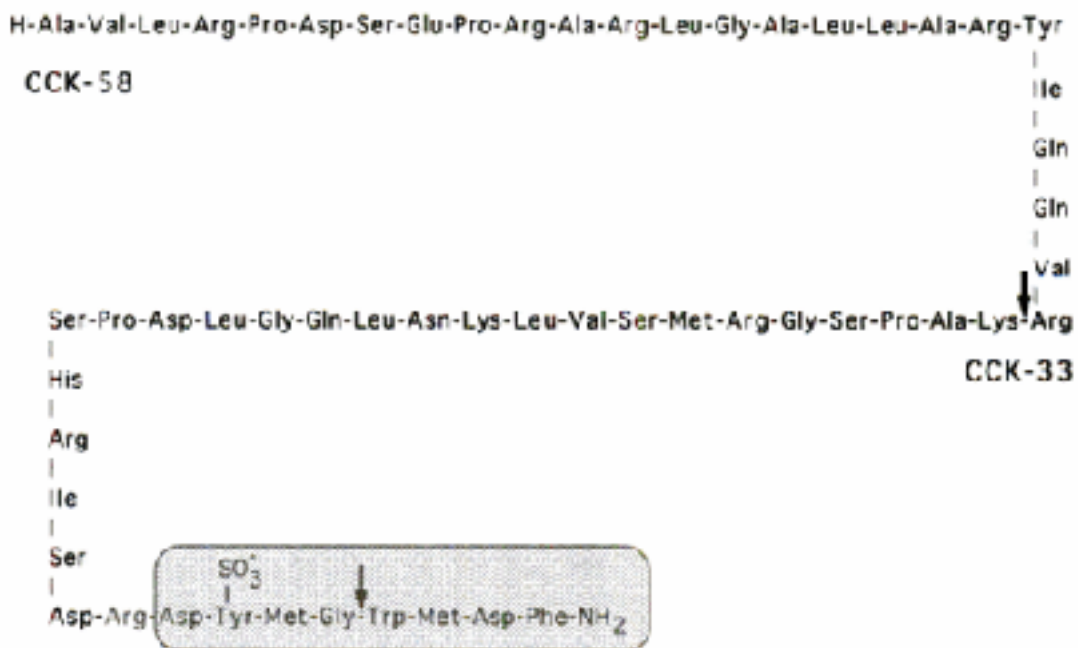
**Figura 3. Conformaciones de los GPCRs en la superficie celular.** Evidencias experimentales han demostrado que los GPCRs no solo se encuentran en forma de monómeros en la superficie celular, sino que también son capaces de interactuar con otros protómeros para formar homodímeros y heterodímeros (Fuxe et al., 2014b). 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 et al., 2014b).

La formación de estas estructuras permite una interacción entre los receptores implicados que provocan una regulación conformacional y funcional (Damian, M et al., 2006) aumentando la señalización del dímero e incrementando la respuesta celular o inhibiendo la función del otro protómero y afectando a otros procesos metabólicos (Fuxe, K et al., 2012). La activación de un protómero en un dímero es suficiente para estimular las proteínas G (Pellissier et al., 2011). Sin embargo, la eficacia del acoplamiento es mayor cuando se activan ambos protómeros. AbdAlla et al., (2000) mediante heterodímeros estables del receptor de angiotensina AT1 y AT2 en células P-12, fibroblastos y tejido miometrial; demostró como AT2 antagoniza la función de AT1, por esta razón una droga dirigida a AT2 estaría reprimiendo la función de AT1 y viceversa. Sin embargo, conociendo la formación de esta estructura y la naturaleza de su regulación es posible bloquear la formación de los dímeros y

afectar su función empleando péptidos sintéticos de interferencia derivados de los dominios transmembrana del receptor (Hebert et al., 1996; Jastrzebska et al., 2015) es posible aplicar estos péptidos conjuntamente con un agonista sin que éste afecte la función del otro protómero. Por este motivo, en los últimos años la investigación de estas estructuras se ha ido propagando cada vez más, el potencial terapéutico de dímeros u oligómeros de GPCR es amplio permitiendo una respuesta celular más estable con el uso de compuestos bivalentes (Le Naour, M et al., 2013) que la producida por aquellas drogas que modulan a un único receptor. Muchos trastornos neuropsiquiátricos son atribuidos a alteraciones específicas en los dímeros en el cerebro y un tratamiento eficaz requeriría la acción sobre los mismos (Fuxe, K et al., 2014b). En regiones como la amígdala, el hipotálamo, núcleo rafe y el núcleo accumbens puede encontrarse heteroreceptores como el que establece el receptor de oxitocina (OxTR) con el receptor de dopamina D2 (Romero-Fernandez et al., 2013), vasopresina (Terrillon et al., 2003), alfa-adrenérgico (Díaz-Cabiale et al., 2000) o el receptor beta-adrenérgico (Wrzal et al., 2012). Estos neurotransmisores están involucrados independientemente en la respuesta de la ansiedad fisiológica (Pagani et al., 2015) que es una respuesta innata del organismo, con un valor obvio para la propia supervivencia, ante estímulos que el individuo reconoce como dañinos y que podrían afectar la integridad del individuo. La información es recogida y transmitida por estos receptores al núcleo accumbens y al núcleo amigdalino centro medial donde las respuestas hormonales y autonómicas se implementan para generar una respuesta determinada (Ehrlich et al., 2009; LeDoux, 2000; Majidi, Kosari-Nasab, & Salari, 2016; Paz & Pare, 2013). Las alteraciones en estos dímeros, la sobreestimación del grado de peligro y la infravaloración de las propias capacidades de enfrentamiento pueden convertir a ésta respuesta en patológica y a través de síntomas físicos, psicológicos y conductuales, deteriorando significativamente la salud del individuo (Viveros et al., 2005).

La oxitocina (OX) desempeña un importante papel en la sociabilidad y la regulación de la ansiedad tanto en seres humanos como animales (Neumann, 2008). Su administración reduce la actividad de la amígdala y tiene un efecto positivo en pacientes con estrés postraumático (Koch et al., 2015) y en pacientes esquizofrénicos (Sobota, Mihara, Forrest, Featherstone, & Siegel, 2015). Ratones knock-out para OxTR expuestos a factores estresantes muestran un comportamiento similar a la ansiedad con un incremento en los niveles de corticosterona (Amico, Mantella, Vollmer, & Li, 2004). Esta interacción del sistema oxitoinérgico con otros neurotransmisores hace que su activación afecte diversos procesos fisiológicos. Así, Neumann et al., (1994) sugiere que existen trastornos alimenticios relacionados con la ansiedad e implicados con OX. Antagonistas de OxTR revierten los efectos anorexígenos e hipertensivos de la nesfatina-1 en ratas (Yosten, G. y Samson, W. 2010) pero en casos de anorexia y bulimia nerviosa compulsiva es a la colecistoquinina a quien se suele atribuir la causa (Behar R, Barahona M, Iglesias B y Casanova D, 2007). Si tomamos en cuenta que la colecistoquinina (CCK) estimula la saciedad por ingesta de alimentos, ralentiza la motilidad gastrointestinal, inhibe la secreción de ácido gástrico, estimula la contracción de la vesícula biliar, la relajación del esfínter de Oddi y modula la secreción de insulina (Izumi et al., 1996; Berna M, y Jensen R. 2007) se podría sugerir la posible interacción entre ambos sistemas pero no necesariamente a nivel de proteína. La CCK es uno de los péptidos intestino-cerebrales de interés en la actualidad. Su forma más abundante en el cerebro es el fragmento de octapéptido sulfatado C-terminal CCK-8 (Figura 4), que interactúa con la misma afinidad con ambos subtipos de receptores CCKA y CCKB (Landgraf, R 2005). Estos receptores son capaces de formar homodímeros y heterodímeros entre sí (Cheng, Z et al., 2003). La administración de CCK-8 provoca la activación de la fosfolipasa C. Esta enzima hidroliza fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato en los segundos mensajeros: inositol-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 desencadena la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico, que a su vez junto con DAG activará la proteína quinasa

C (PKC) (Dufresne, Seva, y Fourmy. 2006). La activación de CCKB en regiones como el cuerpo estriado y la sustancia negra beneficia los síntomas de ansiedad y regula el comportamiento anti-exploratorio en ratas (Koks S et al., 2000) además elimina déficits conductuales e hipertemia inhibiendo el daño dopaminérgico celular inducido por drogas (Di Wen et al., 2016). Además, la administración periférica de CCK-8 activa la migración intranuclear de OX en neuronas hipotalámicas en ratas (Hashimoto et al., 2005). Sin embargo, la administración local de CCK-8 directamente en la amígdala produce hiper-ansiedad (Frankland et al., 1997).



**Figura 4. Formas moleculares de la colecistoquinina CCK.** La figura muestra las formas moleculares de la colecistoquinina. La forma más abundante en el cerebro es el octapéptido sulfatado C-terminal CCK8. Pudiendo encontrarse también su forma no sulfatada, CCK-33, CCK-12 y otros fragmentos más cortos como CCK-5 y CCK-4. Todas estas formas dotadas de actividad biológica (Andreu D, 1997).

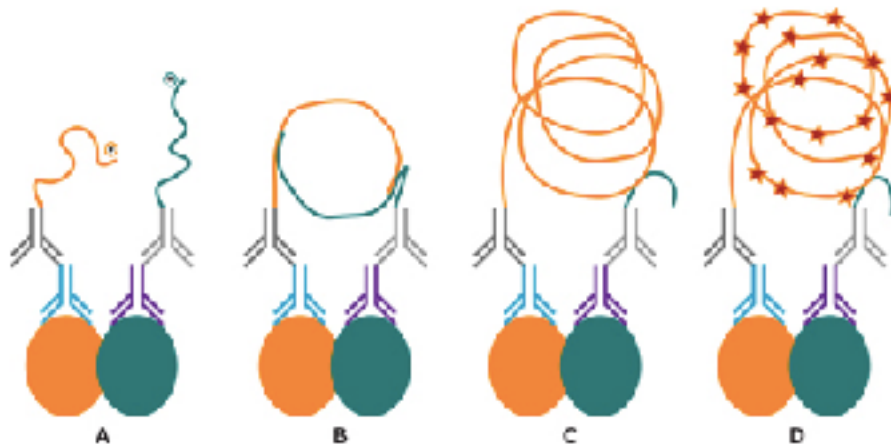
La relación entre los sistemas OX-CCK y los trastornos de ansiedad van más allá, pues en el tratamiento de esta patología es común el uso de opioides y

antidepresivos (Thompson, Kelly, Christopoulos y Canals. 2015) dirigidos a potenciar la respuesta mediada por OX, dopamina y serotonina. Sin embargo, se ha demostrado en varios modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, que los antagonistas del receptor CCKB potencian los efectos farmacológicos de los opioides mientras que los agonistas lo atenúan (Andreu D, 1997). En el tratamiento con opioides existen diversos efectos secundarios dentro de los que podemos mencionar vómitos, diarreas, estreñimiento, pérdida de apetito, etc. La relación entre OxTR y CCKB es elevada y puede ser responsable de la ineficiencia de tratamientos con bendiazepinas, opioides y antidepresivos como la paroxetina y de los efectos secundarios que presenta su uso.

Las evidencias biofísicas de la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB son el punto de partida para el diseño de nuevas terapias contra la ansiedad. Una evidencia importante son las imágenes obtenidas con técnicas de inmunofluorescencia que han permitido establecer interacciones entre otros sistemas. Anteriormente se ha demostrado un alto grado de colocación del receptor de adenosina A1 y el receptor de dopamina D1 en fibroblastos y células corticales co-transfectadas pero una baja colocación del receptor D2 (Gines et al., 2000). El hecho de que estos receptores colocalicen no sugiere que exista una interacción entre ambos pero si otorga un acercamiento más profundo al nivel de relación entre dichos sistemas. Con el fin de evidenciar la formación del heteroreceptor es imprescindible el uso de técnicas más específicas como el ensayo de proximidad de ligando (PLA) que permite determinar si los receptores se encuentran a una distancia de hasta ~16 nm, cifra ligeramente mayor a la que detecta el ensayo de transferencia de energía de resonancia entre fluoróforos (FRET) que es de hasta ~10 nm (Trifilieff, P et al., 2011). El PLA permite la detección de dos regiones específicas de proteínas individuales o complejos proteicos inmunomarcados con anticuerpos primarios y luego con diferentes anticuerpos secundarios específicos conjugados con oligonucleótidos complementarios (Fredriksson, S et al., 2003). Cuando dos moléculas de anticuerpo están muy cerca, las cadenas de ADN



complementarias pueden ligarse, amplificarse y visualizarse con una sonda fluorescente (Figura 5). Al medir la proximidad entre los receptores, el PLA permite la validación *in situ* de la proximidad molecular de dos proteínas endógenas y por ende de la formación del heteroreceptor (Pertwee, R. G. 2008; Bart, G et al., 2015). Posteriores ensayos bioquímicos permitirían establecer la naturaleza de la interacción en el dímero en caso de encontrarse.



**Figura 5. Esquema de la detección de interacciones de proteínas por PLA.** El ensayo de proximidad de ligando es una inmunotécnica que permite la detección, visualización y cuantificación de interacciones proteína-proteína en tejidos o células *in situ*. Después de la incubación con anticuerpos primarios, se incuban los anticuerpos PLUS y MINUS (A). Se añade la ligasa para hibridar los oligos conectores y completar el círculo de ADN (B). Amplificación de círculo rodante (C). Hibridación de los oligonucleótidos marcados con fluorescencia para detección de señal (D). Las principales ventajas de PLA en comparación con otras técnicas es la posibilidad de detectar interacciones proteína-proteína con resolución subcelular en secciones de tejido nativas o células mediante microscopía. Esto puede ser particularmente importante en investigación sobre el cáncer, estratificación de pacientes y estudios de biomarcadores (Duolink® PLA Resource Center).

La ansiedad y depresión representa uno de los problemas de salud pública más grave en la actualidad. Se estima que cada año más de 300 millones de personas en todo el mundo sufren algún episodio de ansiedad y depresión grave. Según datos de la OMS, entre 1990 y 2013, este número de afectados se incrementó en un 50%, llegando alrededor de 615 millones, una cifra cercana al 10% de la población mundial.

Al demostrar la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB es posible sugerir que el papel ansiolítico y antidepresivo mediado por OX en parte es regulado por CCKB debido a que éste modula alostéricamente a OxTR en la formación del dímero, así en un futuro se podría optimizar la terapéutica al dirigir nuevas drogas a ésta estructura.

## **2. Hipótesis**

### **2.1 Formación del heteroreceptor OxTR/CCKB**

#### **Hipótesis Nula**

No existe la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB *in vitro*.

#### **Hipótesis Alternativa**

Existe la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB *in vitro*.

#### **2.1. Señalamiento de variables de la hipótesis**

- Transformación con plásmidos de interés.
- Transfección de plásmidos en células HeLa.
- Expresión de los receptores en la membrana de células HeLa.
- Colocalización de los receptores *in vitro* en células HeLa.
- Ensayos de proximidad de ligando

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Materiales

Se emplearon células de cáncer cérvico-uterino HeLa (ATCC®CCL-2™), medio de cultivo DMEM (Gibco™), adicionalmente Buffer fosfato salino (PBS), tripsina, penicilina estreptomicina (P/S), suero fetal bovino (FBS), Dimetil sulfóxido (DMSO). Para la purificación de ADN se utilizó el kit (PureLink Quick plasmid miniprep kit) y para los ensayos de proximidad de ligando el kit Duolink® proximity ligation assay (PLA®) para proporcionar las condiciones óptimas de fijación, bloqueo y titulación.

#### 2. Métodos

##### 2.1. TRANSFORMACIÓN EN ESCHERICHIA COLI DH5α

Los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CCKB-YFP que contienen las secuencias que codifican para los receptores de interés fueron introducidos en *E. coli* DH5α según las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA). Principalmente, en un vial de 1.5 ml se mezclaron 50 µl de *E. coli* DH5α y 10 ng de ADN plasmídico 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

amplificación del gen de selección, se adicionaron 250 µl de medio Luria Bertani (LB) (10 g de NaCl, 10 g de peptona y 5 g de extracto de levadura) y se incubó a 37°C y 300 rpm por 1 hora. En placas Petri con agar LB y antibiótico de selección a 100 µg/ml (kanamicina) se inocularon 200 µl del cultivo y con un asa de siembra se extendió el inóculo a lo largo de la superficie del agar hasta su completa distribución. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

## **2.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO**

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* DH5α transformada con los plásmidos de interés en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de kanamicina y se incubó por 6 horas a 300 rpm y 37°C. Al cabo de las 6 horas, se inocularon los 5 ml en 250 ml de medio LB con 100 µg/ml de kanamicina y se incubó toda la noche a 300 rpm y 37°C.

Transcurrida la incubación se centrifugó el cultivo a 3000 rpm y 4°C por 10 minutos, el pellet resultante se resuspendió en tampón de homogeneización (25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 50 mM glucosa, 100 µg/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, 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 seguido de una centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los plásmidos presentes en el sobrenadante se precipitaron con isopropanol y se centrifugaron a 16590 rpm por 1 hora a 4°C. El pellet se lavó con 10 ml de etanol al 70% frío y fresco y se centrifugó nuevamente en las condiciones indicadas anteriormente. Transcurrida la centrifugación se eliminó el sobrenadante, los restos de etanol se eliminaron por evaporación en una cámara extractora de gases. El pellet se resuspendió en 200 µl de buffer TE1X (10 mM tris-HCl, pH=8.0, 0.01 mM EDTA). Una vez aislado el ADN plasmídico,

se purificaron 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).

### **2.3 ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA**

La integridad del ADN plasmídico purificado se evaluó mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (p/v en tampón TAE1X) con 0.01% (v/v) de SyberSafe (Invitrogen, USA). Específicamente, se añadieron 100 ng de ADN plasmídico a 1 µl buffer de carga de ADN 6X (Sigma Aldrich, USA). Como marcador de peso molecular se utilizó High DNA mass leader 1-10 kb (Invitrogen, USA). La electroforesis se realizó a 80V por 40 minutos. Para observar las bandas correspondientes al ADN plasmídico se utilizó el sistema de foto documentación ChemiDoc™MP (Bio-Rad, USA).

### **2.4 CULTIVO CELULAR Y CRIOCONSERVACIÓN**

Las células HeLa (ATCC®CCL-2™) fueron cedidas amablemente por la Dra. Mileidys Pérez Alea del Grupo de investigación de Modelos Animales y Cáncer de la Fundación Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España. Se utilizaron medios DMEM (Gibco™) suplementados con 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomina, y 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS). Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos y en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda.

Se mantuvo un stock de células crioconservadas en la atmósfera de nitrógeno líquido (-196°C) suspendidas en medio de criocongelación (90% FBS y 10% de Dimetilsulfóxido) (DMSO), según las recomendaciones de la casa comercial (American Type Culture Collection, Manassas, USA).

## **2.5 TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS EN CÉLULAS HELA**

Las células HeLa fueron cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en las condiciones descritas anteriormente por 24 horas hasta llegar a una confluencia no mayor a 90%. Las células se transfectaron con los plásmidos de OxTR-GFP y CCKB-YFP independientemente, empleando el reactivo Lipofectamina™2000 según las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen, USA). Se empleó una relación ADN/Lipofectamina™2000 de 1:2. Básicamente, se incubaron con 1 µg de ADN en 50 µl de medio DMEM sin complementos y 2 µl de Lipofectamina™2000 en el mismo volumen de medio por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló el ADN sobre la lipofectamina y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. La solución se añadió a las células en crecimiento para su posterior incubación por 48 horas. Al cabo de este tiempo se comprobó la correcta expresión de los receptores marcados con las proteínas fluorescentes a través de un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (Leica Microsystems, Alemania).

## **2.6 ENSAYOS DE COLOCALIZACIÓN**

Las células HeLa se co-transfectaron con los plásmidos de OxTR-GFP y CCKB-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 a la superficie del cubreobjetos con 1 ml de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS1X, se dejaron secar a temperatura ambiente protegidos de la luz y se montaron sobre un portaobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (Leica Microsystems, Alemania).

## 2.7 ENSAYO DE PROXIMIDAD DE LIGANDO PLA

Las células HeLa fueron cultivadas y co-transfectadas sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en las condiciones descritas anteriormente pero utilizando sólo 0,5 µg de cada plásmido por 24 horas hasta llegar a una confluencia no mayor a 90%. Después de 48 horas los pocillos se lavaron 2 veces con PBS 1X para después fijarlas con PFA 4% por 20 minutos. Seguido, se realizaron otros 3 lavados con PBS1X con el fin de obtener una buena imagen al microscopio. Se bloquearon los enlaces sulfhidrilo -SH formados en la fijación con Glicina 20 mM en PBS1X por 10 minutos. La membrana celular se permeabilizó para una mejor unión de los anticuerpos por 10 min con buffer de permeabilización (Glicina 20 mM, 0,5% Triton X-100 en PBS1X, pH 7,4). Se utilizó el kit de PLA Duolink®proximity ligation assay(PLA®) por lo que se bloquearon las interacciones celulares con la solución de bloqueo del kit por 1 hora. Transcurrido el tiempo, se incubaron los cubreobjetos con anticuerpos primarios goat anti-OxTR y rabbit anti-CCKB (dilución 1:250) en agitación a 4°C toda la noche. Posteriormente, se lavaron 3 veces los cubreobjetos con PBS1X para después incubarlos con los anticuerpos secundarios PLUS anti goat y MINUS anti rabbit (1:5) por 60 minutos a 37°C con ligera agitación y evitando su evaporación. Seguidamente, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con buffer A propio del kit y se incubaron los cubreobjetos con 100 ul de buffer de ligación 1X adicionando ligasa 1:40. Los cubreobjetos se incubaron por 30 minutos a 37°C con ligera agitación. Al finalizar la incubación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos con buffer A y se incubaron con 100 ul de buffer de amplificación 1X que contiene 1:80 de polimerasa. Los cubreobjetos se incubaron por 100 minutos a 37°C con ligera agitación. Al finalizar, se realizaron 2 lavados de 10 minutos con buffer B 1X y un lavado de 1 minuto con buffer B 0.01X. Por último, los cubreobjetos se secaron a temperatura ambiente protegidos de la luz y se montaron en portaobjetos con medio de montaje con 4',6 diamino-2-fenilindol

(DAPI, Invitrogen, USA). Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (Leica Microsystems, Alemania).

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

Los resultados se presentan a través de imágenes de microscopía 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 YFP (514-527 nm) en un único plano z. El número de muestras (n) se indica en cada condición experimental en los pies de figura.



## CAPÍTULO IV

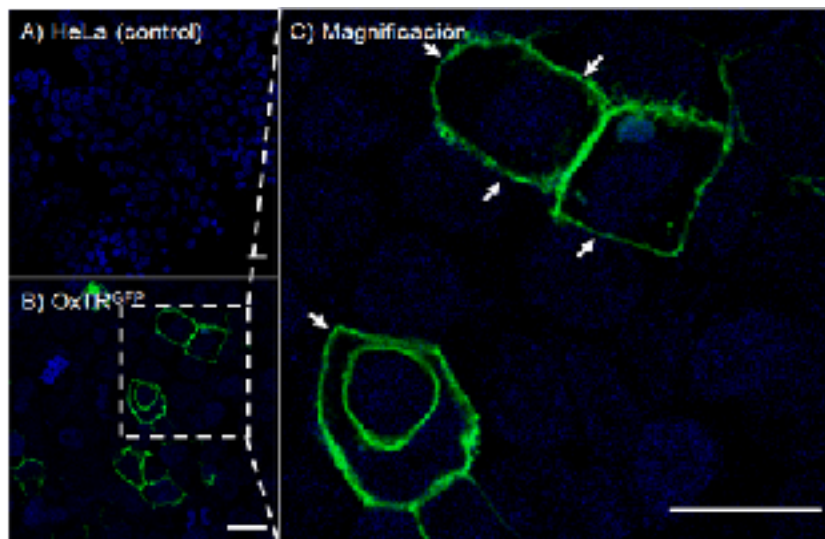
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Análisis y discusión de los resultados

La inserción en *E. coli* DH5 $\alpha$  de los plásmidos pcMV6-OxTR-GFP y pcDNA3.1-CCKB-YFP que contenían las secuencias que codifican para los receptores OxTR y CCKB se comprobó con el uso de ampicilina y kanamicina como antibióticos de selección. Como se esperaba, el crecimiento bacteriano se hizo presente únicamente en el cultivo con kanamicina con ausencia de crecimiento en el control ambiental y en el cultivo con ampicilina (Resultados no se muestran). De la misma forma, la ausencia de crecimiento bacteriano en células sin transformar confirmó la eficacia de los antibióticos utilizados. Esto facilitó, sin duda, la selección de una colonia aislada para la reproducción del vector asegurándonos que el plásmido sea el de interés y permitiéndonos emplear los recursos necesarios en su purificación.

A pesar de que las células eucariotas son un modelo celular bien caracterizado para el estudio de proteínas recombinantes, se ha descrito que las diferentes condiciones experimentales pueden alterar significativamente la expresión de las proteínas de interés. Por ello, en este trabajo se comprobó el uso de células HeLa como modelo para la expresión de los receptores de oxitocina y colecistocinina B marcados con fluorescencia. Las células HeLa sin transfección o transfectadas de forma independientes con los plásmidos OxTR<sup>GFP</sup> o CCKB<sup>YFP</sup> fueron incubadas por 48 horas, y al cabo de este tiempo, a

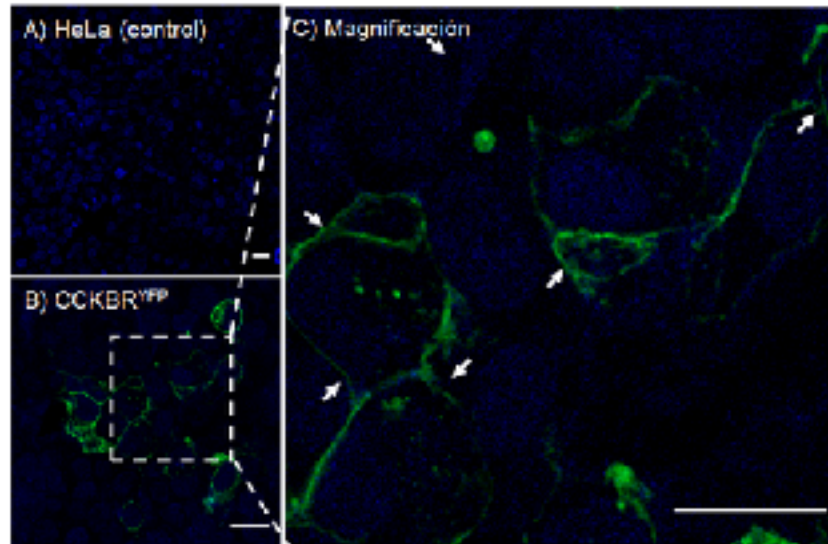
través de la técnica de microscopía de fluorescencia se evaluó la expresión de los receptores.



**Figura 6. Expresión de receptores de oxitocina marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.** A) Células sin transfectar tratadas con el reactivo de transfección (control), escala=10  $\mu\text{m}$ . B) La figura muestra la expresión transiente de los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde), escala=20  $\mu\text{m}$ . C) Magnificación de B, donde flechas señalan la expresión de los receptores en la membrana celular, escala=70  $\mu\text{m}$ . Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. Las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

Los resultados obtenidos en células que no fueron transfectadas con los plásmidos, y que solo fueron tratadas con el reactivo de transfección, las mismas que se utilizaron como control, muestran que no existe una considerable auto-fluorescencia en el espectro del color verde (Figura 6A). Además, la tinción con DAPI de los núcleos de las células permitió revelar la integridad de la célula al no encontrar núcleos apoptóticos. Las células transfectadas con cADN-OxTR<sup>GFP</sup> mostraron una específica e intensa señal fluorescente principalmente a nivel de membrana celular (Figura 6B y 6C), lo que indica la correcta expresión del receptor en la membrana citoplasmática. Las células que fueron transfectadas con cADN-CCKB<sup>YFP</sup> manifestaron el

mismo comportamiento y se observó que la mayoría de los receptores se localizaron en la superficie celular (Figura 7B y 7C). Esto ratifica la integridad de los plásmidos tras no encontrar presencia de inserciones, deleciones, sustituciones o corrimiento del marco de lectura que pudieran afectar la correcta expresión.



**Figura 7. Expresión de receptores de colecistoquinina marcados con fluorescencia en la membrana citoplasmática de células HeLa.** A) Células sin transfectar tratadas con el reactivo de transfección (control), escala=10  $\mu\text{m}$ . B) La figura muestra la expresión transiente de los receptores de colecistocinina marcados con proteínas fluorescentes YFP (verde), escala=20  $\mu\text{m}$ . C) Magnificación de B, donde flechas señalan la expresión de los receptores en la membrana celular, escala=70  $\mu\text{m}$ . Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. Las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z.

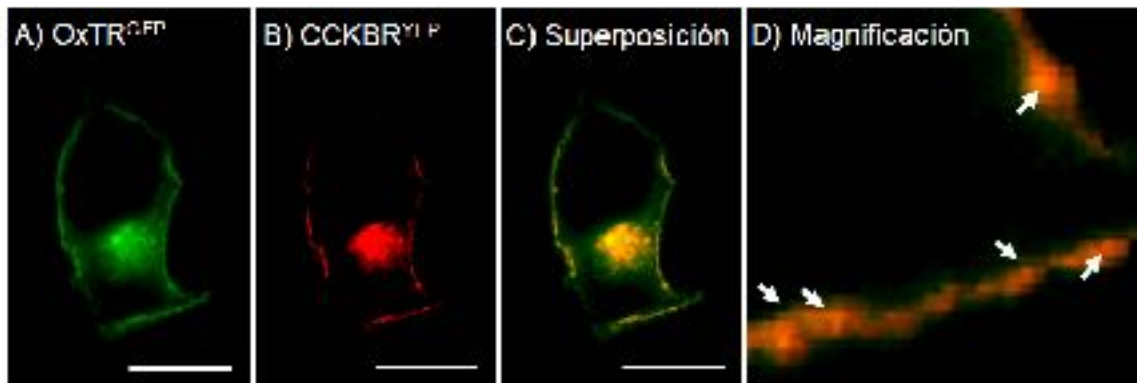
En trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación se habían obtenidos resultados que mostraban una considerable porción de receptores en el citoplasma celular lo que apuntaba la necesidad de estandarizar el protocolo de transfección (Pérez-Betancourt et al., 2017a; Pérez-Betancourt et al., 2017b). Sin embargo, en este trabajo se muestra que la mayor parte de los receptores se ubican en la superficie de las células lo que apunta que no existe problemas de tráfico e inserción de las proteínas en la membrana celular. Por

todo ello, podemos concluir que en las condiciones experimentales utilizadas las células HeLa son un buen modelo celular para la expresión transiente de receptores marcados con proteínas fluorescentes.

Posteriormente, el modelo fue utilizado para realizar las transfecciones dobles. Los resultados indican que las células HeLa co-transfectadas con OxTR<sup>GFP</sup> (Figura 8A) y CCKB<sup>YFP</sup> (Figura 8B) expresan correctamente ambos receptores en la membrana celular. Se debe señalar que cuando se incrementan cantidades de ADN se comienza a observar señal fluorescente en el citoplasma de las células, que podría corresponder a receptores que han quedado atrapados en la maquinaria de biosíntesis proteica producto del estrés inducido por la expresión heteróloga de los receptores. No obstante, esta señal intracelular no afecta el análisis de co-localización que se realizó sobre los receptores presentes en la membrana celular, los cuales representan la mayor porción de proteínas marcadas con fluorescencia.

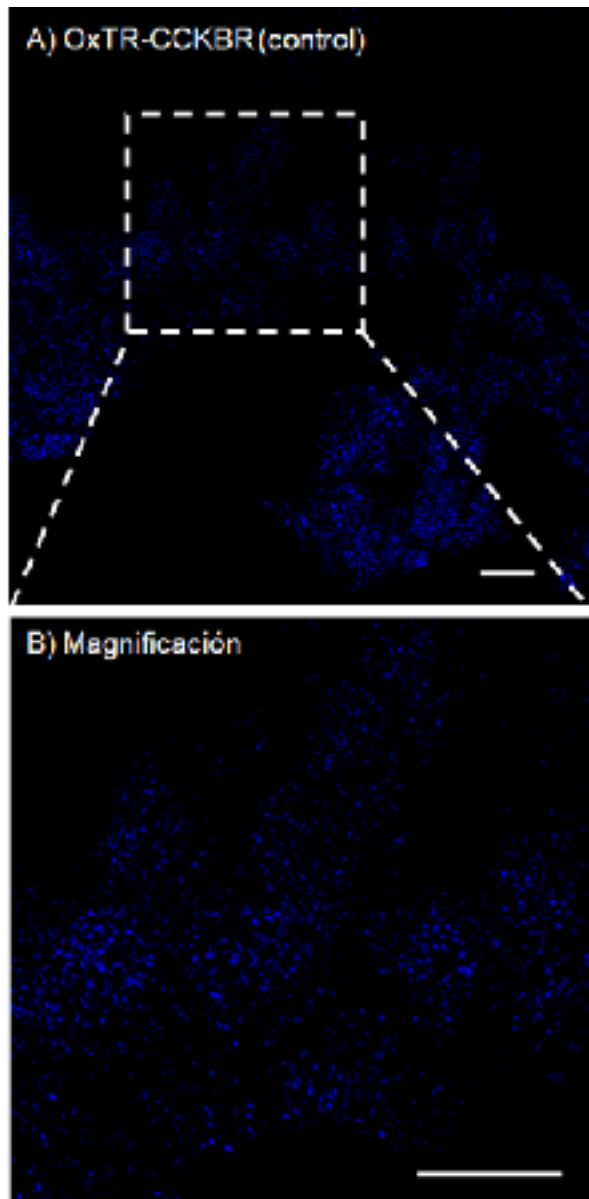
Los resultados de las superposiciones de los espectros de emisión de los fluoróforos en las células HeLa que co-expresaron el OxTR<sup>GFP</sup> y CCKB<sup>YFP</sup> indicaron que las proteínas marcadas con fluorescencia fueron capaces de colocalizar en algunas regiones de la membrana citoplasmática (Figura 8C y 8D). La formación de zonas de color amarillo/naranja producto de la superposición de los espectros de emisión del OxTR marcado con la proteína fluorescente GFP (verde) con el CCKB marcado con proteína fluorescente YFP (rojo) podría sugerir la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB.

Aunque los experimentos de co-localización han aportado las primeras evidencias que sugieren la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB se debe tener en cuenta las limitaciones de esta técnica. Una porción de la co-localización podría deberse a la cercanía del espectro de emisión de los fluoróforos utilizados. Sin embargo, en todos los experimentos realizados se comprobó que no existe un cien por ciento de co-localización y se observaron zonas independientes de color verde (OxTR), de color rojo (CCKB) y de color amarillo/naranja (interacción física de los receptores) (Figura 8D).

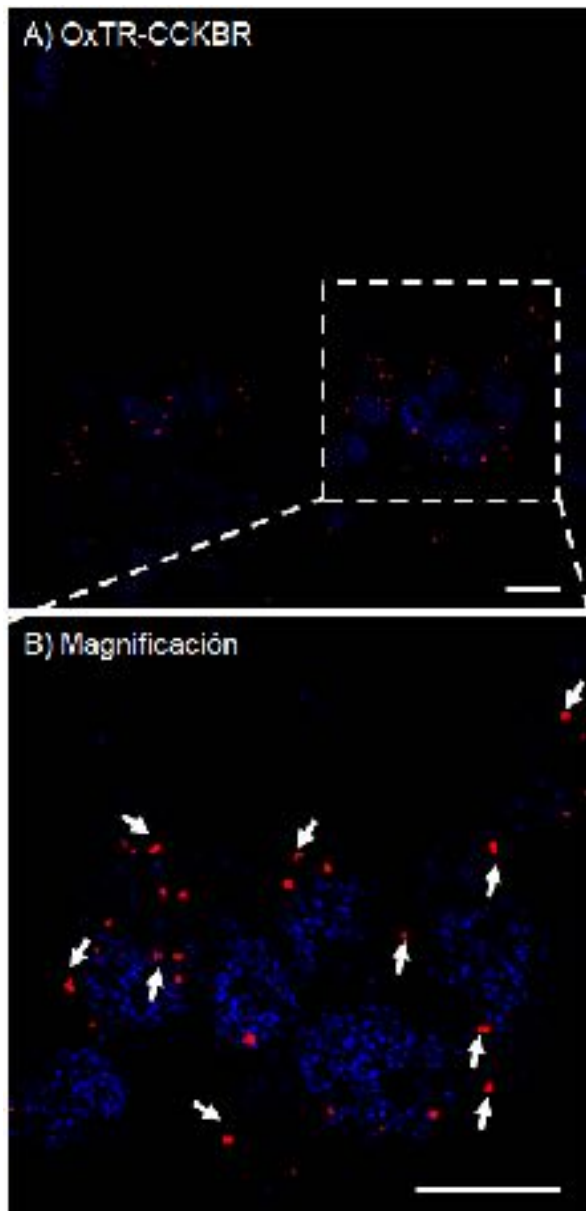


**Figura 8. Co-localización de los receptores de oxitocina y los receptores de colecistocinina B en la membrana citoplasmática de células HeLa que co-expresan ambos receptores.** A) La figura muestra la expresión transiente de los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) en células HeLa que co-expresan OxTR<sup>GFP</sup> y CCKB<sup>YFP</sup>. B) La figura muestra la expresión transiente de los receptores de colecistocinina B marcados con proteínas fluorescentes YFP (rojo) en células HeLa que co-expresan OxTR<sup>GFP</sup> y CCKB<sup>YFP</sup>. C) La formación de zonas de color amarillo/naranja indican la co-localización de los receptores de oxitocina marcados con proteínas fluorescentes GFP (verde) con los receptores de colecistocinina B marcados con proteínas fluorescentes YFP (rojo). D) Magnificación de C, donde las flechas indican la co-localización de los receptores en algunas regiones específicas de la membrana citoplasmática de las células HeLa (amarillo/naranja). También, en C) se pueden apreciar zonas de color verde o rojo que representan receptores que no se encuentran co-localizando. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z, escala=10  $\mu$ m.

Por lo antes expuesto fue necesario comprobar la formación del heteroreceptor mediante otra técnica con un principio diferente. Para ello, se utilizó el ensayo de proximidad de ligando (PLA, *proximity ligation assay*). Actualmente, el PLA es una novedosa herramienta que se basa en la interacción específica de antígeno-anticuerpo y que permite confirmar las interacciones receptor-receptor *ex vivo* e *in vitro*. Si tenemos en cuenta los controles experimentales donde solo se utilizaron los anticuerpos secundarios y no se observó ninguna señal específica (Figura 9), los hallazgos obtenidos muestran puntos de amplificación bien claros, definidos y específicos que confirman *in vitro* la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB en las células HeLa (Figura 10).



**Figura 9. Control del ensayo de proximidad de ligando.** Células co-transfectadas con OxTR<sup>GFP</sup> y CCKB<sup>YFP</sup> A) Células transfectadas sin tratamiento con los anticuerpos primarios e incubadas solo con los anticuerpos secundarios MINUS y PLUS (control). B) Magnificación de A, donde se observa que no hubo amplificaciones inespecíficas en el ensayo de proximidad de ligando. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z, escala =30  $\mu$ m, magnificación 630X.



**Figura 10. Ensayos de proximidad de ligando.** Células co-transfectadas con OxTR<sup>GFP</sup> y CCKB<sup>YFP</sup> A) La figura muestra que la mayoría de las células del campo son positivas B) Magnificación de A, donde las flechas indican la formación de puntos de amplificación que confirman la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB. Las imágenes son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente. Todas las imágenes fueron adquiridas en un solo plano z, escala =30  $\mu$ m, magnificación 630X.

La formación de homodímeros, heterodímeros y mosaicos de interacciones en el cerebro, así como la regulación alostérica que tiene lugar en la interacción receptor-receptor dentro de estos complejos macromoleculares

abren una nueva visión para comprender la fisiología y fisiopatología de estos trastornos mentales. De hecho, estas estructuras representan importantes dianas terapéuticas para el tratamiento de estas patologías (Fuxe et al., 2014a; Fuxe et al., 2014b). Por ello, describir la formación de nuevos heteroreceptores podría consolidar el uso de estos complejos proteicos como una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades.

Este trabajo ha proporcionado las primeras evidencias que demuestran una interacción física entre OxTR y CCKB, lo que sugiere la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB. Con ello, se confirma la capacidad del receptor de oxitocina de establecer heterodímeros con otros miembros de la familia A de receptores de membrana acoplados a proteínas G, tales como el receptor de dopamina D2 (Romero-Fernandez et al., 2013), vasopresina (Terrillon et al., 2003), alfa-adrenérgico (Diaz-Cabiale et al., 2000) o el receptor beta-adrenérgico (Wrzal et al., 2012). Sin embargo, se ha descrito que el receptor de oxitocina es incapaz de heterodimerizar con el receptor de bradiquinina (Devost, Zingg 2004). Como se ha planteado anteriormente, la presencia de éste heteroreceptor no descarta la posible formación de estructuras aún más complejas *in vivo*, pero hacen un acercamiento mayor al entendimiento de la fisiología y fisiopatología de la ansiedad y el miedo. Estos avances en la biología estructural de los GPCR aumentan significativamente las posibles dianas terapéuticas a las cuales dirigir la acción de los fármacos. En base a lo expuesto y conociendo que OxTR es capaz de regular de forma alostérica (positiva) al receptor de dopamina D2 (Fuxe et al., 2014c) y que CCKB posee la capacidad de regular de forma alostérica (negativa) al receptor de dopamina D2 (Dasgupta et al., 1996) se sugiere que en la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB podría existir una regulación alostérica negativa. A través de este hallazgo se puede diseñar la síntesis de un ligando bivalente que se una a ambos receptores potenciando su valor terapéutico. En el año 2013, Le Naour y colaboradores formularon un potente analgésico dirigido a los receptores  $\mu$ -opioide y CB1R. En este sentido, podemos buscar un ligando que active OxTR



e inhiba la actividad de CCKB en el heteroreceptor. O a su vez, elaborar pequeños péptidos de interferencia que bloqueen las interacciones entre estos receptores con el fin de aumentar la respuesta ansiolítica de OxTR ayudando significativamente a personas que padezcan trastornos severos de ansiedad en dependencia de drogas, desórdenes alimenticios o miedo en general. De esta manera el fármaco empleado tendría un efecto antidepresivo más efectivo y actuaría más rápidamente que los utilizados actualmente. Sin embargo, es indispensable corroborar los resultados a través de técnicas y modelos de experimentación que brinden evidencias más contundentes acerca de la naturaleza de la modulación alostérica que se establece entre estos receptores.

## **2. Verificación de hipótesis**

### **Formación del heteroreceptor OxTR/CCKB**

#### **Hipótesis Nula**

No existe la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB *in vitro*.

#### **Hipótesis Alternativa**

Existe la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB *in vitro*.

Una vez concluidos los ensayos de expresión transciente, colocalización y PLA de los receptores de interés, se determinó que OxTR y CCKB colocalizan e interactúan en ciertas áreas de la membrana celular. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa que indica que existe la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **1. Conclusiones**

1. En las condiciones experimentales empleadas las células HeLa son un modelo celular para la expresión heteróloga de los receptores de oxitocina y colecistoquinina B marcados por proteínas fluorescentes.

2. El receptor de oxitocina es capaz de colocalizar con el receptor de colecistocinina B en zonas discretas de la membrana celular cuando ambos receptores se co-expresan en células HeLa, lo que sugiere la formación del heteroreceptor OxTR-CCKB.

3. El ensayo de proximidad de ligando confirmó que el receptor de oxitocina receptor de colecistocinina B co-expresados en células HeLa se encuentran

lo suficientemente cercanos para interactuar de forma física y establecer el heteroreceptor OxTR-CCKB.

## 2. Recomendaciones

Corroborar la formación del heteroreceptor OxTR/CCKB mediante otras técnicas empleadas en el estudio de las interacciones receptor-receptor y que se basan en otros principios químico-físico como los ensayos de transferencia de energía de fluorescencia de Förster (FRET), transferencia de energía de bioluminiscencia (BRET) o la co-inmunoprecipitación.

La formación del heteroreceptor OxTR/CCKB sugiere que podría existir una regulación alostérica entre ambos receptores por lo que se recomienda continuar con ensayos con L- 365,260 antagonista de CCKB, segundos mensajeros o genes reporteros; que permitan dilucidar la naturaleza de la regulación que tiene lugar en la interacción de éstas proteínas de tanta relevancia terapéutica.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas

- AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M., & Quitterer, U. (2001). The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*, 276(43), 39721–39726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105253200> [pii]
- 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
- Bart, G., Vico, N. O., Hassinen, A., Pujol, F. M., Deen, A. J., Ruusala, A., ... Tammi, M. I. (2015). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assays reveal functionally relevant homo-and heteromeric complexes among hyaluronan synthases HAS1 HAS2, and HAS3. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11479–11490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640581>
- Behar R, Barahona M, Iglesias B y Casanova D. (2007). Trastorno depresivo, ansiedad social y su prevalencia en trastornos de la conducta alimentaria. *REV CHIL NEURO-PSIQUIAT*; 45 (3): 211 -220
- 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., Ravani, A., Tarakanov, A. O., Brito, I., Narvaez, M., Romero-Fernandez, W., ... Fuxe, K. (2013). Dopamine D2 receptor signaling dynamics of dopamine D2-neurotensin 1 receptor heteromers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(1), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.058>
- Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Tarakanov, A. O., Marcellino, D., Ciruela, F., Agnati, L. F., & Fuxe, K. (2010). Dopamine D2 and 5-hydroxytryptamine 5-HT2A receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401(4), 605-610. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.110>
- Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Mudó, G., Pérez-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. *Biological Psychiatry*, 71(1), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.09.012>
- 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
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. (2003). Insights into {G} protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.*, 24(6), 765-781. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0026>
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., De Benedetti, P., Goldberg, S. R., ... Franco, R. (2003). Adenosine A2A-dopamine D2receptor-receptor heteromerization: Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46741-46749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306451200>
- Cheng, Z. J., Harikumar, K. G., Holicky, E. L., & Miller, L. J. (2003). Heterodimerization of Type A and B Cholecystokinin Receptors Enhance Signaling and Promote Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52972-52979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310090200>
- Damian, M., Martin, A., Mesnier, D., Pin, J.-P., Banères, J.-L., Bae, H., ... Li, X. (2006). Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *The EMBO Journal*, 25(24), 5693-5702. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601449>
- Dasgupta, S., Li, X. M., Jansson, A., Finnman, U. B., Matsui, T., Rinken, A., ... Fuxe, K. (1996). Regulation of dopamine D2 receptor affinity by cholecystokinin octapeptide in fibroblast cells cotransfected with human CCKB and D2L receptor cDNAs. *Molecular Brain Research*, 36(2), 292-299. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00283-X](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00283-X)
- Daugé V, Léna I (1998) CCK in anxiety and cognitive processes. *Neurosci Biobehav Rev* 22:815-825
- David Andreu. (1997). Colecistoquinina (CCK) y dolor: Interacción con el sistema opioide. *Péptidos en biología y biomedicina*. 325-332
- Devost, D., & Zingg, H. H. (2004). Homo- and hetero-dimeric complex formations of the human oxytocin receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(4), 372-377. <https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01188.x>

- Di Wen, Meiling An, Hongyan Gou, Xia Liu, LiLiu, Chunling Ma, Bin Cong. (2016). Cholecystinin-8 inhibits methamphetamine-induced neurotoxicity via an anti-oxidative stress pathway. *Neurotoxicology*, 31-38
- Díaz-Cabiale, Z., Petersson, M., Narváez, J. A., Uvnäs-Moberg, K., & Fuxe, K. (2000). Systemic oxytocin treatment modulates alfa 2-adrenoceptors in telencephalic and diencephalic regions of the rat. *Brain Research*, 887(2), 421–425. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03017-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03017-1)
- Dufresne, M., Seva, C., & Fourmy, D. (2006). Cholecystinin and gastrin receptors. *Physiological Reviews*, 86(3), 805–847. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2005>
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C., & Luthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, 62(6), 757-771. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.026
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D., Fisone, G., Agnati, L. F., & Tanganelli, S. (2014a). 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. (2014b). 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., Borroto-Escuela, D. O., Tarakanov, A. O., Romero-Fernandez, W., Ferraro, L., Tanganelli, S., ... Agnati, L. F. (2014c). Dopamine D2 heteroreceptor complexes and their receptor-receptor interactions in ventral striatum: Novel targets for antipsychotic drugs. *Progress in Brain Research*, 211, 113–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63425-2.00005-2>
- 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
- Frankland PW, Josselyn SA, Bradwejn J, Vaccarino FJ, Yeomans JS (1997) Activation of amygdala cholecystinin B receptors potentiates the acoustic startle response in the rat. *J Neurosci* 17:1838–1847
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272.
- Galandrin, S., Oligny-Longpré, G., & Bouvier, M. (2007, August). The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.005>
- George, S. R., O'Dowd, B. F., & Lee, S. P. (2002, October). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd913>
- Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casado, V., Canela, E. I., ... Franco, R. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting

- heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8606–8611. <https://doi.org/10.1073/pnas.150241097>
- Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., ... Devi, L. A. (2010). Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Science Signaling*, 3(131). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000807>
- Harro J, Vasar E, Bradwejn J (1993) Cholecystokinin in animal and human research of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 14:244–249
- Hashimoto, H., Onaka, T., Kawasaki, M., Chen, L., Mera, T., Soya, A., ... Ueta, Y. (2005). Effects of cholecystokinin (CCK)-8 on hypothalamic oxytocin-secreting neurons in rats lacking CCK-A receptor. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 121(1–2), 16–25.
- Hebert, T. E., Moffett, S., Morello, J. P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., & Bouvier, M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 16384–16392. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16384>
- Hur, E. M., & Kim, K. T. (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: Achieving rapidity and specificity. *Cellular Signalling*. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00258-3](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00258-3)
- Izumi T, Inoue T, Tsuchiya K, Hashimoto S, Ohmori T, Koyama T (1996) Effect of the selective CCKB receptor antagonist LY288513 on conditioned fear stress in rats. *Eur J Pharmacol* 300:25–31
- Jastrzebska, B., Chen, Y., Orban, T., Jin, H., Hofmann, L., & Palczewski, K. (2015). Disruption of rhodopsin dimerization with synthetic peptides targeting an interaction interface. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42), 25728–25744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662684>
- Jeffery, C. J. (1999, January 1). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01335-8)
- Jordan, B. A., & Devi, L. A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399(6737), 697–700. <https://doi.org/10.1038/21441>
- 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
- Katona, István, Rancz, Ede A., Acsády, László, Ledent, Catherine, Mackie, Ken, Hájos, Norbert, & Freund, Tamás F. (2001). Distribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Amygdala and their Role in the Control of GABAergic Transmission. *The Journal of Neuroscience*, 21, 9506-9518.
- Koch, S. B., van Zuiden, M., Nawijn, L., Frijling, J. L., Veltman, D. J., & Olf, M. (2015). Intranasal Oxytocin Administration Dampens Amygdala Reactivity towards Emotional Faces in Male and Female PTSD Patients. *Neuropsychopharmacology*. doi: 10.1038/npp.2015.299
- Koks S, Pekka T, Bourin M, Shlik J, Vasar V y Vasar E, (2000). Cholecystokinin-induced anxiety in rats: relevance of pre-experimental stress and seasonal variations. *J Psychiatry Neurosci* 2000;25(1):33-42.
- Kovacs GL, Sarnyai Z, Szabo G. (1998). Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinology*; 23: 945-62.
- Landgraf, R. (2005). Neuropeptides in anxiety modulation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 169, 335–369. <https://doi.org/10.1007/3-540-28082-0-12>
- 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
- Latif, R., Graves, P., & Davies, T. F. (2002). Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45059–45067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206693200>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23, 155-184. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155
- Le Naour, M., Akgun, E., Yekkirala, A., Lunzer, M. M., Powers, M. D., Kalyuzhny, A. E., & Portoghese, P. S. (2013). Bivalent ligands that target mu opioid (MOP) and cannabinoid1 (CB1) receptors are potent analgesics devoid of tolerance. *J Med Chem*, 56(13), 5505-5513. doi: 10.1021/jm4005219
- 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
- Marc J. Berna, & Robert T. Jensen. (2007). Role of CCK/Gastrin Receptors in Gastrointestinal/Metabolic Diseases and Results of Human Studies Using Gastrin/CCK Receptor Agonists/Antagonists in these Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(12), 1211–1231. <https://doi.org/10.2174/156802607780960519>
- Martin, Elizabeth I., Ressler, Kerry J., Binder, Elisabeth, & Nemeroff, Charles B. (2010). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30, 865-891. doi: 10.1016/j.cl.2010.07.006
- Mary, S., Fehrentz, J.-A., Damian, M., Verdié, P., Martinez, J., Marie, J., & Banères, J.-L. (2013). How ligands and signalling proteins affect G-protein-coupled receptors' conformational landscape. *Biochemical Society Transactions*, 41, 144–7. <https://doi.org/10.1042/BST20120267>
- Neumann, I., Landgraf, R., Takahashi, Y., Pittman, Q. J., & Russell, J. A. (1994). Stimulation of oxytocin release within the supraoptic nucleus and into blood by CCK-8. *Am J Physiol*, 267(6 Pt 2), R1626-31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7810774>
- 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
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there ? *Discovery*, 5(12), 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>
- 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
- Pellissier, L. P., Barthet, G., Gaven, F., Cassier, E., Trinquet, E., Pin, J. P., ... Claeysen, S. (2011). G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: Evidence that turning on two protomers is more efficient. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 9985–9997. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.201939>
- Pérez-Betancourt Y, Manjarrez-Raza I, Carvajal-Tapia C, Tayo-Montenegro A, Garcia-Barcelo M, & Romero-Fernandez W. (2017). Evidencias biofísicas de la formación del heterómero entre el receptor de oxitocina y el receptor de serotonina 1A. *Invest Clin* 58(4): 352 - 364.

- Pérez-Betancourt Y, Carvajal-Tapia C, Manjarrez-Raza I, Tayo-Montenegro A, Garcia-Barcelo M, & Romero-Fernandez W. (2017). Regulación alostérica en el heteroreceptor oxitocina-cannabinoide CB1: Una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de trastornos de ansiedad. Universidad Técnica de Ambato.
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., & Lefkowitz, R. J. (2010, May). Teaching old receptors new tricks: Biasing seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd3024>
- Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C., & Patel, Y. C. (2000). Receptors for dopamine and somatostatin: Formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, 288(5463), 154–157. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.154>
- 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
- 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/bne000007
- Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M. A., Taulan, M., ... Bouvier, M. (2003). Oxytocin and Vasopressin V1a and V2 Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers during Biosynthesis. *Molecular Endocrinology*, 17(4), 677–691. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0222>
- Thompson, G. L., Kelly, E., Christopoulos, A., & Canals, M. (2015). Novel GPCR paradigms at the  $\mu$ -opioid receptor. *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.12600>
- Trifilieff, P., Rives, M. L., Urizar, E., Piskowski, R. A., Vishwasrao, H. D., Castrillon, J., ... Javitch, J. A. (2011). Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: Endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *BioTechniques*, 51(2), 111–118. <https://doi.org/10.2144/000113719>
- 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
- Viveros, M. P., Marco, Eva M., & File, Sandra E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81, 331-342. doi: 10.1016/j.pbb.2005.01.029
- 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.138.7.525
- Wrzal, P. K., Devost, D., Pétrin, D., Goupil, E., Iorio-Morin, C., Laporte, S. A., ... Hébert, T. E. (2012). Allosteric interactions between the oxytocin receptor and the beta 2-adrenergic receptor in the modulation of ERK1/2 activation are mediated by heterodimerization. *Cellular Signalling*, 24(1), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.020>
- Yosten, G. L. C., & Samson, W. K. (2010). The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(6), R1642-7. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00804.2009>
- Zhang, R., & Xie, X. (2012, March). Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.173>
- Zhang, Y., DeVries, M.E., and Skolnick, J. (2006). Structure modeling of all identified G protein-coupled receptors in the human genome. *Plos Comput. Biol.* 2, 88-99