

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Área BIOLOGÍA

Sub-área Neurociencias

**ESTUDIO DEL SISTEMA DE LA HORMONA CONCENTRADORA DE
MELANINA EN LOS NÚCLEOS DEL RAPE: IMPLICANCIAS EN LA
DEPRESIÓN Y LA ANSIEDAD**

MSc. Jessika Urbanavicius

Orientadora: Dra. Patricia Lagos

Co-Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Departamento de Neurofarmacología Experimental y

Laboratorio de Biología Celular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
PRESENTACIÓN DE LA TESIS	5
I. INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES GENERALES	6
1. Depresión Mayor (DM).....	6
2. Núcleos del Rafe	9
2.1. <i>Anatomía del Núcleo Dorsal del Rafe (NDR)</i>	11
2.2. <i>Propiedades electrofisiológicas y control funcional de las neuronas 5-HTérgicas del NDR</i>	14
2.3. <i>Anatomía del Núcleo Mediano del Rafe (NMR)</i>	16
2.4. <i>Propiedades electrofisiológicas y control funcional de las neuronas 5-HTérgicas del NMR</i>	17
2.5. <i>NDR y NMR como base neurobiológica de la DM</i>	18
3. Sistema de neurotransmisión de la Hormona Concentradora de Melanina (MCH)	20
3.1. <i>Origen y estructura</i>	20
3.2. <i>Anatomía del sistema MCHérgico</i>	21
3.3. <i>Receptores</i>	26
3.4. <i>Propiedades electrofisiológicas y control funcional de las neuronas MCHérgicas</i>	29
3.5. <i>Participación de la MCH en funciones fisiológicas</i>	30
ANTECEDENTES PARTICULARES	35
1. Efectos de MCH en los núcleos del rafe sobre el sueño REM y su relación con DM	35

2. Efectos de MCH en el NDR sobre respuestas comportamentales tipo-depresivas	37
II. HIPÓTESIS.....	42
III. OBJETIVO GENERAL	42
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
V. MATERIALES y MÉTODOS.....	44
1. Animales	44
2. Drogas y vías de administración	44
3. Cirugía estereotáxica	45
4. Administración de las drogas intra-NDR y NMR	45
5. Modelos conductuales	46
6. Localización de la cánula guía-microinyección	51
7. Ensayos de Inmunofluorescencia	52
8. Microdiálisis intracerebral	55
9. Análisis de datos.....	57
VI. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	58
CAPÍTULO I	59
CAPÍTULO II	63
VII. CONCLUSIONES GENERALES	65
VIII. PERSPECTIVAS.....	67
IX. REFERENCIAS.....	69
X. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.....	91

ABREVIATURAS

5-HIAA: Ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT: Serotonina

5-HTérgico: Serotoninérgico

8-OH-DPAT: 8-Hidroxi-2-dipropilaminotetralina

ACh: Acetilcolina

Am: Amígdala

ATV: Área Tegmental Ventral

CA: Campo abierto

CC: Corteza Cingulada

CE: Cuerpo Estriado

CO: Corteza Orbital

CPF: Corteza Prefrontal

CRF: Factor liberador de corticotrofina

DM: Depresión Mayor

Flx: Fluoxetina

GAD: Glutamato decarboxilasa

GE: Neuropeptido GE

Hc: Hipocampo

Hp: Hipotálamo

HPLC-DE: Cromatografía Líquida de alta resolución-detección electroquímica

ISRN: Inhibidor selectivo de la recaptación de Noradrenalina

ISRS: Inhibidor selectivo de la recaptación de Serotonina

LC: *Locus coeruleus*

LCE: Laberinto en cruz elevado

LCRa: Líquido cefalorraquídeo artificial

LDT: Núcleo Laterodorsal Tegmental

MCH: Hormona concentradora de melanina

NA: Noradrenalina

NAérgico: Noradrenérgico

NAcc: Núcleo *Accumbens*

NDR: Núcleo Dorsal del Rafe

NEI: Neuropéptido *glutamic-iso-leucine*

NMR: Núcleo Medial del Rafe

Nor: Nortriptilina

NPY: Neuropéptido Y

NST: Núcleo Subtalámico

PFA: Paraformaldehído

PPT: Núcleo Pedunculopontino

SERT: Transportador de Serotonina

SN: *Substantia nigra*

SNC: Sistema Nervioso Central

SP: Sustancia P

TNF: *Test* de nado forzado

TPH: Triptofano hidroxilasa

La hormona concentradora de melanina (MCH), es un neuropéptido hipotalámico clásicamente implicado en el control de la homeostasis energética. Sin embargo, desde hace algunos años se lo vincula con la regulación de los estados emocionales. Aquellas regiones, circuitos y mecanismos celulares implicados en el papel de la MCH en dicha regulación continúan bajo estudio.

Las neuronas MCHérgicas proyectan densamente a los núcleos dorsal y medial del rafe (NDR y NMR) asociados a la fisiopatología de la depresión y al mecanismo de acción de fármacos antidepresivos. No obstante, aún es limitada la caracterización de la innervación MCHérgica a nivel celular y las consecuencias funcionales de ésta innervación. En trabajos previos, hemos reportado que la microinyección de MCH intra-NDR induce en ratas, conductas tipo-depresivas en el *test* de nado forzado (TNF) y ese efecto se bloquea con el pre-tratamiento de Fluoxetina, un antidepresivo serotoninérgico (5-HTérgico), indicando que una modulación MCHérgica en el NDR está implicada en la aparición de conductas tipo-depresivas, reclutando además un mecanismo 5-HTérgico.

En primer lugar, en este trabajo de tesis se avanzó en la caracterización farmacológica del efecto comportamental tipo-depresivo inducido por MCH en el NDR, extendiéndola al NMR. Además, se estudió la distribución de la innervación MCHérgica en cuatro sectores diferentes en la extensión rostro-caudal del NDR y sobre dos de sus principales tipos celulares: 5-HTérgicos y GABAérgicos. Debido a la implicancia 5-HTérgica en las acciones mediadas por MCH, se evaluó el efecto de MCH sobre los niveles extracelulares de 5-HT en el NDR.

Los resultados comportamentales evaluados en el TNF demostraron que la microinyección de MCH intra-NDR indujo el esperado efecto pro-depresivo, el cual fue dosis- y tiempo-dependiente. El mismo fue mediado por el receptor 1 de MCH, confirmando la especificidad de acción de la MCH. Además, el efecto pro-depresivo, se bloqueó luego del pre-tratamiento con un antidepresivo con mecanismo de acción noradrenérgico, sugiriendo la participación de otro sistema de neurotransmisión en la acción de MCH. Una respuesta tipo pro-depresiva

también se observó luego de la microinyección de MCH intra-NMR, aunque se evidenciaron algunas diferencias en la eficacia, en relación a la respuesta observada en el NDR. Dado que un estado depresivo se asocia frecuentemente con la aparición de ansiedad, observamos que la microinyección de MCH intra-NDR, a la misma dosis y tiempo que genera el efecto pro-depresivo, no modificó ningún parámetro de ansiedad evaluado en el modelo de laberinto en cruz elevado.

Los estudios morfológicos por inmunofluorescencia demostraron que las fibras MCHérgicas se distribuyeron de manera homogénea en toda la extensión rostro-caudal del NDR y establecen aposiciones con neuronas 5-HTérgicas en todas las subregiones analizadas. En las alas laterales, las fibras MCHérgicas también establecen contactos con las neuronas GABAérgicas. Dada la proximidad anatómica entre las fibras MCHérgicas y ambos tipos celulares del NDR y la naturaleza inhibitoria de MCH, es posible especular que existen contactos sinápticos directos y que MCH estaría inhibiendo de manera directa ambos tipos neuronales. Mediante el uso de la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo*, la perfusión intra-NDR de MCH indujo un efecto opuesto sobre los niveles extracelulares de 5-HT: una concentración baja disminuyó los niveles, mientras que una concentración mayor los aumentó. Estos resultados sostienen la hipótesis de que el sistema MCHérgico modularía directa e indirectamente (vía GABA) la transmisión 5-HTérgica del NDR.

Esta tesis aporta información relevante sobre la conectividad anatómica y funcional del sistema MCHérgico hipotalámico a nivel de los NDR y NMR. A su vez, los resultados favorecen la hipótesis de que una alteración en el sistema MCHérgico podría estar en la base fisiopatológica de la depresión.

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

La depresión mayor (DM) es una patología psiquiátrica altamente prevalente en la población general. Según la Organización Mundial de Salud, es la segunda causa de invalidez en los países industrializados y se estima que para el año 2030 será la primera causa de invalidez por enfermedad a nivel mundial.

Desde hace varias décadas esta patología es objeto de estudio en el marco de la investigación clínica y pre-clínica, habiéndose obtenido significativos avances en el conocimiento sobre las alteraciones neuroquímicas, anatómicas y genéticas que la subyacen. Sin embargo, aún existen grandes preguntas sin responder sobre su etiología y patogénesis.

Por otro lado, si bien se ha avanzado en la terapéutica, aún existe un número elevado de pacientes resistentes a los tratamientos, una limitada eficacia terapéutica de los mismos y aún no se ha resuelto el retraso en la aparición de su efecto terapéutico. En este contexto, comprender cómo el sistema de la hormona concentradora de melanina (MCH) inerva particularmente los núcleos del rafe, especialmente asociados a la neurobiología de la depresión, es fundamental para identificar nuevas modulaciones y mecanismos asociados a ésta patología y a su tratamiento.

En base a evidencias propias y en concordancia con lo reportado por otros autores, esta tesis aporta información que lleva a proponer que una alteración en el sistema de transmisión neuropeptídico de la MCH en el rafe estaría implicado en la fisiopatología de la depresión.

ANTECEDENTES GENERALES

1. Depresión Mayor (DM)

La depresión mayor (DM) es una patología psiquiátrica que se caracteriza por la pérdida de experimentar placer por estímulos normalmente reforzadores o el interés por realizar actividades que habitualmente provocan placer (anhedonia), tristeza o desesperanza, culpa e irritabilidad. Para su diagnóstico, son importantes dos de los signos utilizados en la clínica, como lo son la falta de experimentar placer o el estado de ánimo depresivo, los que deben estar presentes por un período de tiempo de al menos dos semanas. Estos, a su vez, se acompañan de síntomas tales como, cambios en el peso corporal, trastornos del sueño, fatiga, falta de concentración e ideas recurrentes de muerte (diagnóstico según el Manual de la Asociación Americana de Psiquiatría, 1994; DSM-IV). La DM es una enfermedad crónica, con altas tasas de recaídas y puede afectar profundamente la calidad de vida de los individuos que la padecen, llegando a ser en muchos casos, invalidante (Fava y Kendler, 2000; Palazidou 2012).

La DM posee una prevalencia de vida de 10-15 %, en la población general siendo mayor su prevalencia en mujeres (Mandelli y Seretti, 2013). Actualmente, es la segunda causa de invalidez por enfermedad a nivel mundial y la Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2030, será la principal causa de invalidez por enfermedad en el mundo (Mathers y Loncar, 2006; Ferrari y cols., 2013; Willner y cols., 2013). Constituye además un factor de riesgo para el desarrollo de otras patologías tales como enfermedades cardiovasculares y diabetes, entre otras (Palazidou 2012; Alvarez y cols., 2014). Su relevancia aumenta aún más debido a su estrecha relación con el suicidio. Estudios epidemiológicos demuestran que un 15-20 % de los pacientes con DM severa

comete suicidio y que la DM es la principal causa de muerte por suicidio, dando cuenta de aproximadamente el 50 % de los mismos (Miret y cols., 2013; Willner y cols., 2013; Ferrari y cols., 2013).

En Uruguay, la DM es la patología tratada con mayor frecuencia en el Departamento de Psiquiatría de la Facultad de Medicina-UdelaR (Díaz y Ruiz, 2002). Esta patología y su estrecha vinculación con el suicidio, constituyen un tema crítico en la salud pública del Uruguay, ya que es el país Sudamericano (y segundo en Latinoamérica) con mayor prevalencia de suicidios alcanzando niveles de 12.1 en cien mil habitantes (correspondiente a 559 muertes) en el año 2010 (Ministerio de Salud Pública (MSP)-Estadísticas Vitales, 2013; Plan Nacional de Prevención de Suicidio 2011-2015, MSP; Montalbán, 2003; WHO 2014).

La DM posee un alto porcentaje de co-morbilidad con trastornos de ansiedad; un 40-70 % de pacientes depresivos presentan ambos trastornos (Fava y cols., 2008; Palazidou, 2012; Wu y Fang 2014). Aunque la ansiedad es una característica inherente a la conducta humana, la cual sirve como respuesta de vigilancia ante una amenaza o estímulos aversivos, puede convertirse en patológica cuando la respuesta al estímulo se vuelve exagerada, irracional, perturbada e interfiere con el funcionamiento normal del individuo (Millan, 2003; Nutt y Stein, 2006). Los trastornos de ansiedad se caracterizan por la aparición de síntomas como anticipación aprensiva de un daño o desgracia futuros, disforia, preocupación desmedida que son acompañados por agitación, trastornos del sueño, síntomas somáticos de tensión y palpitaciones (Tyrer y Baldwin, 2006). Es importante mencionar que varios de estos síntomas son compartidos con los que aparecen en la DM. Esto genera dificultades en el momento de establecer un correcto diagnóstico debido a la existencia de síntomas similares en ambos trastornos y, por lo tanto en establecer un tratamiento adecuado (Nutt, 2000; Wu y Fang, 2014).

Actualmente, la etiología de la DM es desconocida. Estudios epidemiológicos demuestran que el factor genético aporta un 30-40 % de la vulnerabilidad a padecer esta patología (Willner y cols., 2013; Mandelli y Seretti, 2014). Sumado a esto, factores, tales como, situaciones de estrés o traumas emocionales en etapas

tempranas de la vida conforman factores de riesgo para esta patología (Kendler y cols., 2001; Slavich y cols., 2011; Willner y cols., 2013). A su vez, ha sido demostrado en adultos que eventos estresantes están fuertemente relacionados con la DM, sin embargo, el estrés *per se* no es suficiente para causarla. En este sentido, la asociación entre el factor genético el cual puede otorgar vulnerabilidad a padecer esta enfermedad puede ser determinante para la respuesta frente a diferentes situaciones estresantes y por lo tanto para el desarrollo de la patología.

La terapéutica para la DM incluye estrategias tales como, ciertos tipos de psicoterapia, terapia electroconvulsiva o psicofármacos (Holtzheimer y Nemeroff, 2006). Actualmente, el tratamiento farmacológico de primera línea utilizado para la DM, se basa en el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS; NICE 2004; 2009; Walker, 2013). Estos, actúan principalmente mediante el bloqueo selectivo del transportador de serotonina (SERT) y su acción se traduce en un aumento de la neurotransmisión serotoninérgica, que coincide con la aparición del efecto terapéutico (Blier y de Montigny 1994; Adell y cols., 2005). Entre los ISRS más comunes se incluyen la fluoxetina (Flx), fluvoxamina, paroxetina, sertralina, escitalopram y citalopram (Walker, 2013). Inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRN; reboxetina), o fármacos con acción dual, es decir que inhiben la recaptación de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA; venlafaxina) son utilizados también en la clínica (Berton y Nestler, 2006; Holtzheimer y Nemeroff, 2006; Cipriani y cols., 2009). Todos estos fármacos median sus acciones a través de mecanismos similares, modulando principalmente la transmisión monoaminérgica. Además, existen tratamientos basados en la combinación de fármacos como ISRS y benzodiazepinas (fármacos de primera línea utilizados para el tratamiento de la ansiedad) o antidepresivos y antipsicóticos y/o estabilizadores de humor con el fin de aumentar la eficacia terapéutica (Nutt y Stein, 2006; Shelton y cols., 2001; Thase y cols., 2007, Carvalho y cols., 2014).

Sin embargo, el tratamiento farmacológico de la DM posee serias limitaciones dado que un número significativo de pacientes (30-40 %) no responde completamente a los tratamientos disponibles, otro porcentaje mantiene algunos

síntomas depresivos residuales, mientras que otros no toleran el tratamiento (Walker, 2013). Por otra parte, la aparición de efectos secundarios tales como, alteraciones gastrointestinales, insomnio, nerviosidad, agitación y disfunción sexual, entre otros, complica el tratamiento, dado que puede llevar al paciente a la discontinuidad del mismo a pesar de que algunos de estos síntomas pueden ser tolerables o limitados en el tiempo (Mackay y cols., 1999; Montgomery y cols., 2002). Sumado a esto, uno de los problemas más graves y que permanece aún sin solución, es el retraso en la aparición del efecto terapéutico de los antidepresivos (Artigas, 2013; Walker, 2013). En este contexto, la búsqueda de nuevos blancos de acción con potencial terapéutico resulta de gran relevancia. A su vez, la profundización en el estudio de las bases neurobiológicas y los mecanismos implicados en la regulación de los estados emocionales es de enorme importancia para comprender sus posibles alteraciones en condiciones patológicas.

La modulación de la transmisión 5-HTérgica como mecanismo de acción principal de los antidepresivos ISRS constituyó una evidencia fundamental para involucrar a este sistema en la neurobiología de base de la depresión. Teniendo en cuenta que el sistema 5-HTérgico tiene su origen en los núcleos del rafe, el papel de estos núcleos en la base neurobiológica de la DM ha sido profundamente estudiado.

2. Núcleos del Rafe

La región del rafe está conformada por un conjunto discreto de núcleos ubicados en el cerebro medio posterior, siendo el núcleo dorsal (NDR) y el medial del rafe (NMR) los que concentran la mayoría de las neuronas que sintetizan 5-HT en el sistema nervioso central (SNC; Dahlström y Fuxe, 1964; Jacobs y Azmitia, 1992; Lowry, 2008).

El NDR y NMR constituyen la principal vía de proyección 5-HTérgica hacia diversas regiones del cerebro tanto de humanos como roedores (Fig. 1 A y B; Törk 1990; Jacobs y Azmitia, 1992; Adell y cols., 2002).

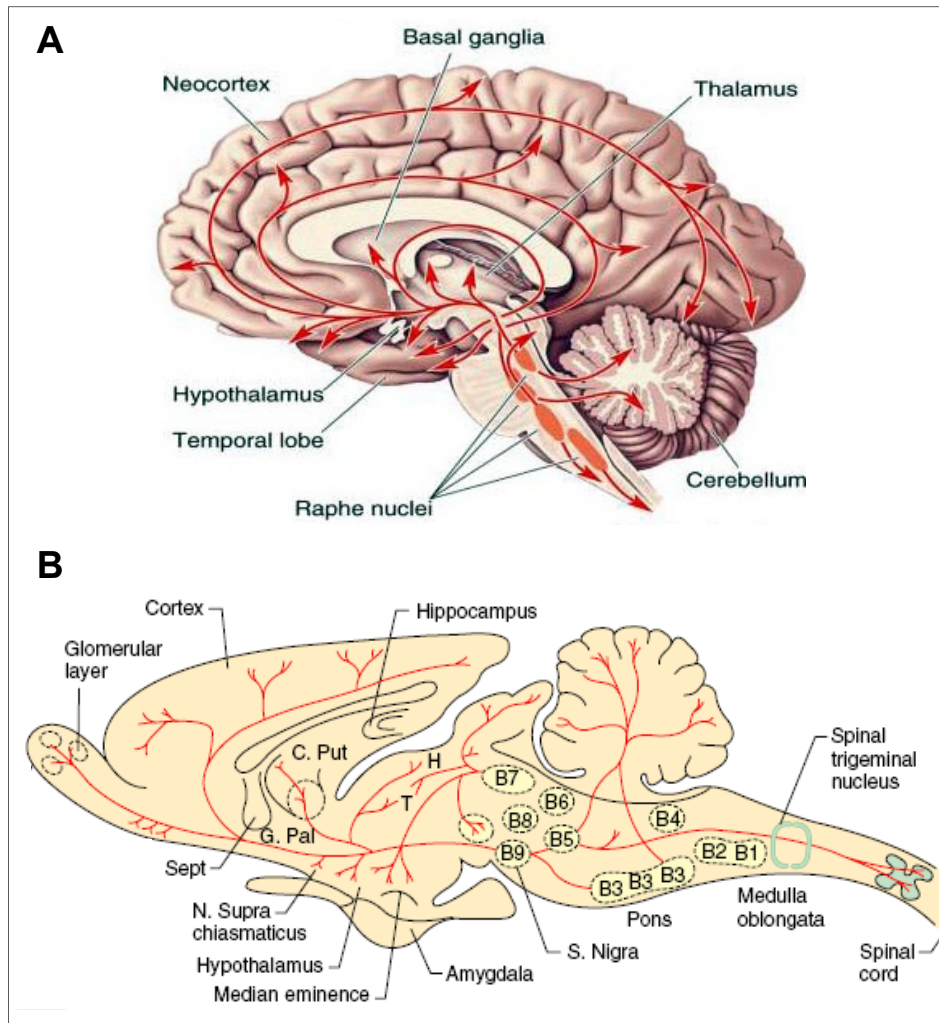


Figura 1. A- Esquema de la localización de las neuronas 5-HTérgicas y sus principales proyecciones en un corte sagital de encéfalo humano. **B-** Esquema de la localización de los grupos celulares serotoninérgicos (B1-B9) y sus principales proyecciones, en un corte sagital de cerebro de rata. B1: Núcleo del rafe *pallidus* y Médula caudal ventrolateral; B2: Núcleo del rafe *obscurus*; B3: Núcleo del rafe *magnus*; Médula rostral ventrolateral y Núcleo paragigantocelular reticular lateral; B4: Región gris central de la médula *oblongata*; B5: Núcleo del rafe pontino; B6: Región caudal del Núcleo dorsal del rafe, B7: Núcleo dorsal del rafe; B8: Núcleo mediano del rafe; B9: *Lemniscus* medial; Núcleo *pontis-oralis*, subdivisión lateral del Núcleo interpeduncular y subdivisión apical del Núcleo interpeduncular: Abreviaciones: G. Pal: *globus pallidus*; C.Put: Núcleo caudado-putamen; T: tálamo; H: habénula; Sept: *Septum*. Tomado y modificado de Hensler JG. en Basic Neurochemistry 7th Ed. 2006.

El primer mapeo de la localización de las neuronas y fibras 5-HTérgicas en el SNC de la rata fue realizado por Dahlström y Fuxe en 1964, mediante la técnica de histofluorescencia de Falck-Hillarp. Estos autores describieron 9 grupos de neuronas 5-HTérgicas designados con la nomenclatura B1-B9, las cuales envían proyecciones a casi todas las regiones del SNC que van desde la médula espinal y el cerebelo hasta la corteza cerebral (Fig. 1B).

Por su proyección difusa hacia numerosas regiones del SNC, este sistema de neurotransmisión juega un papel importante en el control de varios procesos fisiológicos tales como, control de la ingesta y termorregulación, funciones motoras, aprendizaje y memoria, regulación del ciclo sueño-vigilia, respuesta al estrés y regulación del humor (Portas y cols., 2000; Lowry, 2008; Monti 2010a; Hale y Lowry 2011). A su vez, una disfunción del sistema 5-HTérgico ha sido asociado con la aparición de comportamientos agresivos, a la base neurobiológica de la depresión y a los trastornos de ansiedad, entre otros (Blier y de Montigny, 1999; Graeff et al., 1996; Abrams et al., 2004; Ferrari y cols., 2005).

2.1. Anatomía del Núcleo Dorsal del Rafe (NDR)

El NDR (B6 y B7; Fig. 1B) de rata agrupa el mayor número de neuronas 5-HTérgicas del SNC y ha sido uno de los más estudiados (10.000-15.000; Dahlstrom y Fuxe 1964; Descarries y cols., 1982; Jacobs and Azmitia, 1992; Vertes y Crane 1997).

En base a la distribución de este tipo neuronal, el NDR se puede dividir en cuatro sectores en su extensión rostro-caudal: rostral, medial-rostral, medial-caudal y caudal (Fig. 2). A su vez, en el eje dorso-ventral se pueden identificar cuatro *clusters* principales donde se localizan las neuronas: dorsal, ventral y las alas laterales o *lateral wings* bilaterales (Fig. 2 A-D; Hale y Lowry 2011; Calizo y cols., 2011; Vasudeva y cols., 2011).

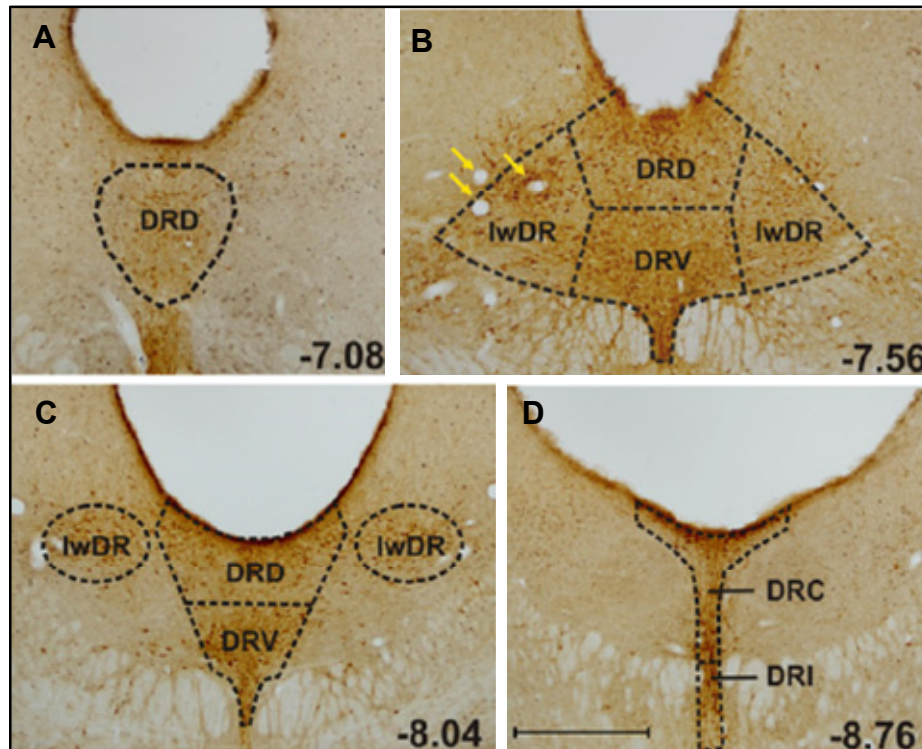


Figura 2. Distribución de las neuronas 5-HTérgicas en la extensión rostro-caudal del NDR. Fotomicrografías de cortes coronales de cerebro de rata inmunomarcados para la detección de la enzima triptofano hidroxilasa (limitante en la síntesis de 5-HT). A-D muestran los cuatro sectores rostro-caudales del NDR determinados en relación a las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson; **A-** Rafe rostral; **B-** medial-rostral; **C-** medial-caudal y **D-** rafe caudal. Las líneas punteadas delimitan las diferentes sub-divisiones del NDR en el sentido dorso-ventral y lateral. DRD: rafe dorsal; DRV: rafe ventral; DRC: rafe caudal; DRI: rafe interfascicular y lwDR: alas laterales. Las flechas amarillas muestran vasos sanguíneos de gran calibre que sirven como referencia para localizar el límite entre las lwDR y la Sustancia gris periacueductal ventral. Barra de calibración 300 µm. Tomado y modificado de Spiacci y cols., 2012.

El NDR, contiene además neuronas no 5-HTérgicas, clasificadas como glutamatérgicas, dopaminérgicas, GABAérgicas y nitrérgicas (Stamp y Semba 1995; Lowry y cols., 2008, Calizo y cols., 2011). En particular, las neuronas GABAérgicas constituyen una de las poblaciones mayoritarias en el núcleo luego de las 5-HTérgicas y si bien se distribuyen a lo largo de todo el núcleo, se concentran fundamentalmente en las alas laterales (lwDR; Stamp y Semba 1995; Calizo y cols., 2011). La naturaleza neuroquímica del rafe es variada, dado que

además de los neurotransmisores clásicos, se ha descrito que en las neuronas del NDR se expresan una gran variedad de neuropéptidos tales como, galanina, el factor liberador de corticotrofina (CRF), neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP) y somatostatina, entre otros (Lowry y cols., 2008; Monti, 2010b). A su vez, las neuronas 5-HTérgicas pueden co-localizar con otros neurotransmisores como glutamato y óxido nítrico o con neuropéptidos (galanina, CRF; Calizo y cols., 2011; Vasudeva y cols., 2011) aunque, parecen no co-localizar con GABA (Stamp y Semba 1995; Calizo y cols., 2011).

Las proyecciones del NDR poseen una organización topográfica. La región rostral del rafe proyecta a estructuras motoras tales como el cuerpo estriado (CE), la *Substantia nigra* (SN), núcleo subtalámico (NST) y la corteza motora. A su vez, el rafe medial (rostral y caudal) envía proyecciones al núcleo *accumbens* (NAcc), la corteza prefrontal (CPF), el tálamo (posterior lateral y ventral), hipocampo (Hc) e hipotálamo (Hp) ventromedial mientras que la región caudal del rafe proyecta a estructuras como la amígdala (Am), NAcc, CPF, *Locus coeruleus* (LC), Hc ventral e Hp dorsal (Vertes, 1991; Adell y cols., 2002; Lowry y cols., 2008; Hale y Lowry 2011).

A su vez, el NDR recibe proyecciones provenientes de diversas estructuras de manera topográfica y establece circuitos recíprocos con varias de las regiones mencionadas anteriormente. La región rostral del rafe recibe aferencias del núcleo arcuato hipotalámico mientras que la región medial (rostral y caudal), recibe aferencias provenientes del Hp lateral y el área perifornical y estructuras límbicas como la CPF medial. Por último, el rafe caudal recibe aferencias del área preóptica, el núcleo laterodorsal tegmental (LDT), la SN, Hp lateral y área perifornical, entre otros (Fig. 3 A y B; Lowry y cols., 2008; Yoon y Lee, 2013).

Un trabajo recientemente publicado, demuestra que varias de las aferencias provenientes de estas regiones establecen contactos sinápticos directos con las neuronas 5-HTérgicas del NDR (Pollak Dorocic y cols., 2014). De este modo, las neuronas 5-HTérgicas reciben inputs directos del Hp lateral y la zona incerto-hipotalámica, núcleo central de la Am, núcleo pontino reticular, SN reticulada, área

tegmental ventral (ATV) y CPF (cingulada anterior, infralímbica, y prelímbica; Pollak Dorocic y cols., 2014; Fig. 3 A y B).

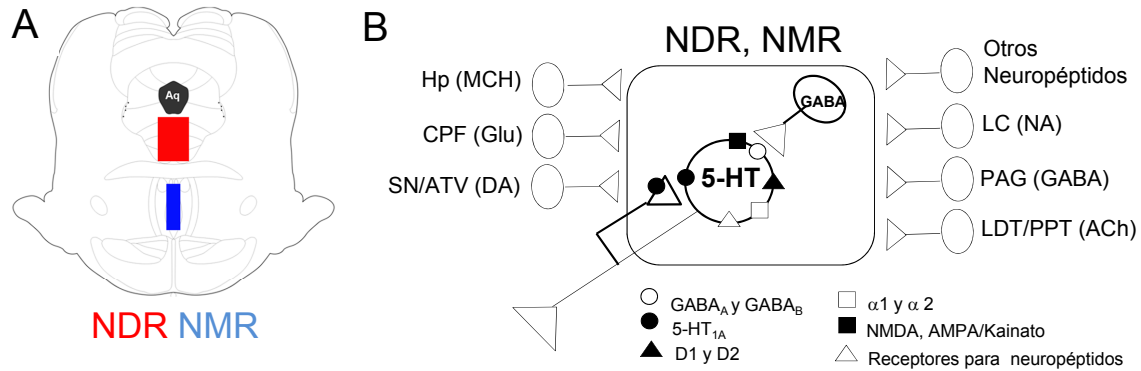


Figura 3. **A-** Esquema representativo de la localización del NDR (rojo) y el NMR (azul) en un corte coronal de cerebro de rata (AP: -7.8 a partir de Bregma). Tomado y modificado del Atlas de Paxinos y Watson (2005) **B-** Esquema representativo de los sistemas de neurotransmisión que inervan el NDR y NMR y sus estructuras de origen, así como de los subtipos de receptores para los mismos expresados en las neuronas 5-HTérgicas. Abreviaciones: 5-HT: serotonina; NA: noradrenalina; ACh: acetilcolina; DA: dopamina; GLU: glutamato; CPF: corteza prefrontal; Hp: hipotálamo; LC: *Locus coeruleus*; LDT/PPT: Núcleo laterodorsal tegmental y núcleo pedunculopontino; PAG: Sustancia gris periacueductal; SN/ATV: *Substantia nigra*/Área Tegmental Ventral.

2.2. Propiedades electrofisiológicas y control funcional de las neuronas 5-HTérgicas del NDR

Desde el punto de vista electrofisiológico, las neuronas 5-HTérgicas, han sido clásicamente caracterizadas e identificadas como neuronas con patrón de descarga espontánea lenta y regular (1-5 Hz), una alta resistencia de entrada (150-400 MΩ) y potenciales de acción de larga duración (1.8 ms) seguidos de una hiperpolarización post-potencial larga (10-16 mV de amplitud y una duración de 200-800 ms). Además, responden con una inhibición frente a la aplicación de agonistas del receptor de 5-HT del tipo 1A (5-HT_{1A}) como el 8-Hidroxi-2-

dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT; Aghajanian y Vandermaelen 1982). Sin embargo, trabajos más recientes demuestran que éstas características electrofisiológicas pueden variar según su ubicación a lo largo del núcleo y algunas de estas características son similares en neuronas no-5-HTérgicas (Beck y cols., 2004; Calizo y cols., 2011). En este sentido, si bien se ha establecido de manera general que las neuronas no-5-HTérgicas del NDR, presentan un potencial de reposo de membrana más depolarizado que las 5-HTérgicas y un *gap* de activación menor, en la región ventral de la zona medial o en las alas laterales las neuronas 5-HTérgicas y no 5-HTérgicas presentan valores de potencial de reposo similares (Calizo y cols., 2011). Es así que, otros parámetros electrofisiológicos como la constante de tiempo *tau* o la constante de tiempo de la hiperpolarización post-potencial han sido propuestos como mejores marcadores de la identidad neuronal (Kirby y cols., 2003). Sumado a esto, se ha demostrado que neuronas no 5-HTérgicas en el NDR expresan receptores 5-HT_{1A}, determinando que, estas neuronas respondan también con una hiperpolarización a la aplicación de agonistas como el 8-OH-DPAT (Calizo y cols., 2011).

Las neuronas 5-HTérgicas del rafe están bajo la influencia de varios sistemas de neurotransmisión clásicos como, GABA, NA y glutamato, entre otros y expresan receptores para los mismos tales como receptores GABA_A y GABA_B; α 1-adrenérgicos; AMPA, NMDA, entre otros (Fig. 3B). A su vez responden a neuropéptidos como SP, hipocretinas y CRF para los cuales también ha sido demostrada la expresión de sus receptores en las neuronas 5-HTérgicas (Adell y cols., 2002; Wang y cols., 2005; Korosi y cols., 2006; Lacoste y cols., 2006; Monti 2010b).

Los dos mecanismos más efectivos en el control inhibitorio de la actividad de las neuronas 5-HTérgicas lo constituyen el control tónico mediado por neuronas GABAérgicas (locales y por aferencias provenientes de otras regiones; Tao y cols., 1996; Gervasoni y cols., 2000) y la expresión de auto-receptores somato-dendríticos del tipo 5-HT_{1A} activados por 5-HT liberada por terminales recurrentes o por aferencias 5-HTérgicas provenientes de otros núcleos del rafe (Adell y cols., 2002).

El patrón de descarga de las neuronas 5-HTérgicas del NDR en condiciones fisiológicas varía a lo largo del ciclo sueño-vigilia. Estas neuronas, presentan una descarga tónica durante la vigilia la cual decrece durante el sueño lento y se inactivan casi totalmente durante el sueño paradójico o REM (*rapid eye movements*). Es por esta razón que han sido denominadas neuronas REM-off (Portas y cols., 2000; Monti y cols., 2010a). Este patrón de descarga, estaría determinado por un control tónico GABAérgico mediado por *inputs* GABAérgicos de interneuronas o de neuronas de proyección provenientes del área preóptica y la sustancia gris periacueductal (Gervasoni y cols., 2000). Este tono GABAérgico estaría aumentado durante la etapa de sueño (lento y paradójico), provocando la disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HTérgicas (Gervasoni y cols., 2000).

2.3. Anatomía del Núcleo Mediano del Rafe (NMR)

El NMR (B8) se encuentra ubicado ventralmente al NDR sobre la línea media (Fig. 1B y 3A). Se divide en una población de neuronas ubicadas en la región medial las cuales están densamente empaquetadas y una población más periférica en la cual las neuronas se distribuyen de manera más dispersa (Adell y cols., 2002). Posee un menor número de neuronas 5-HTérgicas que el NDR (1000-1500) las cuales constituyen el 20-30% del total de neuronas del núcleo (Jacobs y Azmitia, 1992, Vertes y Crane, 1997). De igual manera que el NDR, el NMR contiene otros fenotipos neuronales, entre ellos, neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas o de neuropéptidos como somatostatina (Descarries y cols., 1982; Stamp y Semba 1995; Araneda y cols., 1999; Calizo y cols., 2011; Jahanshahi y cols., 2013). Estas neuronas se distribuyen en la zona medial así como en la periferia. La 5-HT puede co-localizar con marcadores de neuronas glutamatérgicas, sin embargo, no co-localiza con GABA (Calizo y cols., 2011).

El NMR proyecta a la CPF (medial), el Hp, los núcleos LDT y pedunculopontino (PPT), *septum* medial e Hc dorsal y ventral entre otros (Vertes y cols., 1999).

Además, es importante mencionar que el NMR establece circuitos recíprocos de inervación con el NDR (Vertes y cols., 1999). Si bien, algunas de las áreas de proyección del NMR se solapan con las del NDR, la conexión anatómica entre el NMR y el sistema septo-hipocampal constituye una de sus principales diferencias (Vertes y cols., 1999).

El NMR recibe aferencias del Hp (lateral y dorsomedial, zona incerta), la CPF medial, Hc e Hp entre otros (Vertes y Linley 2008). En particular, las neuronas 5-HTérgicas del NMR reciben contactos sinápticos provenientes de la CPF medial, habénula lateral, SN *pars compacta* y ATV, Hp medial y zona incerto-hipotalámica (Pollak Dorocic y cols., 2014; Fig. 3 A y B).

2.4. Propiedades electrofisiológicas y control funcional de las neuronas 5-HTérgicas del NMR

Las neuronas 5-HTérgicas del NMR presentan similitudes en sus propiedades electrofisiológicas con las neuronas del NDR (Jacobs y Azmitia 1992). Sin embargo, difieren en su constante de tiempo *tau*, siendo menor en el NMR (44 ms) y una hiperpolarización post-potencial mayor (20 mV; Beck y cols., 2004; Calizo y cols., 2011). A diferencia de lo que ocurre en el NDR, las propiedades electrofisiológicas de las neuronas 5-HTérgicas y no-5-HTérgicas son diferentes en toda la extensión antero-posterior del núcleo (Calizo y cols., 2011). Al igual que las neuronas del NDR, la actividad de las neuronas del NMR puede ser modulada por una gran variedad de sistemas de neurotransmisión (Fig. 3B; Adell y cols., 2002) y la actividad de las neuronas 5-HTérgicas del NMR varía a lo largo del ciclo sueño-vigilia. Estas neuronas presentan una descarga tónica durante la vigilia, decrecen su actividad durante el sueño lento y se inactivan durante el sueño REM (Rasmussen y cols., 1984).

2.5. NDR y NMR como base neurobiológica de la DM

Múltiples trabajos involucran al sistema 5-HTérgico y a los núcleos del rafe en la fisiopatología de la DM. En particular el NDR y NMR, han sido los núcleos más estudiados en relación a la DM (Graeff y cols. 1996; Underwood et al., 1999; Bach-Mizrachi y cols., 2008; Kerman y cols., 2012). Existen evidencias que demuestran una disminución de los niveles de 5-HT y/o su principal metabolito (ácido 5-hidroxi-indolacético, 5-HIAA) en la orina y líquido cefalorraquídeo en pacientes con DM o de pacientes deprimidos suicidas (Nordström y cols., 1994; Mann y cols., 2001). Además, estudios post-mortem demostraron que existen diferencias en marcadores 5-HTérgicos tales como, niveles de proteína o del ARNm de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH, enzima limitante de la síntesis de 5-HT) o el SERT en el NDR y áreas de proyección, en pacientes deprimidos y deprimidos-suicidas en relación a cerebros provenientes de individuos sanos (Arango y cols., 2001; 2002; Bach-Mizrachi y cols., 2006; 2008). Pacientes deprimidos presentan una reducción del *binding* para el receptor 5-HT_{1A} en el NDR (indicando una menor densidad) y regiones de proyección como la corteza cingulada, orbital (CC; CO) y CPF (Drevets y cols., 1999) y modificaciones en el volumen, flujo sanguíneo, metabolismo o patrones de activación de estructuras cerebrales que reciben aferencias 5-HTérgicas tales como la CPF, CC, Am e Hc (Soares y Mann 1997; Nestler y cols., 2002; Drevets y cols., 2008). Es importante destacar que algunas de estas alteraciones en el sistema 5-HTérgico (cambios en el *turnover* de 5-HT o en el *binding* para el receptor 5-HT_{1A}) han sido observadas también en pacientes con trastornos de ansiedad (Esler y cols., 2007; Neumeister y cols., 2004), dando soporte a la hipótesis de que ambas condiciones involucran sustratos neuronales comunes (Nutt y Stein, 2006; Palagini y cols., 2013).

Por otra parte, estudios pre-clínicos han demostrado que el NDR y el NMR así como sus áreas de proyección estarían en la base de la inducción de comportamientos tipo-depresivos, y que además serían sitio blanco de los antidepresivos que resultan efectivos en la clínica (Silva y cols., 2012). Es así que se ha demostrado que animales expuestos al *test* de nado forzado (TNF) o *forced*

swim test, presentaron cambios en la expresión del ARNm de la TPH y el SERT en el NDR (Shishkina y cols., 2008).

Sumado a esto, la exposición al TNF indujo un aumento significativo en la expresión de la proteína Fos (parámetro utilizado como marcador de la población neuronal que participa en el comportamiento en el TNF) o la proteína CREB (utilizado en algunos casos como un marcador molecular de depresión o disforia) en el NDR y NMR así como en regiones de proyección como la CPF medial, Hp, Am, CE y NAcc (Pliakas y cols., 2001; Roche y cols., 2003; Silva y cols., 2012). De forma interesante, el aumento en la expresión de Fos, fue prevenido mediante un pre-tratamiento sistémico con los antidepresivos Flx y venlafaxina (Silva y cols., 2012). De igual forma, un aumento en la expresión de la proteína Fos en neuronas 5-HTérgicas (y no 5-HTérgicas) del NDR fue observada luego de la administración sistémica o local de drogas con propiedades ansiogénicas o frente a diversos estímulos que provocan ansiedad (Roche y cols., 2003; Gardner y cols., 2005; Hale y cols., 2012).

Este conjunto de evidencias demuestran que alteraciones en el NDR y/o NMR y la transmisión 5-HTérgica estarían en la base de respuestas conductuales vinculadas a los estados afectivos y asociadas a patologías de los mismos (Blier y de Montigny 1994; Kerman y cols., 2012; Tiger y cols., 2014). En este sentido, la profundización en el estudio de los sistemas de neurotransmisión que establecen circuitos con el NDR y NMR, y en particular aquellos que controlan la actividad de las neuronas 5-HTérgicas resulta de gran importancia para comprender su papel en la regulación fisiológica de los estados emocionales y sus posibles implicancias en patologías de los mismos (Pollac-Dorocic y cols., 2014; Weissbourd y cols., 2014).

Dentro de la variedad de aferencias que reciben el NDR y el NMR, se incluyen varios sistemas de neurotransmisión neuropeptídica, los cuales modulan la actividad de las neuronas 5-HTérgicas (Kirby y cols., 2000; Liu y cols., 2002; Adell y cols., 2002; Monti, 2010), y son foco de estudio dado que han sido propuestos como potenciales blancos de acción terapéutica alternativos para el tratamiento de la DM (Blier y cols., 2004; Berton and Nestler, 2006, David et al., 2007; Catena-

Dell'Osso y cols., 2013). Estudios pre-clínicos han mostrado que antagonistas de receptores para neuropéptidos tales como galanina, CRF, SP, NPY, hipocretinas o la MCH, presentan propiedades antidepresivas (Borowsky y cols., 2002; Blier y cols., 2004; Catena-Dell'Osso y cols., 2013). Más aún, algunos compuestos que actúan sobre sistemas de neurotransmisión peptídica ya han sido testeados en estudios clínicos, resultando altamente promisorios en alguno de los ensayos realizados (Blier y cols., 2004; Catena-Dell'Osso y cols., 2013).

3. Sistema de neurotransmisión de la Hormona Concentradora de Melanina (MCH)

3.1. Origen y estructura

La MCH es un péptido cíclico que fue inicialmente descrito y caracterizado como un factor circulante que mediaba los cambios de color de piel en peces teleósteos, provocando la agregación de gránulos de melanina (Kawauchi y cols., 1983). Posteriormente, su presencia fue evidenciada en el SNC de la rata donde actúa como neurotransmisor o neuromodulador y fue descrita su presencia, además, en todos los mamíferos estudiados, incluso en humanos (Vaughan y cols., 1989; Mori y cols., 1993; Croizier y cols., 2013).

Al igual que otros neuropéptidos, la MCH, se genera a partir del clivaje diferencial mediado por endoproteasas de un precursor, la Pre-pro-MCH de 165 aminoácidos, que da lugar a dos neuropéptidos adicionales denominados E-I (*neuropeptide glutamic-isoleucine*, NEI) y G-E (*neuropeptide glycine-glutamic acid*; Nahon y cols., 1989; Viale y cols., 1999). Ambos neuropéptidos son activos en el SNC, aunque sus funciones han sido menos estudiadas (Parkes y Vale, 1992; Kistler-Heer y cols., 1998; Bittencourt y Celis, 2008).

En mamíferos, la MCH posee una secuencia de 19 aminoácidos la cual se encuentra altamente conservada. Su estructura cíclica está determinada por la existencia de un puente di-sulfuro que se establece entre los residuos de cisteínas

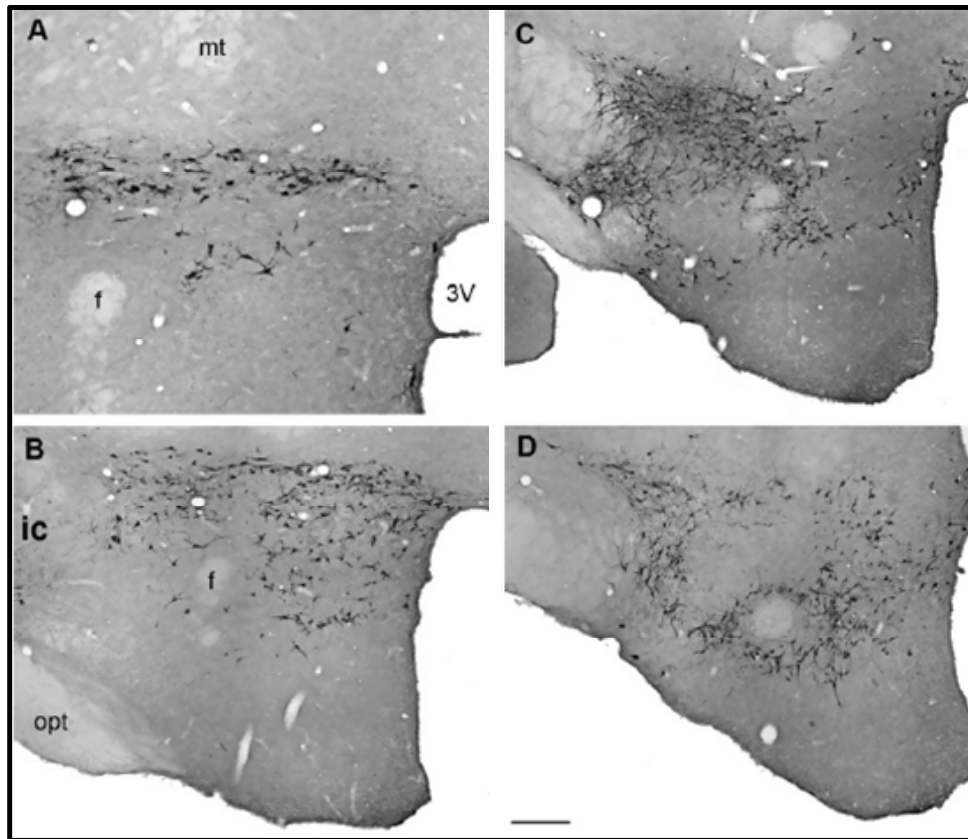


Figura 5. Distribución de las neuronas MCHérgicas en el hipotálamo de la rata en el eje rostro-caudal. **A-** zona incerto-hipotalámica; las neuronas se distribuyen en el eje horizontal desde la punta del 3V hasta la línea del fornix. **B-** región anterior del Hp lateral; en esta región se destaca una población de neuronas MCH+ en el área hipotalámica medio-dorsal. **C-** región tuberal del hipotálamo lateral, la mayoría de las neuronas MCH+ se ubican entre la cápsula interna y el fornix **D-** Hp póstero-lateral, en esta región se destaca una población de neuronas MCH+ medial y otra dorsal a la cápsula interna y en la zona perifornical. Abreviaciones: 3V: tercer ventrículo; f: fornix; ic: cápsula interna; mt: tracto mamilotalámico; opt: tracto óptico. Barra de calibración A: 150 μ m, B-D: 200 μ m. Tomado y modificado de Bittencourt 2011.

Existe además, una población escasa de neuronas MCHérgicas en regiones extra-hipotalámicas (Fig. 6) tales como el tubérculo olfatorio, la formación pontina reticular y en ratas hembras lactantes aparece una población de neuronas inmunopositivas para MCH en el área preóptica media (Bittencourt y cols., 1992, 2011; Rondini y cols., 2010). Sumado a esto, también se ha descrito la expresión de MCH en órganos periféricos tales como el intestino y el páncreas (Pissios y cols., 2007; Kokkotou y cols., 2008).

Las neuronas MCHérgicas presentan un sistema de proyección ampliamente distribuido en el SNC que va desde el bulbo olfatorio y la corteza cerebral hasta la médula espinal (Fig. 6; Skofitsch y cols., 1985; Bittencourt et al. 1992). Entre las áreas de proyección de las neuronas MCHérgicas se encuentran estructuras tales como CPF, CE, NAcc, Am, Hc, los núcleos LDT/PPT y el LC (Saito y cols., 2001; Bittencourt y cols., 1992; 2011; Yoon y Lee, 2013). Además, existe una gran densidad de fibras MCHérgicas en el propio Hp (Bittencourt y cols., 1992; 2011; Saito y cols., 2001). Es importante destacar que las áreas de proyección descritas, coinciden con las áreas de expresión de sus receptores (Lembo y cols., 1999).

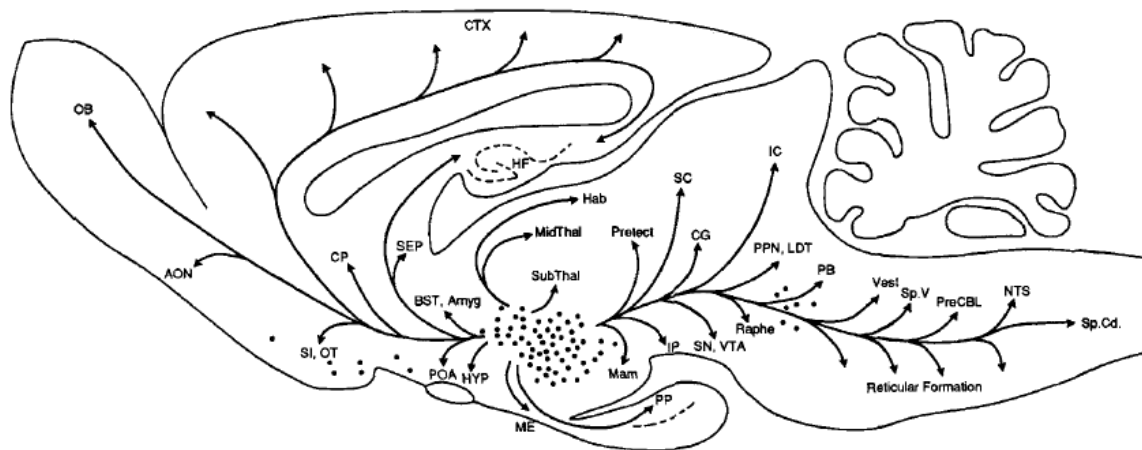


Figura 6. Esquema que indica la localización de las neuronas MCHérgicas (puntos negros) y sus principales proyecciones en un corte sagital de cerebro de rata. Abreviaciones: Amyg: amígdala; AON: núcleo olfatorio anterior; BST: núcleo basolateral de la amígdala; CG: sustancia gris central; CP: caudado-putamen; CTX: corteza cerebral; Hab: habénula; HF: formación hipocámpica; HYP: hipotálamo; IC: colículo inferior; IP: núcleo interpeduncular; LDT: núcleo laterodorsal tegmental; ME: eminencia media; MidThal: núcleo talámico medial; Mam: complejo mamar; NTS: núcleo del tracto solitario; OB: bulbo olfatorio; OT: tubérculo olfatorio; PB: núcleo parabraquial; POA: área preóptica; PP: pituitaria posterior; PPN: núcleo pedunculopontino; PreCBL: núcleo pre-cerebelar; SEP: complejo nuclear septal; SN: *Substantia nigra*; Sp. V: núcleo vestibular espinal; Sp.Cd: médula espinal; SubThal: región subtalámica; Vest: núcleo vestibular; VTA: área tegmental ventral. Tomado de Bittencourt y cols., 1992.

Es de especial interés mencionar que las neuronas MCHérgicas proyectan al NDR y el NMR (Bittencourt y cols., 1992), aunque aún son escasos los trabajos que caracterizan profundamente ésta inervación. En base a ello se ha reportado que la distribución de las fibras MCHérgicas provenientes del Hp póstero-lateral proyectan al NDR y NMR parecen establecer contactos con las neuronas 5-HTérgicas (Yoon y Lee, 2013; Pollak Dorocic y cols., 2014) aunque la distribución de las aferencias MCHérgicas al NDR teniendo en cuenta las sub-regiones del núcleo o la determinación de contactos sinápticos con otros tipos neuronales del NDR, no ha sido profundamente explorada.

La amplia distribución del sistema MCHérgico sugiere su interacción con diversos sistemas de neurotransmisión y la participación de MCH como neuromodulador en diversas funciones centrales (ver más adelante; Saito y cols., 2001; Chung y cols., 2011).

A su vez, las neuronas MCHérgicas reciben aferencias recíprocas de varias de estas regiones (Fig. 7; Guyon, 2009). Se ha demostrado que las neuronas MCHérgicas reciben aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas provenientes de regiones vecinas del Hp y expresan receptores funcionales para ambos neurotransmisores (Gao y cols., 2003; van den Pol y cols., 2004). Además, reciben aferencias hipotalámicas de otros neuropéptidos tales como hipocretinas y el NPY (Elias y cols., 1998; Jobst y cols., 2004; van den Pol y cols., 2004; Takenoya y cols., 2005). Sumado a esto, el Hp lateral, recibe aferencias de regiones extra-hipotalámicas. Entre estas, podemos mencionar aferencias NAérgicas y 5-HTérgicas provenientes del LC y el NDR respectivamente así como, inputs colinérgicos provenientes del LDT/PPT (Bayer y cols., 2005; Wellman, 2000; Williams y cols., 2001). Aunque no está demostrado aún si estas aferencias establecen contactos sinápticos directos con las neuronas MCHérgicas, estos sistemas de neurotransmisión pueden modular su actividad (Guyon, 2009).

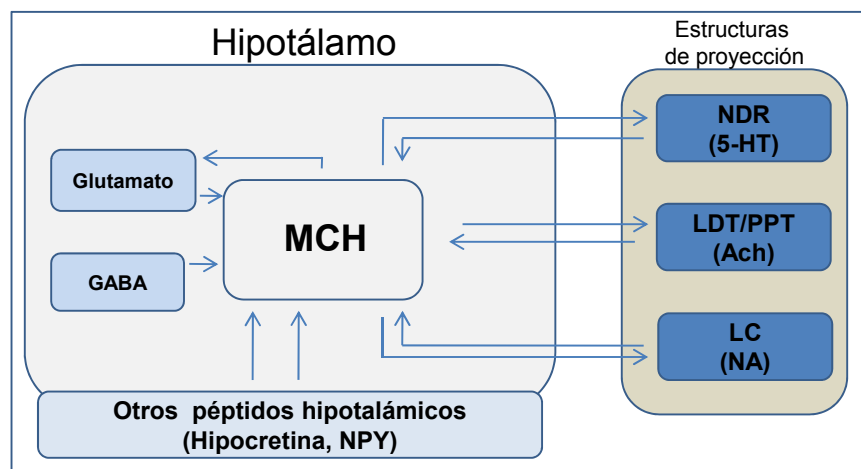


Figura 7. Esquema representativo de algunos de los sistemas de neurotransmisión que modulan la actividad de las neuronas MCHérgicas del hipotálamo. Abreviaciones: 5-HT: serotonina; NA: noradrenalina; ACh: acetilcolina; NDR: núcleo dorsal del rafe; LC: *Locus coeruleus*; LDT/PPTg: Núcleo laterodorsal tegmental/pedunculopontino.

Las neuronas MCHérgicas hipotalámicas, al igual que otras poblaciones de neuronas neuropeptídicas, co-expresan otros neuropéptidos tales como el NEI, GE y CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*; Bittencourt y cols., 1992; Broberger y cols., 1999; Elias y cols., 2001; Harthoorn y cols., 2005; Bittencourt y Celis, 2008). En particular, la relación entre NEI y MCH ha sido explorada poniendo en evidencia la generación de efectos opuestos (Sanchez y cols., 1997; 2001) así como, complementarios en el caso de sus efectos neuroendócrinos (Parkes y Vale, 1992; Kennedy y cols., 2001; 2003).

Sumado a esto, las neuronas MCHérgicas expresan marcadores de neurotransmisores no peptídicos. En particular, expresan marcadores de neuronas GABAérgicas como el ARNm de las isoformas 65 y 67 de la glutamato decarboxilasa (GAD_{65} y GAD_{67} , respectivamente), enzima limitante de la síntesis de GABA o de neuronas glutamatérgicas como el ARNm del transportador vesicular 1 de glutamato (Harthoorn y cols., 2005; Meister, 2007; Elias y cols., 2008). En particular, Sapin y cols., demostraron que en la región tuberal del hipotálamo lateral el 85 % de las neuronas MCHérgicas expresan el ARNm de la enzima GAD_{67} (Sapin y cols., 2010). Las implicancias funcionales de la co-

localización de MCH, particularmente con GABA, han comenzado a ser exploradas. En este sentido, fue demostrado que en el LC (región que recibe aferencias MCHérgicas) únicamente un bajo porcentaje de fibras MCHérgicas co-expresaban el transportador de GABA, VGAT (DelCid-Pellitero y cols., 2012). Este resultado pone en evidencia que estas terminales tendrían la capacidad de co-liberar MCH y GABA, sin embargo, se postula que, teniendo en cuenta el bajo porcentaje de fibras con estas características los efectos en esa región serían mediados principalmente por MCH (DelCid-Pellitero y cols., 2012; Jago y Adamantidis, 2013).

3.3. Receptores

A finales de los años 90 y simultáneamente a cargo de varios grupos de investigación, se identificó al receptor huérfano SLC-1 como el sitio de acción endógeno para la MCH (Bachner y cols., 1999; Lembo y cols., 1999; Saito y cols., 1999). Este receptor fue denominado receptor tipo 1 para MCH (MCHR-1) y posteriormente, un segundo receptor fue identificado y denominado receptor tipo 2 (MCHR-2; Hill y cols., 2001; Sailer y cols., 2001).

Ambos tipos de receptores son metabotrópicos y pertenecen a la familia de receptores unidos a proteínas G con 7 dominios transmembrana (Hawes y cols., 2000). Estos receptores presentan una homología en su secuencia de aminoácidos de 38 % y la afinidad de unión de MCH se encuentra en el rango nanomolar ($k_d = 1-1.3$ nM) (An y cols., 2001; Mori y cols., 2001; Sailer y cols., 2001; Wang y cols., 2001).

El ARNm del MCHR-1 se expresa en todos los vertebrados estudiados y en humanos y su expresión está ampliamente distribuida en el SNC (Fig. 8; Saito y cols., 1999; 2001; Lembo y cols., 1999).

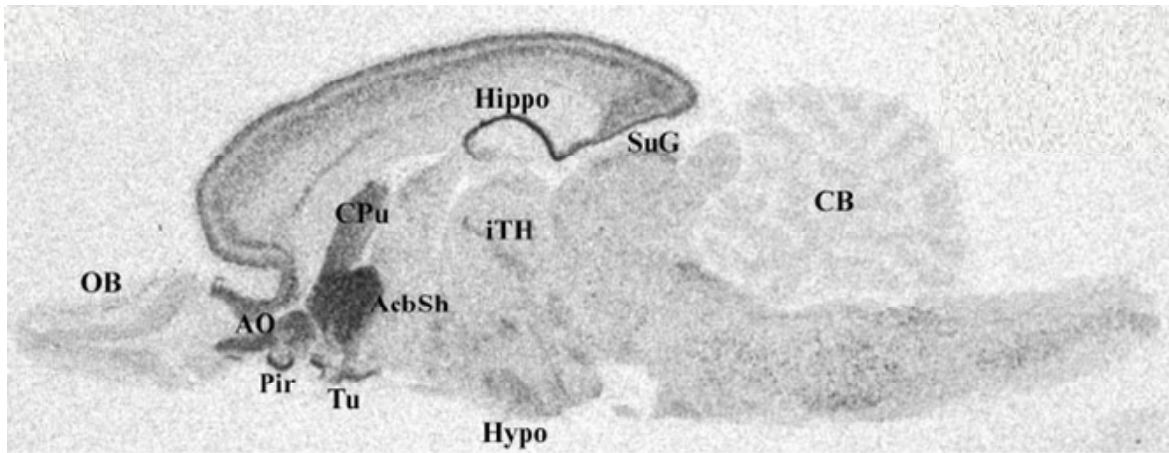


Figura 8. Expresión del ARNm para el MCHR-1 en un corte sagital de cerebro de ratona detectado por hibridación *in situ*. AcbSh: Núcleo *accumbens shell*; AO: Núcleo olfatorio anterior; CB: Cerebelo; CPu: Caudado-putamen; Hippo: hipocampo; Hypo: hipotálamo; iTH: Núcleo talámico intralaminar; OB: Bulbo olfatorio; Pir: Corteza piriforme; SuG: Capa gris superficial del colículo superior; Tu: Tubérculo olfatorio. Tomado y modificado de Lembo y cols., 1999.

Varias evidencias indican a los núcleos del rafe como sitio de expresión del ARNm para MCHR-1, aunque existen escasos reportes sobre la actividad funcional del sistema MCHérgico en dichos núcleos. En particular, en el NDR y NMR de la ratona, se ha demostrado la expresión del ARNm para el MCHR-1 (Lembo y cols., 1999; Hervieu y cols., 2000; Saito y cols., 2001) mientras que en el NDR se ha demostrado *binding* del antagonista SNAP-7941 tritiado (Borowsky y cols., 2002). A su vez, exclusivamente en el NDR de ratón, se reportó que las neuronas 5-HTérgicas de las regiones ventro-medial y las alas laterales expresan el mensajero para MCHR-1 (Spaethling y cols., 2014).

Además, MCHR-1 se expresa en la periferia en el tejido adiposo y órganos como el intestino (Hill y cols., 2001). Es importante destacar que éste subtipo es la única forma funcional del receptor que se expresa en roedores y que posee un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos respecto al receptor expresado en humanos (Saito y cols., 2001; Hill y cols., 2001; Tan y cols., 2002). MCHR-1 puede estar acoplado a distintas proteínas G, entre las cuales se encuentran Gi, G₀ y Gq. De esta forma los efectos de MCH a nivel intracelular

están mediados por la activación de diversas vías de señalización (Hawes y cols., 2000; Chambers y cols., 1999). Estudios *in vitro* de expresión del MCHR-1 en células no neuronales demostraron que la aplicación de MCH puede inducir una respuesta celular de tipo inhibitoria como la reducción en los niveles de AMPc y la activación de corrientes a través de canales de K⁺ activados por proteínas G (GIRKs; Bachner y cols., 1999; Hawes y cols., 2000). A su vez, MCH puede generar efectos intracelulares de tipo excitatorios como el aumento en las concentraciones de Ca⁺⁺ intracelular y activación de la proteína ERK (Bachner y cols., 1999; Saito y cols., 1999; Hawes y cols., 2000). Sin embargo, estudios funcionales realizados en cultivo neuronal de Hp demostraron que MCH ejerce efectos principalmente inhibitorios (Gao y van den Pol, 2002). La aplicación de MCH indujo la reducción de corrientes de Ca⁺⁺ dependientes de las proteínas G_i/G_o, de forma consistente con una acción inhibitoria. Estas corrientes de Ca⁺⁺ eran mediadas por canales de Ca⁺⁺ voltaje-dependientes de tipo N, P y L (Gao y van den Pol, 2001). Sumado a esto, en estudios realizados en rodajas de Hp se demostró que MCH, de manera dependiente del MCHR-1, inhibe neuronas hipocretinérgicas hipotalámicas así como la transmisión sináptica glutamatérgica sobre este tipo neuronal (Rao y cols., 2008). La naturaleza inhibitoria de MCH fue confirmada también en estudios *in vivo*, en los cuales la aplicación de MCH intra-NAcc *shell* indujo una disminución de la frecuencia de disparo de las neuronas GABAérgicas locales (*medium spiny neuron*; Sears y cols., 2010).

Al igual que para otros receptores acoplados a proteína G, MCHR-1 puede ser internalizado una vez que se une con su ligando. Este mecanismo fue puesto en evidencia en cultivo de células HEK-293 transfectadas con el MCHR-1 acoplado a la proteína verde fluorescente que fueron tratadas con MCH (Lembo y cols., 1999). Si bien varios aspectos de este proceso han sido abordados en estudios *in vitro* (Lembo y cols., 1999; Saito y cols., 2001; Moden y cols., 2013), recientemente el fenómeno de internalización ha sido evidenciado en estudios *in vivo*. Es así que, Devera y colaboradores, (2014) demostraron que luego de la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de MCH conjugada con el fluoróforo rodamina (MCH-R) en gato y rata, se encontró señal positiva para rodamina en células del

NDR. La combinación de la señal positiva de rodamina con una inmunodetección para 5-HT evidenció que algunas de las células que incorporaron rodamina eran inmunopositivas para 5-HT. A su vez, en gato, se pudo demostrar que neuronas GAD-67+ también presentaban señal positiva para rodamina. Estos resultados sugieren que la señal de rodamina encontrada en el citoplasma de las neuronas 5-HTérgicas y GABAérgicas correspondería al complejo MCH-R-receptor de MCH internalizado luego de la administración i.c.v. de MCH-R, poniendo en evidencia un mecanismo de internalización para el sistema MCHérgico *in vivo*. A su vez, sugieren que las neuronas 5-HTérgicas y GABAérgicas expresan receptores funcionales para MCH.

MCHR-2, por otra parte, se expresa de forma más restringida en mamíferos, encontrándose en perros, gatos, primates no-humanos y humanos (An y cols., 2001). Presenta una expresión ampliamente distribuida en el SNC y, al igual que lo descrito para el MCHR-1, la expresión de MCHR-2 fue detectada también en tejidos periféricos como el tejido adiposo o en el páncreas (An y cols., 2001; Sailer y cols., 2001; Mori y cols., 2001; Tan y cols., 2002). Estudios *in vitro* en líneas celulares, demostraron que el MCHR-2 está acoplado exclusivamente a la proteína Gq y que la aplicación de MCH induce un aumento en la concentración intracelular de Ca⁺⁺ (An y cols., 2001; Sailer y cols., 2001). Un trabajo reciente realizado en ratones transgénicos que expresan MCHR-1 y MCHR-2, demostró que éste último podría tener acciones opuestas al MCHR-1. Sin embargo, debido a la limitación de modelos animales disponibles para el estudio del MCHR-2, hasta el momento, su funcionalidad e implicancia en procesos fisiológicos ha sido difícil de determinar (Chee y cols., 2014).

3.4. Propiedades electrofisiológicas y control funcional de las neuronas MCHérgicas

Las neuronas MCHérgicas presentan bajos niveles de actividad espontánea, tienen un potencial de membrana que se encuentra entre -62 a -50 mV y el umbral

para la generación de potenciales de acción se encuentra en -30 mV aproximadamente (van den Pol y cols., 2004). Estas neuronas responden a diversos factores y neuromoduladores (Fig. 7; Guyon, 2009). Las neuronas MCHérgicas poseen receptores para glutamato del tipo NMDA, AMPA, mGluR1 y mGluR5 cuya activación lleva a su depolarización, incrementando así su actividad. De manera contraria, las aferencias GABAérgicas inducen una hiperpolarización de las neuronas MCHérgicas a través de receptores de tipo GABA_A. (van den Pol y cols., 2004; Gao y cols., 2003). A su vez, expresan el receptor 1 para hipocretina y estudios electrofisiológicos demostraron que la hipocretina 1 y 2 depolarizan las neuronas MCHérgicas e incrementan su frecuencia de disparo a través de su acción directa y a través de la potenciación de la liberación de glutamato (Backberg y cols., 2002; van den Pol y cols., 2004). A su vez, acetilcolina (ACh) y NA, a través de mecanismos postsinápticos directos mediados por receptores muscarínicos mACh y α -2 adrenérgicos, respectivamente, inhiben la actividad de las neuronas MCHérgicas (Gao y cols., 2003; van den Pol y cols., 2004; Bayer y cols., 2005). Se ha demostrado que 5-HT también inhibe las neuronas MCHérgicas aunque, a diferencia de lo descrito para ACh y NA, no se ha determinado aún cuáles son los receptores que median estas acciones. El conjunto de evidencias fisiológicas sugiere la existencia de contactos sinápticos directos de las aferencias 5-HTérgicas al hipotálamo, en particular sobre las neuronas MCHérgicas, aunque es necesario profundizar en dicho estudio.

Por último, es importante mencionar que la actividad de las neuronas MCHérgicas podría estar regulada por la expresión de auto-receptores MCHR-1 somáticos, generando un *feedback* negativo sobre su actividad (Rao y cols., 2008; Guyon, 2009).

3.5. Participación de la MCH en funciones fisiológicas

Las características anatómicas del sistema MCHérgico (amplia distribución de fibras y de expresión del MCHR-1) se relacionan con su participación en la modulación de varios procesos fisiológicos del SNC (Saito y cols., 2001; Chung y

cols., 2009), aunque las neuronas MCHérgicas han sido clásicamente asociadas al control de la ingesta y la homeostasis energética (Forray y cols., 2003; Shi y cols., 2004; Nahon, 2006). MCH es un neuropéptido promotor de la ingesta y sus acciones orexigénicas han sido ampliamente demostradas (Qu y cols., 1996; Ludwig y cols., 2001; Forray y cols., 2003). Por el contrario, los antagonistas MCHR-1 inhiben la ingesta y reducen el peso corporal, efectos que han llevado a postularlos como herramienta farmacológica para el tratamiento de la obesidad (Borowsky y cols., 2002; Gehlert y cols., 2009; Ito y cols., 2010; MacNeil y cols., 2013). De hecho, varios antagonistas MCHR-1 ya han sido evaluados en estudios clínicos (Fase I). Los resultados reportados, indicaron que los compuestos ensayados son seguros y bien tolerados por los pacientes, aunque solo uno de ellos, testeado en relación a sus efectos sobre el apetito y el peso corporal, no arrojó resultados positivos (MacNeil y cols., 2013; Moore y cols., 2014). Es así que, hasta el momento, ninguno de los compuestos avanzó hacia un estudio en Fase II. Sin embargo, a pesar de estos resultados, los antagonistas MCHR-1 continúan constituyendo una alternativa terapéutica de enorme trascendencia para el tratamiento de la obesidad (Sakurai y cols., 2014).

El sistema MCHérgico también se ha vinculado a la modulación de comportamientos motivados así como en procesos de aprendizaje y memoria (Bittencourt 1992; Saito y cols., 2001; Varas y cols., 2003; Georgescu y cols., 2005; Adamantidis y de Lecea, 2009; Chung y cols., 2009; Pachoud y cols., 2010; Mul y cols., 2011; Lu y cols., 2013).

Resultan de relevancia para esta tesis las evidencias que demuestran la participación de este sistema en la regulación del ciclo sueño-vigilia (Adamantidis y cols., 2008; Torterolo y cols., 2006; 2009; 2011) y de los estados emocionales (Chung y cols., 2011; Lagos y cols., 2011b)

En este sentido, numerosas evidencias han demostrado la existencia de vínculos anatómicos entre las neuronas MCHérgicas del Hp con las denominadas regiones hipnógenas como el núcleo *pontis oralis* o estructuras activadoras como el NDR, LDT/PPT y LC (Bittencourt 1992; Modirrousta y cols., 2005; Torterolo y cols., 2009). La idea de que el sistema MCHérgico modula los estados

comportamentales del ciclo sueño-vigilia estuvo fuertemente apoyada por evidencias funcionales que demostraron que en condiciones fisiológicas, las neuronas MCHérgicas presentan variaciones en su estado de activación a lo largo del ciclo sueño-vigilia: presentan una actividad casi nula en su frecuencia de descarga durante la vigilia, la cual aumenta levemente durante el sueño lento y la transición hacia el sueño paradójico o REM, y alcanza un máximo de actividad durante este último (Hassani y cols., 2009). La profundización en el estudio del papel de la MCH en el control de ciclo sueño-vigilia ha llevado a postular a las neuronas MCHérgicas como promotoras del sueño, especialmente del sueño REM (Verret y cols., 2003; Modirrousta y cols., 2005; Ahnaou y cols., 2008; Torterolo y cols., 2009; 2011; Jago y cols., 2013; Konadhode y cols., 2013; Lu y cols., 2013).

En relación a la participación del sistema MCHérgico y la regulación de comportamientos vinculados a los estados emocionales se sostiene, en primer lugar por la presencia de una alta densidad de fibras MCHérgicas y expresión del ARNm del MCHR-1 en regiones del sistema límbico tales como el NAcc, CPF, Am, Hc y NDR, regiones altamente vinculadas a los estados emocionales (Bittencourt y cols., 1992; Hervieu y cols., 2000; Kilduff and de Lecea, 2001, Saito y cols., 2001). En segundo lugar por evidencias que demostraron que los antagonistas MCHR-1 inducen un perfil comportamental antidepresivo y ansiolítico en diferentes modelos animales (Borowsky y cols., 2002; Chaky y cols., 2005; Georgescu y cols., 2005; Gehlert y cols., 2009). Se reportó que la administración sistémica aguda de antagonistas MCHR-1 indujo un efecto antidepresivo en el modelo del TNF (Borowsky y cols., 2002; Chaky y cols., 2005). A su vez, utilizando el modelo de estrés crónico moderado (*chronic mild stress*) se observó que el tratamiento crónico con un antagonista MCHR-1 (SNAP 94847) bloqueó significativamente la disminución en el consumo de sacarosa, parámetro utilizado como marcador de anhedonia, efecto que fue similar al inducido por el antidepresivo citalopram (Smith y cols., 2009). Con el fin de vincular el efecto antidepresivo inducido por el antagonismo MCHR-1 a sitios de acción en el SNC, se propuso que el NAcc-*shell* fuera uno de los sitios de acción (Georgescu y cols., 2005), ya que la administración local de un antagonista MCHR-1 en el NAcc indujo un efecto

antidepresivo en el TNF similar al descrito luego de su administración sistémica (Borowsky y cols., 2002; Georgescu y cols., 2005). De manera interesante, estos mismos autores observaron que, la administración local de MCH en el NAcc indujo un efecto pro-depresivo, (opuesto al inducido por el bloqueo MCHR-1), reportando que el sistema MCHérgico, a nivel del NAcc, participa en la inducción de respuestas conductuales anti o pro-depresivas. Estos mismos autores describieron un perfil tipo-antidepresivo en ratones *knock-out* para MCH postulando que MCH actuaría como inductora de un estado tipo-depresivo (Georgescu y cols., 2005). Trabajos más recientes reportaron que animales expuestos a un estrés crónico moderado e impredecible y que desarrollaban comportamientos tipo-depresivos, manifestaban cambios en la expresión del MCHR-1 en la región del Hc (Nollet y cols., 2011). Además, se han descrito cambios en la expresión del ARNm de MCH y del MCHR-1 en el Hp e Hc, respectivamente, en líneas de ratas con vulnerabilidad a la manifestación de comportamientos tipo-depresivos (García-Fuster y cols., 2012). De hecho se ha propuesto al sistema MCHérgico como un biomarcador de la severidad de aparición de comportamientos tipo-depresivos (García-Fuster y cols., 2012).

Por otro lado diversos estudios realizados en modelos animales mostraron que MCH modifica conductas de ansiedad experimental. Se demostró que la administración de MCH i.c.v o local en el área preóptica media induce un efecto ansiogénico en concordancia con un aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona y de la hormona adrenocorticotrofina (Gonzalez et al., 1996, Kennedy et al., 2003, Smith et al., 2006). Sin embargo, otros autores han encontrado que la administración de MCH i.c.v o local en Am o Hc induce un efecto ansiolítico (Monzon y cols., 2001, Kela y cols., 2003, Carlini y cols., 2006) al igual que los antagonistas MCHR-1 (Borowsky y cols., 2002; Chaky y cols., 2005; Georgescu y cols., 2005; David y cols., 2007; Millan y cols., 2008; Gehlert y cols., 2009; Lee y cols., 2011). Esta serie de resultados son contradictorios y los mecanismos subyacentes a las acciones de MCH o de los antagonistas MCHR-1, han sido poco estudiados. En este contexto, es importante destacar evidencias provenientes de trabajos realizados en ratones *knock-out* para el MCHR-1 (*KO-*

MCHR-1), los cuales desarrollan un patrón comportamental no ansioso en diversos paradigmas que tradicionalmente causan ansiedad o miedo comparados con animales *wild-type* (*WT*; Roy y cols., 2006; Smith y cols., 2006). Dicho perfil conductual se correlacionó con la cuantificación de los niveles extracelulares basales de 5-HT en la CPF, mostrando niveles más bajos en los ratones *KO-MCHR-1* comparado con los *WT*. Sumado a esto, los ratones *WT* respondieron con un aumento de 5-HT frente a una situación de estrés inescapable mientras que los *KO-MCHR-1* no mostraron cambios en los niveles de 5-HT (Roy y cols., 2006). Este trabajo sugiere que cambios en la transmisión del sistema 5-HTérgico podrían subyacer al perfil comportamental no ansioso observado en los ratones *KO-MCHR-1* y sugiere además que cambios en la neurotransmisión 5-HTérgica podría estar en la base de los efectos conductuales inducidos por MCH.

Por último, un estudio reciente realizado en humanos, demostró que los niveles de MCH en la Am (determinados por diálisis intracerebral) disminuyen en situaciones de interacción social y frente a una situación de dolor post-operatorio, llevando a proponer que los niveles de MCH podrían variar frente a diferentes situaciones emocionales (Blouin y cols., 2013).

Este trabajo, confirma fuertemente lo que ya había sido inicialmente postulado a partir de evidencias pre-clínicas, estableciendo un papel fundamental del sistema MCHérgico en el control de los estados emocionales así como, su activación contribuiría en la fisiopatología de trastornos emocionales como la depresión y los trastornos de ansiedad. De esta forma, el MCHR-1 es considerado un potencial sitio blanco de acción terapéutica para estos trastornos emocionales.

Sin embargo, los trabajos enfocados en el estudio del papel de la MCH endógena en la regulación del humor y los estados emocionales son aún muy escasos y con resultados contradictorios.

Por lo tanto, el estudio de aquellas regiones que son moduladas por la acción de MCH, su interacción con sistemas de neurotransmisión como el 5-HTérgico, así como los cambios neuroquímicos relacionados a los efectos conductuales descritos para MCH, resulta de gran relevancia.

Dado que las neuronas MCHérgicas hipotalámicas envían proyecciones al NDR y NMR, regiones fuertemente vinculadas al control de los estados emocionales y la fisiopatología de base de la depresión y los trastornos de ansiedad (Underwood et al., 1999; Bach-Mizrachi y cols., 2008; Kerman y cols., 2012) y que los MCHR-1 se expresan en ambas regiones, es de esperar que el sistema MCHérgico actuando a nivel del NDR y NMR se encuentre en la base de respuestas conductuales pro-depresivas/antidepresivas así como vinculadas con la ansiedad. Sin embargo, hasta el desarrollo de la presente tesis no existían evidencias en la literatura que abordaran el estudio de la interacción entre el sistema MCHérgico y los núcleos del rafe en relación a la regulación de los estados emocionales.

ANTECEDENTES PARTICULARES

1. Efectos de MCH en los núcleos del rafe sobre el sueño REM y su relación con DM

Uno de los síntomas acompañantes de la DM es el trastorno de sueño. En particular los pacientes deprimidos presentan una disminución en la latencia de aparición al primer período de sueño REM, un aumento en la duración del primer episodio de sueño REM o en el tiempo total en este estado, considerándolos incluso marcadores biológicos de depresión (Palagini y cols., 2013). Por el contrario, los fármacos antidepresivos disminuyen el sueño REM y estrategias de privación total de sueño o privación selectiva de sueño REM, resultan eficaces en el tratamiento de la DM (Palagini y cols., 2013). Estudios pre-clínicos en ratas, demuestran que, la privación de sueño por 24 hs induce un efecto antidepresivo en el TNF. Este efecto antidepresivo ha sido asociado a un aumento en la actividad del sistema 5-HTérgico (López-Rodríguez y cols., 2004), sugiriendo que

las alteraciones en el sueño REM en la DM podrían implicar alteraciones del sistema 5-HTérgico en particular de las neuronas del rafe (Tortero y cols., 2014).

Como se menciono anteriormente, varias evidencias indican que la MCH actuaría como promotora del sueño, especialmente del sueño REM (Tortero y cols., 2011). Teniendo en cuenta el vínculo anatómico entre el sistema MCHérgico y el NDR, Lagos y colaboradores (2009) demostraron que la micro-inyección local de MCH en el NDR de ratas, indujo un aumento significativo del tiempo en que los animales permanecían en sueño REM, determinado por un incremento en el número de episodios de sueño REM, manifestado 1-2 h luego de la administración de MCH y mantenido durante al menos 6 h. Este cambio, estuvo acompañado por un leve aumento en el tiempo en que permanecieron en sueño de ondas lentas y una disminución significativa en el tiempo de vigilia y sueño liviano (Lagos y cols., 2009). En contraste, el bloqueo de las acciones de la MCH endógena, mediante la estrategia de inmunoneutralización (administración de anticuerpos anti-MCH, neutralizando la acción endógena de MCH), provocó una disminución en el número de episodios y tiempo de permanencia en sueño REM y un aumento significativo en el tiempo de vigilia (Lagos y cols., 2011a). Estos resultados demostraron que el sistema MCHérgico hipotalámico actuando a nivel del NDR participa activamente en la generación y/o mantenimiento del sueño REM. Teniendo en cuenta que las neuronas 5-HTérgicas del NDR son REM-off, surgió la hipótesis de que MCH estaría ejerciendo un tono inhibitorio sobre las neuronas 5-HTérgicas del NDR, explicando sus efectos sobre el sueño REM. Con el objetivo de profundizar en el estudio de los mecanismos que subyacen a las acciones de MCH, Tortero y colaboradores, realizaron registros electrofisiológicos de unidades en el NDR luego de la administración de MCH por vía i.c.v. o su aplicación juxtacelular (Devera y cols., 2014). Los resultados obtenidos mostraron una inhibición de la descarga en el 59 % de las neuronas registradas luego de la administración i.c.v de MCH, mientras que el porcentaje fue mayor (80 %) cuando la MCH fue administrada en forma juxtacelular. La población de neuronas inhibidas por MCH presentaba características electrofisiológicas de neuronas 5-HTérgicas mientras que el fenotipo de algunas de ellas resultó ser inmunopositivo

para 5-HT. Se evidenció también la presencia de una población neuronal que respondió con una excitación frente a la aplicación de MCH i.c.v. la que presentaba características electrofisiológicas de neuronas GABAérgicas, aunque aún resta confirmar su fenotipo mediante inmunohistoquímica (Devera y cols., 2014).

Por otra parte, resultados preliminares mostraron que la administración de MCH a nivel del NMR aumenta el tiempo de permanencia en sueño REM y sueño lento con una concomitante disminución del tiempo de permanencia en vigilia. El registro de unidades del NMR mostró que la aplicación de MCH i.c.v. o juxtacelular, indujo una reducción de la frecuencia de disparo de las neuronas registradas. Estas neuronas fueron posteriormente inmunomarcadas e identificadas como inmunopositivas para 5-HT (Pascovich C y Torterolo P, observaciones personales).

En su conjunto todas estas evidencias llevaban a pensar que MCH actuando a nivel del NDR y NRM podía provocar respuestas conductuales de tipo-depresivas en ratas.

2. Efectos de MCH en el NDR sobre respuestas comportamentales tipo-depresivas

Basados en las evidencias previas se demostró que MCH desencadenó, inmediatamente después de su aplicación local en el NDR de rata, un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad y una disminución en el tiempo de *climbing* o escalamiento sin modificar el tiempo de nado (Fig. 9; Lagos y cols., 2011b). Esta respuesta se define como de tipo-depresiva, ya que es contraria a la descrita para un efecto antidepresivo en el TNF, el cual se caracteriza por una disminución en el tiempo de inmovilidad (comportamiento pasivo) y un aumento en el tiempo de nado y/o *climbing* (comportamientos activos; Detke y cols., 1995; Cryan y cols., 2002). Si bien este efecto aparece inmediatamente luego de la microinyección de MCH, resta por estudiar si existe una dependencia en el tiempo y en la dosis en el efecto pro-depresivo inducido por MCH.

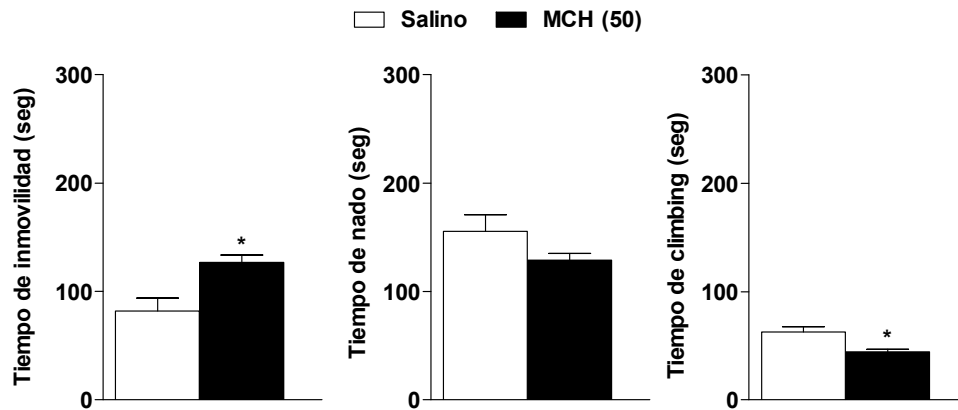


Figura 9. Efecto comportamental inducido por la microinyección intra-NDR de MCH (50 ng) evaluada inmediatamente después de su administración en el TNF. Media \pm EEM del tiempo de permanencia en los tres parámetros medidos en el *test*: inmovilidad, nado y *climbing*. . Test *t* de Student, * = vs salino; * = $p < 0.01$. N=6.

Para confirmar el perfil tipo-depresivo inducido por MCH evaluamos si esta respuesta era prevenida en animales pre-tratados en forma sistémica y sub-aguda con Flx, un ISRS con conocida acción antidepresiva en la clínica. El pre-tratamiento con Flx, bloqueó significativamente el aumento de la inmovilidad inducida por la MCH confirmando el perfil tipo-depresivo inducido por MCH, aunque no tuvo efecto sobre la disminución en el *climbing* (Fig. 10). Este resultado sugería además que un mecanismo 5-HTérgico estaba siendo implicado, al menos en parte, en las acciones conductuales inducidas por MCH (Lagos y cols., 2011b).

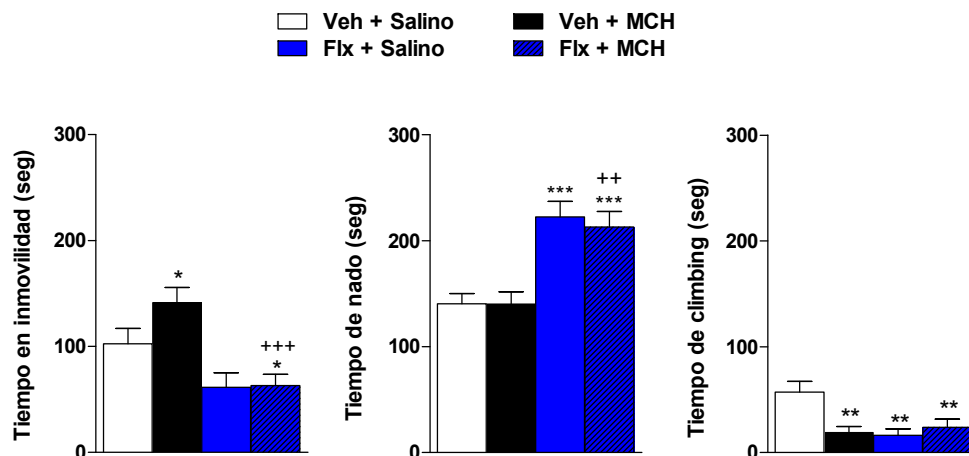


Figura 10. Efectos de la administración de MCH (50 ng) en el NDR en animales pre-tratados con Flx (20 mg/kg) sobre los tres parámetros evaluados en el TNF: inmovilidad, nado y *climbing*. Los datos son expresados como Media \pm EEM. ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. * = vs Veh + salino; + = vs Veh + MCH. * = $p < 0.05$; **,+++ = $p < 0.01$; ***,+++ = $p < 0.001$. N=8.

Teniendo en cuenta que en el TNF los antidepresivos ISRN disminuyen el tiempo de inmovilidad y aumentan selectivamente el *climbing* sin modificar el nado (Detke y cols., 1995; Cryan y cols., 2005), y que la disminución en el *climbing* inducida por MCH no fue bloqueada por el pre-tratamiento con Flx (Fig 10), se consideró la participación del sistema NAérgico en las acciones del neuropéptido. En concordancia con esta hipótesis, otros autores han demostrado que hembras *KO-MCHR-1* presentan un perfil antidepresivo en el TNF caracterizado por una disminución en la inmovilidad y un aumento en el *climbing* y se ha sugerido que un cambio en la transmisión NAérgica podría subyacer al perfil conductual evidenciado en los ratones *KO-MCHR-1* (Roy y cols., 2006). Sin embargo, resta confirmar la participación del sistema NAérgico en los efectos de MCH.

Por otro lado, mediante la inmunoneutralización de MCH en el NDR observamos una respuesta de tipo-antidepresiva, contraria a la inducida por MCH. Esta respuesta se evidenció por una disminución en el tiempo de inmovilidad y un aumento en el tiempo de nado, sin una modificación en el tiempo de *climbing* (Fig. 11). Este perfil comportamental es similar al inducido por un ISRS (Lagos y cols.,

2011b), reafirmando la hipótesis de que habría un mecanismo 5-HTérgico en la base de la modulación MCHérgica en el NDR.

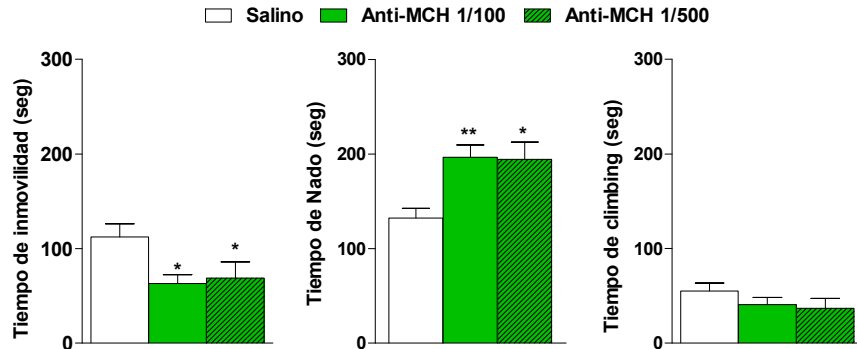


Figura 11. Efectos de la inmunoneutralización de MCH con un anticuerpo anti-MCH (1/100 y 1/500) en el NDR en los tres parámetros medidos en el TNF: inmovilidad, nado y *climbing*. Los datos son expresados como Media \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls. * = vs. salino. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. N = 6-8.

Este resultado sugiere además, que el NDR estaría en la base de la acción antidepressiva descrita para los antagonistas MCHR-1 (Borowsky y cols., 2002) y a su vez apoyaría la hipótesis postulada en la literatura que propone al bloqueo de la transmisión del sistema MCHérgico como estrategia terapéutica antidepressiva alternativa a las existentes (Borowsky y cols., 2002; Chaki y cols., 2005; Catena-Dell'Osso y cols., 2013). Es importante destacar que los efectos inducidos por la microinyección de MCH así como por la inmunoneutralización, evaluados en el TNF, no se correspondieron con afectaciones a nivel locomotor evaluadas en el modelo de campo abierto (CA). Por el contrario, MCH indujo un aumento en la actividad motora en el CA, al mismo tiempo y dosis que generó el efecto pro-depresivo en el TNF, demostrando la especificidad del efecto observado en el TNF (Lagos y cols., 2011b). En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo 5-HTérgico en la base de las respuestas inducidas por MCH intra-NDR evaluadas en el TNF. Estos datos se relacionan estrechamente con la inhibición de la descarga de neuronas tipo-5-HTérgicas del NDR inducida por

MCH (Devera y cols., 2014). De manera interesante, estos resultados están en concordancia con aquellos publicados por Temel y colaboradores (2007) quienes demostraron que la inhibición de neuronas 5-HTérgicas del NDR, por estimulación del núcleo subtalámico, se correlacionó temporalmente de manera directa con una respuesta pro-depresiva en el TNF (Temel y cols., 2007). Dicho efecto además, era prevenido por un pre-tratamiento sistémico y repetido con el antidepresivo ISRS, citalopram (Temel et al., 2007). Estos mismos autores demostraron que dicha inhibición 5-HTérgica se correlacionó además, con una disminución en los niveles extracelulares de 5-HT en regiones terminales como el CE y la CPF (Tan y cols., 2012).

De acuerdo a la información presentada, sabemos que las neuronas MCHérgicas hipotalámicas proyectan al NDR y NMR. Sin embargo, el patrón de inervación MCHérgico no ha sido extensamente caracterizado. A su vez, está establecido que el NDR y NMR son núcleos fuertemente asociados a la regulación de los estados emocionales y que, una activación MCHérgica específicamente en el NDR induce efectos conductuales tipo-depresivos, involucrando en parte, al sistema 5-HTérgico. La caracterización farmacológica del efecto pro-depresivo así como la profundización en el estudio de la interacción entre el sistema MCHérgico, el sistema 5-HTérgico y otros sistemas de neurotransmisión en los núcleos del rafe aportará información relevante sobre el papel fisiológico de la MCH endógena en estos núcleos y sus posibles implicancias en la depresión. A su vez, el estudio de la influencia de MCH en la inducción de comportamientos vinculados a la ansiedad contribuirá a esclarecer el papel de MCH en el rafe y su posible implicancia en condiciones patológicas.

II. HIPÓTESIS

En base a las evidencias expuestas anteriormente, esta Tesis de Doctorado se basó en la hipótesis de que la modulación del sistema MCHérgico en los núcleos del rafe induce comportamientos asociados a un estado tipo-depresivo en rata y que su acción está mediada por una inhibición sobre las neuronas 5-HTérgicas del rafe. Además, que el efecto pro-depresivo se acompaña de un efecto ansiogénico.

III. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta tesis fue avanzar en la caracterización de los efectos comportamentales pro-depresivos inducidos por MCH en los núcleos del rafe, dorsal y medial. Con el fin de profundizar en el estudio de la interacción entre MCH y el NDR, se caracterizó la distribución regional y celular de la inervación MCHérgica, el efecto de MCH sobre los niveles extracelulares de 5-HT y su efecto sobre la ansiedad experimental.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización de los efectos comportamentales de MCH en los núcleos del rafe.

1.1 Evaluar la duración y dependencia de la dosis del efecto pro-depresivo inducido por MCH en el NDR utilizando el TNF.

1.2 Determinar si el efecto de MCH en el NDR es mediado por el MCHR-1, utilizando el antagonista selectivo ATC-0175.

1.3 Evaluar si el efecto pro-depresivo inducido por MCH en el NDR es bloqueado por el pre-tratamiento con un fármaco antidepresivo con mecanismo de acción NAérgico.

1.4 Evaluar si el efecto pro-depresivo inducido por MCH en el NDR se relaciona con cambios en conductas de ansiedad experimental.

1.5 Evaluar el efecto comportamental inducido por MCH en el NDR en el TNF y determinar la dosis-dependencia del efecto.

2. Determinar la distribución de la inervación MCHérgica en el NDR.

2.1 Estudiar el patrón de inervación MCHérgica según subregiones del NDR.

2.2 Determinar la existencia de aposiciones entre las fibras MCHérgicas y las neuronas 5-HTérgicas del NDR.

2.3 Determinar la existencia de aposiciones entre las fibras MCHérgicas y las neuronas GABAérgicas del NDR.

3. Evaluación de los efectos de MCH sobre la transmisión 5-HTérgica en el NDR.

3.1 Determinar el efecto de MCH sobre los niveles extracelulares de 5-HT en el NDR mediante la técnica *in vivo* de microdiálisis intracerebral.

1. Animales

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normas éticas establecidas y aprobadas por el Comité de Ética en el Uso de Animales del IIBCE y de acuerdo con la Ley de Nacional de Experimentación Animal N° 18.611. Se tomaron las medidas necesarias para minimizar el estrés de los animales y utilizar el número mínimo necesario para obtener resultados confiables y reproducibles. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 230-270 gr provenientes del Bioterio del IIBCE. Los animales fueron criados y alojados en cajas de 48.0 x 37.5 x 21.0 cm en grupos de 5-6 animales y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad (7:00 AM-7:00 PM), alimentación y agua *ad libitum*.

2. Drogas y vías de administración

MCH fue obtenida en Phoenix Pharmaceuticals (CA, USA) y el antagonista MCHR-1 [N-[cis-4-[[4-(Dimetilamino)-2-quinazolinil]amino]ciclohexil]-3-4-difluorobenzamida clorhidrato (ATC-0175) fue obtenido en Tocris Bioscience (Bristol, UK). El clorhidrato de nortriptilina (Nor) fue donado por Urufarma (Uruguay). La MCH fue disuelta en solución salina, fraccionada y conservada a -20 °C hasta el momento de ser utilizada. ATC-0175 fue inicialmente disuelto en Tween 80 al 15% en agua destilada y llevado a una concentración de 10 mM fraccionada y mantenida a -20 °C. El día del experimento se diluyó el antagonista con agua destilada para obtener una concentración final de 1 mM. El vehículo correspondiente fue Tween 80 a una concentración final de 1.5 %. Para los experimentos comportamentales, MCH y ATC-0175, así como sus vehículos

fueron administrados intracerebralmente (las condiciones se mencionan mas adelante). En el caso de Nor, la vía de inyección fue intraperitoneal (i.p.) y el volumen de inyección fue de 1 ml/kg.

3. Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilasina (5 mg/kg) administrada por vía i.p. y colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) para la implantación de cánulas guía en el NDR o NMR. Las coordenadas para la implantación de las cánulas guía fueron las siguientes: NDR (cánula de 21G, 20 mm): AP: -7.8; L: -3.0; DV: -5.0 mm desde la duramadre; en ángulo de 30°; NMR (cánula de 25 G, 20 mm): AP: -7.5; L: 2.6; DV: -6.3 mm en ángulo de 20°. Las coordenadas se determinaron a partir de Bregma según el atlas de Paxinos y Watson (2005). Las cánulas fueron aseguradas al cráneo mediante la implantación de tres tornillos y fijadas con acrílico dental 1 o 2 mm por encima del sitio final de inyección en el eje dorso-ventral. Luego de la cirugía los animales fueron mantenidos en cajas individuales hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente devueltos a sus cajas en grupos de 3 o 4 y trasladados nuevamente al bioterio.

4. Administración de las drogas intra-NDR y NMR

El día del test comportamental se administró MCH (25, 50 o 100 ng), ATC-0175 (1 mM) o sus respectivos vehículos de forma local a través de una cánula de administración conectada a una bomba de microinyección (Harvard PHD 2000). En el NDR, la posición final de la cánula de administración (24 G para NDR y 27 G para NMR) fue de -6.0 mm en la coordenada dorso-ventral, mientras que la posición final de la cánula de administración en el NMR fue -8.3 mm. El flujo de administración fue de 0.1 μ l/min y 0.4 μ l/min en el NDR y NMR, respectivamente y el volumen final de inyección fue de 0.2 μ l en el NDR y 0.1 μ l en el NMR.

5. Modelos conductuales

Todos los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en el cuarto de experimentación del Departamento de Neurofarmacología Experimental del IIBCE bajo condiciones de temperatura y ciclo luz-oscuridad similares a las existentes en el bioterio. Los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento 24 hs antes de la realización de cada experimento y fueron siempre manipulados por el mismo experimentador para lograr su correcta habituación. Los animales fueron monitorizados durante todo el período de recuperación post-operatorio y los experimentos conductuales fueron realizados 5-6 días posteriores a la cirugía. Los animales fueron utilizados una sola vez y los grupos experimentales fueron balanceados para mantener todos los tratamientos dentro de cada sesión experimental.

5.1. Test de Nado Forzado (TNF)

El TNF es un modelo que fue descrito por Porsolt en 1978. Está basado en la observación de que los roedores forzados a nadar (situación de estrés inescapable), luego de una etapa inicial de movimiento orientado a escapar, desarrollan una postura inmóvil (Porsolt y cols., 1978; 2001; Fig. 12). Posteriormente fue modificado (Detke y cols., 1995; Lucki, 1997) y ha sido desde entonces ampliamente utilizado por su capacidad de detectar drogas con propiedad como antidepresivos, permitiendo realizar un rápido *screening* de nuevas drogas en roedores. Consiste de un recipiente cilíndrico de plástico con paredes opacas que tiene 24 cm de diámetro y 50 cm de alto, profundidad del agua a 30 cm, y temperatura mantenida en 23-24 °C.

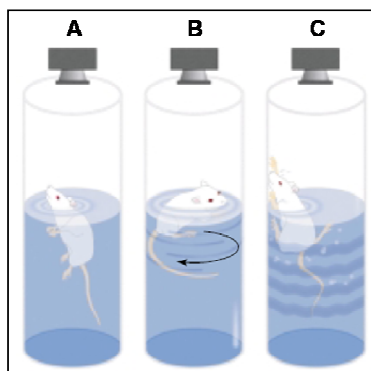


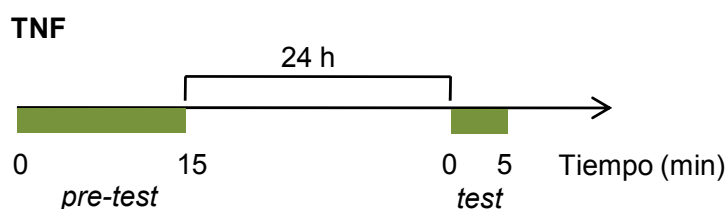
Figura 12. Ilustración que representa los comportamientos desarrollados por las ratas en el TNF. Una vez introducidos en el agua, los animales realizan tres comportamientos principales: **A-** inmovilidad, **B-** nado y **C-** *climbing*. Tomado y modificado de Cryan y cols., 2002.

El modelo consiste en la exposición de los animales a dos sesiones de nado. En una primera sesión denominada *pre-test*, los animales son dejados en el recipiente durante 15 min. y no se registran comportamientos. Posteriormente, son retirados, secados y devueltos a sus cajas originales. Veinticuatro horas después, los animales son sometidos a una segunda sesión de nado de 5 min. de duración (*test*) durante la cual se evalúa el efecto del tratamiento sobre los comportamientos de nado, inmovilidad y escalamiento (Fig. 12).

La administración sistémica de drogas antidepresivas, efectivas en la clínica, aumenta los comportamientos activos orientados a escapar de la situación (Fig 12; nado y escalamiento o *climbing*) y disminuyen el tiempo de inmovilidad o comportamiento pasivo (Fig. 12; Cryan y cols., 2005). A su vez, este modelo permite discriminar antidepresivos con diferente mecanismo de acción tales como ISRS o ISRN (Detke y cols., 1995; Cryan y cols., 2005). Adicionalmente y de forma más reciente, se ha descrito la sensibilidad de este modelo para evidenciar respuestas comportamentales pro-depresivas, las que se definen por un aumento en la inmovilidad y una disminución del nado y escalamiento (Temel y cols., 2007; Shaw y cols., 2009; Lagos y cols., 2011b). La inmovilidad se define como aquella postura en la cual el animal realiza los movimientos mínimos necesarios para mantenerse a flote (Fig. 12A). El nado es definido de acuerdo al movimiento de

nado (usualmente horizontal, Fig.12B) y desplazamiento a través del cilindro mientras que el *climbing* se cuantifica en función de los movimientos vigorosos que realiza el animal en dirección ascendente con las patas delanteras sobre las paredes del cilindro (Fig. 12C; Cryan y cols., 2002).

En este trabajo, los comportamientos fueron cuantificados por observación directa y por dos observadores simultáneamente (uno de ellos ciego al tratamiento) y de acuerdo al protocolo experimental del Esquema 1.



Esquema 1. Protocolo experimental utilizado en el TNF en ratas. TNF = Test de Nado Forzado.

5.1.1. Determinación de curva tiempo-respuesta

Los animales fueron evaluados en dos tiempos post-administración de MCH o su vehículo (salino) intra-NDR: 30 y 60 min. (T_{30} y T_{60} , respectivamente). La dosis de MCH utilizada (50 ng) para esta serie de experimentos fue determinada a partir de nuestros antecedentes (Lagos y cols., 2011b).

5.1.2. Determinación de curva dosis-respuesta

Las dosis de MCH ensayadas fueron 25, 50 y 100 ng. La evaluación de la dependencia de la dosis del efecto de MCH en el TNF se realizó al tiempo de evaluación T_{30} .

5.1.3. Determinación de la especificidad de la acción de MCH

Para determinar si el efecto de MCH era mediado por el MCHR-1, el antagonista del MCHR-1, ATC-0175 (1 mM) o su vehículo (H₂O-Tween 80 1.5 %), fueron microinyectados intra-NDR 10 min. previos a la administración de MCH (50 ng) y evaluados en el TNF a T₃₀. Los grupos experimentales fueron los siguientes: vehículo + salino, vehículo + MCH, ATC-0175 + salino y ATC-0175 + MCH.

5.1.4. Determinación del efecto de un antidepresivo NAérgico

Para evaluar si el efecto pro-depresivo inducido por MCH era prevenido por el pre-tratamiento con Nor, los animales fueron inyectados con Nor (20 mg/kg) o salino, 23, 5 y 1 h previo al *test* (Detke y cols., 1995; Consoni y cols., 2006). MCH (50 ng) o su vehículo fueron administrados de forma local intra-NDR y fueron evaluados en el TNF a T₃₀. Los grupos experimentales fueron los siguientes: salino + salino, salino + MCH, Nor + salino y Nor + MCH.

5.1.5. Determinación del efecto de MCH en el NMR

Para evaluar el efecto comportamental inducido por la administración de MCH en el NMR los animales fueron evaluados en el TNF a T₃₀ luego de la administración MCH (50 o 100 ng) o salino intra-NMR.

5.2. Campo Abierto (CA)

El CA es un modelo ampliamente utilizado para evaluar la actividad locomotora horizontal así como la exploración vertical (Montgomery y Monkman 1955; Archer 1973). El aparato consiste en una caja de 60 x 60 cm con paredes de acrílico rojo de 40 cm de alto y posee una cámara de video colocada encima del CA a través de la cual se filma la conducta de los animales (López-Hill y cols. 2011). Todos los animales fueron *naïve* al CA. Posteriormente a través del programa de video-seguimiento Ethovision XT 7.0 (Noldus) se analizaron los videos y se cuantificaron automáticamente los siguientes parámetros: distancia recorrida total (en metros como índice de actividad locomotora) y tiempo de permanencia en el centro. Los animales fueron administrados intra-NDR con MCH

(25, 50 o 100 ng) o salino y evaluados en el CA a T_{30} y el tiempo de registro fue de 5 min. Para el caso de la administración intra-NMR las dosis de MCH ensayadas fueron 50 y 100 ng y evaluados en el CA a T_{30} . El tiempo de registro fue de 5 min.

5.3. Laberinto en cruz elevado (LCE)

El LCE es un modelo de ansiedad experimental en roedores que se basa en respuestas no condicionadas a ambientes potencialmente peligrosos. Fue desarrollado por Montgomery (1955) y validado en ratas por Pellow y colaboradores (1985). Este modelo es sensible al ensayo de fármacos con acción ansiogénica y/o ansiolítica.

El aparato está constituido por dos brazos abiertos cruzados en ángulo recto por dos brazos cerrados por paredes laterales (40 cm) que se extienden a partir de una plataforma central de 10 x 10 cm y está elevado a 50 cm del suelo (Fig. 13). Dado que los roedores tienen un miedo innato a los espacios abiertos y elevados, los brazos abiertos combinan ambos estímulos aversivos (Lister, 1990).

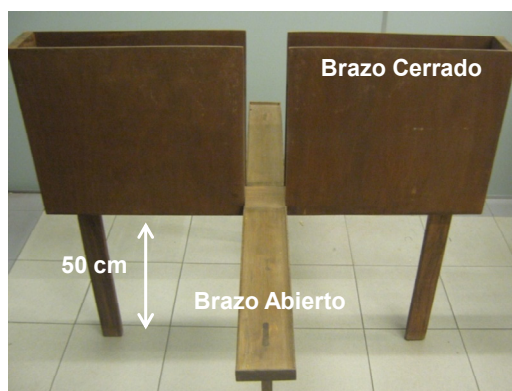


Figura 13. Modelo de Laberinto en cruz elevado o *Elevated plus maze*. En la fotografía se señala uno de los brazos abiertos y cerrados y se indica la elevación desde el suelo.

Los animales fueron administrados con MCH (50 ng) o salino y evaluados a T_{30} y fueron colocados en el centro del laberinto con su cabeza orientada hacia un brazo cerrado. El tiempo de registro fue de 5 min. durante los cuales se los dejó explorar el ambiente libremente. Se cuantificaron por observación directa los

siguientes parámetros: 1) número de entradas a los brazos abiertos y cerrados; 2) tiempo de permanencia en ambos brazos. Se consideró como criterio de entrada a los brazos la introducción de las cuatro patas del animal dentro del mismo. Además, cuantificamos las siguientes conductas: 1) evaluación de riesgo o *risk assessment* (parámetro que se cuantifica sobre el brazo cerrado y consiste en el estiramiento del cuerpo del animal hacia el brazo abierto sin abandonar el brazo cerrado) y 2) hundimientos de cabeza o *head dipping* (conducta medida en el brazo abierto cuando el animal explora fuera del margen del brazo en dirección al suelo). La cuantificación de estas conductas en el LCE complementa las observaciones realizadas a partir de los parámetros clásicos (número de entradas y tiempo en los brazos abiertos y cerrados) y colabora en la caracterización del perfil ansioso/ansiolítico de los animales (Rodgers y cols., 1997; Weiss y cols., 1998; Carobez y Bertoglio, 2005). Ambas conductas son habituales en animales control, sin embargo, las drogas ansiolíticas aumentan el número de *head dipping* y disminuyen el de *risk assessment*, mientras que las drogas ansiogénicas inducen el efecto opuesto.

Los experimentos fueron filmados y mediante la utilización del software Ethovision XT 7.0 se cuantificó la distancia recorrida (m) como índice de la actividad locomotora de los animales en el momento del test.

6. Localización de la cánula guía-microinyección

Luego de finalizados todos los experimentos conductuales los animales fueron sacrificados, se disecó el cerebro y se congeló a -20°C. Se corroboró la correcta localización de la cánula mediante cortes coronales de cerebro en un crióstato utilizando el atlas de Paxinos y Watson (2005) como referencia. Aleatoriamente fueron seleccionados animales de diferentes experimentos los cuales fueron procesados para la obtención de cortes histológicos de cerebro a congelación y la posterior tinción mediante la técnica de Nissl. Aquellos animales con cánulas localizadas fuera de la región de interés, fueron descartados.

7. Ensayos de Inmunofluorescencia

7.1. Obtención y procesamiento del tejido

Los animales fueron anestesiados con uretano (1.2 g/kg i.p.) y perfundidos por vía transcardíaca con solución salina e inmediatamente después con una solución fijadora (paraformaldehído -PFA- 4 % o PFA 4 % - glutaraldehído 0.5 %) durante 30 min. (flujo de perfusión de 25 ml/min). Los cerebros fueron disecados y fijados por inmersión en una solución de PFA 4 % - sacarosa 20 % durante 2 hs. Luego fueron mantenidos en una solución de sacarosa (20 %) durante 24 a 48 hs. Posteriormente los cerebros fueron incluidos en el montante CryO-Z-T (Ted Pella, Inc) e inmediatamente congelados en hielo seco y mantenidos a -80°C hasta la realización de los cortes. Se obtuvieron cortes coronales (30 µm de espesor) en un criostato (Leica, Alemania) a -22 °C. Los cortes obtenidos a nivel del NDR fueron recogidos en flotación en una solución anticongelante (Solución de Olmos) y mantenidos a -20 °C hasta su procesamiento.

Para la inmunodetección combinada de los antígenos MCH y GAD-67 en el NDR los animales utilizados fueron pre-tratados con una inyección estereotáxica en el ventrículo lateral (AP: -0.9; L: 1.6; DV: -3.4 a partir de Bregma) del inhibidor del transporte anterógrado, colchicina (6 mg/ml en 10 µl). El flujo de administración fue de 2µl/min durante 5 min. y 5 min. de espera adicional para permitir la difusión de la droga. La administración de colchicina es habitualmente utilizada como estrategia para concentrar neurotransmisores o enzimas de síntesis de diversos neurotransmisores en el soma. Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para concentrar a la enzima GAD-67 en el soma y así detectar la presencia de neuronas GABAérgicas en el SNC (Stamp y Semba, 1995; Bombardi, 2012). Posteriormente los animales fueron suturados, devueltos a sus cajas y mantenidos en el cuarto de comportamiento durante 24 hs hasta la perfusión transcardíaca con PFA 4% - glutaraldehído 0.5 % y el procesamiento posterior del tejido.

7.2. *Inmunodetección in situ*

Para todos los ensayos de inmunofluorescencia los cortes fueron procesados en libre flotación. En primer lugar los cortes fueron sometidos a varias sesiones de lavado con una solución tampón salina para eliminar la solución anticongelante. Seguidamente fueron incubados en una solución de borohidruro de sodio (0.5 %) durante 25 min., nuevamente lavados en PBS e incubados posteriormente en una solución que contiene glicina (50 mM) y albúmina de suero bovino (0.1 %) durante 60 min. Luego de varios lavados en PBS los cortes fueron incubados en una solución de bloqueo que contiene: suero normal de burro (NDS; 5 %), DL-Lisina (0.1 %); Triton X-100 (0.1 %) en PBS durante 60 min. Estos procedimientos realizados previamente a la incubación con los anticuerpos primarios fueron utilizados como estrategia para reducir las uniones inespecíficas (no-inmunológicas) de los anticuerpos a moléculas del tejido y por otro lado disminuir la fluorescencia basal de los tejidos que pueda generarse por el uso de soluciones fijadoras con grupos aldehídos. Posteriormente los tejidos fueron expuestos a las combinaciones de anticuerpos primarios correspondientes (doble-inmuno-fluorescencia), diluidos en la misma solución de bloqueo mencionada anteriormente durante 48 hs a 4 °C. En la Tabla 1 se listan los anticuerpos primarios y secundarios empleados. Al final del período de incubación los cortes fueron lavados con PBS e incubados simultáneamente con los respectivos anticuerpos secundarios (Tabla 1), durante 90 min. a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron diluidos en una solución de DL-Lisina (0.1 %); Triton X-100 (0.1 %) en PBS. Al cabo de ese tiempo los cortes fueron lavados en PBS y por último recogidos en láminas gelatinizadas (Superfrost plus, Ted Pella, Inc) y cubiertos con cubreobjetos en medio de montaje adecuado (Citifluor, Londres, UK). Todos los lavados, bloqueos y la incubación con los anticuerpos secundarios fueron realizados en agitación. En todos los casos se realizaron controles de la especificidad de la inmunomarcación omitiendo la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios y secundarios utilizados

Anticuerpos Primarios				Anticuerpos Secundarios		
Antígeno	Tipo	Huésped y dilución	Fabricante	Anticuerpo y dilución	Fluoróforo	Fabricante
5-HT	Policlonal	Cabra; 1:500	ImmunoStar (WI, USA)	<i>Burro anti-cabra IgG</i>	Cy3 1:1500	Jackson ImmunoResearch (PA, USA)
GAD-67	Monoclonal	Ratón, 1:1000	Millipore (CA, USA)	<i>Burro anti-ratón IgG</i>	Alexa Fluor 488 1:1500	Jackson ImmunoResearch (PA, USA)
MCH	Policlonal	Conejo 1:5000	Phoenix Pharmaceuticals (CA, USA)	<i>Burro anti-conejo IgG</i>	Alexa Fluor 488 o Cy3 1:1500	Jackson ImmunoResearch (PA, USA)

7.3. Obtención, análisis y procesamiento de las imágenes.

La observación de los preparados y la captura de imágenes se realizaron con un microscopio confocal BX61-FV300 (Olympus, Japón) o TCS-SP5-DMI6000 (Leica Microsystems, Alemania).

Basados en los antecedentes que demuestran la heterogeneidad anatómica y funcional del NDR, subdividimos este núcleo en diferentes sectores ántero-posteriores basados en la nomenclatura utilizada por Gardner y cols. (2005) y Spiacci y cols. (2012). Teniendo en cuenta los cuatro sectores rostro-caudales del NDR y utilizando Bregma como referencia se dividió el NDR en subregiones: rafe rostral (AP: -7.08), rafe medial-rostral (AP: -7.56), rafe medial-caudal (AP: -8.04) y rafe caudal (AP: -8.76), mientras que en el sentido dorso-ventral, se definieron las

subregiones dorsal (DRD), ventral (DRV) y alas laterales (lwDR) según el atlas de Paxinos y Watson (Fig. 2). En cada una de estas subregiones fueron obtenidas imágenes confocales y se analizó la existencia de aposiciones entre fibras MCHérgicas y neuronas 5-HTérgicas. A su vez, específicamente en las alas laterales se determinó la existencia de aposiciones entre fibras MCHérgicas y neuronas GABAérgicas. Las aposiciones se detectaron a través de la realización de cortes ortogonales de la compaginación de cortes ópticos (Z-stacks) utilizando el software Fluoview 5 (Olympus, Japón) o LAS AF 2.6.0.7266 (Leica Microsystems, Alemania). Las imágenes fueron procesadas (ajuste de brillo y contraste) utilizando el software AdobePhotoshop CS2

8. Microdiálisis intracerebral

Los animales fueron implantados mediante cirugía estereotaxica con cánulas guía (BASi, MD-2250) en el NDR utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente (ítem 3). Los animales fueron mantenidos en el cuarto de comportamiento en cajas individuales conectados a un sistema que permite su libre movimiento durante todo el experimento. Veinticuatro horas después de la cirugía, a través de la cánula guía, se insertó la cánula de diálisis con una longitud de membrana de 2 mm, diámetro externo 320 μm y un tamaño de poro de 30 Kdaltons (BASi; MD-2200). La coordenada DV final fue de -7.0 mm. La cánula de diálisis fue conectada a una bomba de perfusión (Harvard PHD 2000) a un flujo de 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ por la cual se perfundió constantemente líquido cefaloraquídeo artificial (LCRa; NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, MgCl_2 1.18 mM, CaCl_2 1.26 mM; pH = 6.8) en presencia del ISRS, citalopram (1 μM). El agregado de citalopram al LCR es una estrategia metodológica ampliamente utilizada para aumentar los niveles extracelulares basales de 5-HT, debido a que cuando se espera una disminución en los niveles de 5-HT, su límite de detección puede quedar por debajo del límite de sensibilidad de equipo (Adell y cols., 2002).

Luego de la inserción de la cánula de diálisis y se permitió la estabilización del sistema por un período de 100 min. Inmediatamente después se comenzó con la colecta de las muestras cada 20 minutos (30 μ l de volumen cada muestra). Luego de la colecta de 4 muestras basales con niveles estables de 5-HT, se perfundió a través de la cánula de diálisis (diálisis reversa) MCH a una concentración de 30 y 100 μ M (en grupos independientes de animales) durante 40 min. y posteriormente se colectaron muestras durante 100. min adicionales. El grupo control fue perfundido durante todo el experimento con LCRa-citalopram.

8.1. Sistema de análisis de las muestras de diálisis

Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de su colecta mediante un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica (HPLC-DE). El equipo de HPLC-DE (Waters 2465) estuvo equipado con una columna C-18 (partículas 100 A, 100 mm x 2 mm; Phenomenex Luna) y un detector electroquímico Epsilon eP5. El potencial de oxidación fue fijado a +0.60 V de acuerdo al electrodo de referencia Ag/AgCl. La composición de la fase móvil fue la siguiente: ácido cítrico (0.15 M), octil sulfato de sodio (0.25 mM), acetonitrilo 4% y tetrahidrofurano 5% a pH = 3.0 y el flujo de trabajo fue de 0.8 ml/min. El límite estimado de detección para 5-HT fue de 5 fmol/muestra. La concentración de 5-HT en las muestras de diálisis fue determinada a partir de la comparación con una solución estándar de concentración conocida.

8.2. Localización de las cánulas de diálisis

Luego de finalizados los experimentos de microdiálisis todos los animales fueron sacrificados y se disecó el cerebro para la verificación de la localización de la cánula de microdiálisis en cortes coronales de cerebro realizados en un crióstato de manera similar a los decrito anteriormente. Aquellos animales con cánulas localizadas fuera de la región de interés, fueron descartados.

9. Análisis de datos

Los datos fueron expresados como la Media \pm Error Estándar de la media (EEM). Para todos los datos se realizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Los datos comportamentales fueron analizados utilizando el test *t* de Student o mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de comparación múltiple de Newman-Keuls. Los datos de microdiálisis intracerebral fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías para muestras repetidas seguido del test de Bonferroni. Para ello utilizamos el software GraphPad Prism 5.01. La significación estadística fue establecida para $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados que se describirán en este capítulo se enmarcan dentro del primer objetivo específico planteado en esta tesis: Caracterización de los efectos comportamentales inducidos por la administración local de MCH en los núcleos del rafe.

Con el fin de llevar a cabo dicho objetivo, se realizó la caracterización farmacológica del efecto pro-depresivo inducido por la administración de MCH intra-NDR e intra-NMR en el TNF. Dicha caracterización consistió en:

- Evaluar la dependencia del tiempo y de la dosis del efecto pro-depresivo inducido por MCH en el NDR.

- Determinar si el efecto pro-depresivo inducido por MCH es mediado por el MCHR-1 en el NDR, mediante la utilización del antagonista selectivo MCHR-1, ATC-0175.

- Evaluar si el efecto pro-depresivo inducido por MCH en el NDR es bloqueado por el pre-tratamiento sistémico con un fármaco antidepresivo con un mecanismo de acción NAérgico.

- Evaluar si el efecto pro-depresivo inducido por MCH en el NDR se relaciona con cambios en conductas de ansiedad experimental utilizando el LCE.

- Evaluar el efecto comportamental inducido por la administración de MCH intra-NMR en el TNF y determinar si el efecto inducido era dependiente de la dosis.

Los resultados obtenidos demuestran que el efecto pro-depresivo inducido por la administración de MCH intra-NDR evaluado en el TNF, fue dependiente del tiempo de evaluación. De forma similar a lo previamente descrito por nuestro grupo para la dosis de MCH de 50 ng evaluada a T_0 (Lagos y cols., 2011b), MCH a T_{30} mantiene su efecto pro-depresivo. Sin embargo, a T_{60} , este efecto ya no se expresa en su totalidad.

Si tenemos en cuenta la vida media descrita para MCH en ensayos *in vitro* $t_{1/2}$: 32.8 min. (Maulon-Feraille y cols., 2002), es posible especular que los efectos

de MCH en el TNF en el período de tiempo T_0 - T_{30} estén mayormente mediados por su acción directa en el NDR, mientras que a T_{60} la disminución mantenida en *climbing* podría deberse a un efecto residual o a cambios distales desencadenados por la acción inicial local de MCH. Sin embargo, *in vivo* otros mecanismos de inactivación de la acción de MCH, tales como difusión o internalización no pueden descartarse.

A su vez, manteniendo el tiempo a T_{30} , observamos que el efecto pro-depresivo inducido por MCH fue dependiente de la dosis, siendo 50 ng la dosis más efectiva. Sin embargo, la dosis de 25 ng indujo una respuesta contraria al efecto pro-depresivo, generando una reducción de la inmovilidad, sugiriendo que MCH podría generar efectos opuestos.

Se confirmó que los efectos comportamentales inducidos por las diferentes dosis de MCH ensayadas, evaluadas en el TNF, eran específicos e independientes de las alteraciones observadas en la actividad locomotora de los animales dado que ninguna de las dosis ensayadas modificó la distancia recorrida en el CA.

Teniendo en cuenta estos resultados, concluimos que las condiciones óptimas para la caracterización del efecto pro-depresivo agudo inducido por MCH son: dosis de MCH 50 ng evaluada a T_{30} .

El efecto pro-depresivo de MCH estuvo mediado específicamente por el MCHR-1 expresado en el NDR, ya que dicho efecto fue bloqueado en presencia del antagonista MCHR-1 ATC-0175.

El bloqueo completo por nortriptilina del efecto pro-depresivo inducido por MCH lleva a postular la existencia de un mecanismo NAérgico subyacente a la acción de MCH en el NDR. Es posible que la aplicación de MCH intra-NDR reduzca la liberación local del NA (por acción directa del MCHR-1 sobre terminales NAérgicas), reduciendo el tono facilitador NAérgico sobre las neuronas 5-HTérgicas y alterando el balance 5-HT/NA. Sin embargo, no se puede descartar que el efecto antidepressivo inducido por Nor prevalezca sobre el tono MCHérgico.

Por otra parte, el bloqueo por nortriptilina demuestra que el efecto pro-depresivo de MCH es sensible al tratamiento con antidepresivos con mecanismo de acción 5-HTérgico, así como NAérgico.

Contrario a lo que se esperaba, el efecto pro-depresivo inducido por la MCH intra-NDR no se vio acompañado de cambios en la ansiedad experimental de los animales evaluada en el LCE. Este resultado sugiere que el sistema MCHérgico en el NDR no estaría ejerciendo una acción funcional en relación a la ansiedad, al menos a la dosis y tiempo en que aparece el efecto pro-depresivo. Es posible especular, que MCH actuando a nivel del NDR, sería capaz de discriminar entre ambas entidades comportamentales. Sin embargo, no se puede descartar que la perfusión de MCH no haya alcanzado la subregión caudal del rafe, vinculada preferencialmente a la aparición de conductas de ansiedad (Hale y cols., 2012). Futuros experimentos deberán ser diseñados para micro-inyectar MCH a ese nivel y confirmar si existe o no una contribución específica de la función MCHérgica en relación a las diferentes subregiones del rafe y al correlato conductual (aparición de conductas pro-depresivas y de ansiedad). Por otra parte, si bien no podemos desconocer que MCH aumentó el tiempo en el centro en el CA, el cual podría interpretarse como un efecto ansiolítico, el LCE es considerado un modelo más específico para la evaluación de conductas de ansiedad (Razafsha y cols., 2013). Sin embargo, la evaluación de los efectos de MCH en otros *test* conductuales de ansiedad experimental contribuiría a esclarecer el papel de MCH actuando a nivel del NDR y su relación con la ansiedad.

Por otro lado, la administración de MCH intra-NMR indujo un efecto pro-depresivo en el TNF, al igual que el observado luego de la administración de MCH en el NDR. Este efecto fue dependiente de la dosis ensayada. Sin embargo, el efecto pro-depresivo presentó un perfil de respuesta, y sensibilidad a la dosis de MCH diferente al descrito para el NDR. Mientras que MCH 50 ng evaluada a T₃₀ en el NMR no indujo cambios en el TNF, la respuesta en el NMR apareció a la dosis de 100 ng. Sumado a esto, el perfil conductual se caracterizó por un aumento en la inmovilidad y una disminución en el tiempo de nado, sin modificar el

climbing. Este efecto es similar al inducido por un ISRS, sugiriendo la participación de un mecanismo 5-HTérgico neto subyacente a las acciones de MCH en el NMR.

Se confirmó que los efectos comportamentales inducidos por las dosis de MCH ensayadas, evaluados en el TNF, eran específicos e independientes de las alteraciones observadas en la actividad locomotora de los animales evaluada en el CA.

Concluimos que el NMR sería otro de los sustratos anatómicos para la acción de MCH vinculada a la modulación de los estados emocionales. Diferencias anatómicas intrínsecas entre ambos núcleos, en la densidad y localización de receptores MCHR-1 así como en el patrón de inervación MCHérgico, podrían explicar los efectos específicos de MCH en ambos núcleos.

El conjunto de resultados obtenidos fue incluido en dos artículos científicos:

ARTÍCULO I

“Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors, and reversion by nortriptyline”. Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Scorza C. *Behavioural Pharmacology*, 25: 316-324; 2014.

ARTÍCULO II.

“The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH: Differences with the dorsal raphe nucleus”. Lopez-Hill X, Pascovich C, Urbanavicius J, Torterolo P, Scorza C. *Peptides*, 50: 96-99; 2013.

Los resultados que se describirán en este capítulo se enmarcan dentro del segundo y tercer objetivo específico planteados en esta tesis: Determinar la distribución de la inervación MCHérgica en el NDR y evaluación de los efectos de MCH sobre la transmisión 5-HTérgica en el NDR.

Con el fin de llevar a cabo estos objetivos realizamos una caracterización de la inervación MCHérgica al NDR y evaluamos los cambios neuroquímicos sobre la transmisión 5-HTérgica en el NDR. Este trabajo consistió en:

- Estudiar el patrón de inervación MCHérgica en el NDR teniendo en cuenta las diferentes subregiones.
- Determinar la existencia de aposiciones entre las fibras MCHérgicas y las neuronas 5-HTérgicas, según la regionalidad anatómica del NDR.
- Evidenciar la existencia de aposiciones de las fibras MCHérgicas del NDR con neuronas GABAérgicas en las alas laterales del NDR.
- Estudiar los cambios en los niveles extracelulares de 5-HT en el NDR luego de la aplicación local de MCH. Establecer la dependencia de la dosis.

En este trabajo observamos que las fibras MCHérgicas se presentan en forma de varicosidades e inervan de una forma leve a moderada el NDR, de acuerdo a lo descrito por Bittencourt y colaboradores (1992). Demostramos que las mismas se distribuyen de manera homogénea en toda la extensión rostro-caudal y dorso-ventral del NDR y se entremezclan con las neuronas 5-HTérgicas del núcleo con las cuales establecen aposiciones en todas las sub-regiones analizadas. De esta forma MCH podría ejercer acciones directas sobre las neuronas 5-HTérgicas modulando así, su actividad. Las fibras MCHérgicas también establecen aposiciones con las neuronas GABAérgicas localizadas en las alas laterales del NDR. Al igual que lo propuesto para las neuronas 5-HTérgicas, MCH podría modular de manera directa la actividad de las neuronas GABAérgicas.

Demostramos que MCH induce cambios sobre la liberación de 5-HT y que estos efectos son opuestos y dependientes de la dosis. Basados en los resultados anatómicos, una acción directa de MCH sobre las neuronas 5-HTérgicas y GABAérgicas podría explicar los resultados neuroquímicos. Es posible especular que la disminución en los niveles de 5-HT a bajas concentraciones MCH, se explique por la acción inhibitoria de MCH directa sobre las neuronas 5-HTérgicas.

Por otro lado, el aumento de 5-HT (obtenido luego de la perfusión de una concentración mayor de MCH) podría vincularse a la inhibición de las neuronas GABAérgicas, desencadenando la liberación de la inhibición de las 5-HTérgicas ejercida por las neuronas GABAérgicas (desinhibición). Por otro lado, los resultados neuroquímicos indican que MCH sería más potente en producir su efecto inhibitorio directo sobre las neuronas 5-HTérgicas que sobre las GABAérgicas. Esto podría estar dado por las características anatómicas del núcleo así como una expresión diferencial de los MCHR-1 sobre ambos tipos celulares.

Este trabajo aporta información original acerca de la conectividad anatómica y funcional del sistema hipotalámico MCHérgico en el NDR.

El conjunto de resultados obtenidos forman parte de un manuscrito en preparación:

ARTÍCULO III

“MCHergic projections to the dorsal raphe nucleus: an immunohistochemical and microdialysis study”. Jessika Urbanavicius, Patricia Lagos, Pablo Torterolo and Cecilia Scorza. Peptides, 2015.

VII. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a la hipótesis planteada en esta tesis, hemos confirmado que MCH actuando a nivel del NDR, promueve la aparición de un comportamiento tipo-depresivo, extendiendo su acción al NMR. Este resultado sugiere que una activación aguda del sistema MCHérgico en los núcleos del rafe subyace a la aparición de conductas tipo-depresivas. Contrario a lo que se esperaba, el efecto tipo-depresivo no estaría acompañado de cambios en la ansiedad experimental, indicando que la acción neurobiológica de MCH particularmente en el NDR, sería específica y que, en las dosis y los tiempos analizados, permitiría discriminar entre ambas entidades comportamentales. Estos resultados colaboran además en el esclarecimiento de las evidencias contradictorias publicadas sobre las acciones de MCH en diferentes regiones del SNC en relación a la ansiedad. Sin embargo, la realización de experimentos que profundicen en la contribución específica de la función MCHérgica a distintos niveles del NDR y NMR, resultan de gran relevancia para confirmar dicha hipótesis.

Si bien habíamos sugerido que un mecanismo 5-HTérgico participa en las acciones conductuales de MCH, en el desarrollo de esta tesis demostramos que MCH en el NDR modula la neurotransmisión de 5-HT de una forma opuesta. Considerando que una acción antidepresiva aparece relacionada a un aumento en la transmisión 5-HTérgica, el efecto conductual pro-depresivo de MCH podría asociarse al efecto inhibitor sobre dicha transmisión. Sin embargo, deberán diseñarse experimentos que confirmen ésta relación directa. A su vez, es importante considerar que la acción de MCH en el NDR podría tener como consecuencia cambios en la transmisión 5-HTérgica en regiones terminales (por ejemplo en CPF o Hc) los cuales podrían también ser responsables de los efectos conductuales observados.

Los resultados morfológicos permitieron confirmar que el sistema MCHérgico establece contactos anatómicos en forma de aposiciones con las

neuronas 5-HTérgicas en toda la extensión del NDR, apoyando la hipótesis de una acción inhibitoria directa de MCH sobre este tipo neuronal. A su vez, se puso en evidencia la presencia de aposiciones anatómicas entre el sistema MCHérgico con neuronas GABAérgicas, sugiriendo la existencia de contactos sinápticos directos, los que permitirían explicar los cambios neuroquímicos sobre la liberación de 5-HT inducidos por MCH a altas concentraciones. En su conjunto, estos hallazgos aportan información sobre el sustrato neurobiológico que subyacería a las acciones de MCH a nivel del NDR. La extensión de este tipo de estudios morfológicos al NMR, permitirá establecer el sustrato anatómico para la acción de MCH en este núcleo y esclarecer las acciones diferenciales de MCH a nivel del NDR y NMR.

Si bien la hipótesis de trabajo se enmarca en la interacción entre el sistema MCHérgico y 5-HTérgico, no descartamos la participación de otro mecanismo que involucre la interacción de estos sistemas con el sistema NAérgico en el NDR.

En su conjunto, consideramos que los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen una contribución original al conocimiento de las características anatómicas del circuito entre el sistema hipotalámico MCHérgico y los núcleos del rafe dorsal y medial, así como de algunos mecanismos implicados en su funcionamiento. Proponemos que los cambios estructurales y/o funcionales en el sistema MCHérgico a nivel del rafe contribuirían al conocimiento de la regulación de los estados emocionales.

VIII. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos surgen una serie de perspectivas, alguna de las cuales se resumen a continuación:

- Si bien MCH induce un efecto pro-depresivo evaluado en el TNF, es necesario confirmar dicho efecto conductual utilizando otros *test* conductuales, tales como el *Test* de preferencia de sacarosa y de desesperanza aprendida, así como su sensibilidad a antidepresivos ISRS e ISRN. A su vez, dado que el efecto pro-depresivo de MCH se observó luego de una administración aguda intra-NDR, es necesario investigar si dicho efecto se mantiene luego de la administración repetida de MCH.
- Sería imprescindible confirmar si el efecto conductual pro-depresivo inducido por MCH intra-NDR se asocia de manera directa a una disminución en los niveles de 5-HT a nivel del NDR, NMR y en regiones terminales vinculadas con la fisiopatología de la depresión (Hc o CPF).
- Teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que existiría un mecanismo NAérgico en las acciones de MCH, es necesario confirmar si MCH intra-NDR modula los niveles extracelulares de NA y si un efecto pro-depresivo aparece luego la administración de MCH en el *Locus coeruleus*. Determinando la expresión del MCHR-1 en terminales NAérgicas en el NDR confirmaría un posible mecanismo de acción para MCH en éste núcleo.

Aunque nuestros resultados conductuales mostraron que MCH intra-NDR no indujo cambios en la ansiedad evaluada en el LCE, el tiempo en el centro en el CA se vio aumentado. En este contexto sería interesante evaluar los efectos de MCH intra-NDR en otros *test* conductuales de ansiedad como el *T-maze*. Por otra parte, sería interesante determinar si micro-inyecciones de MCH en subregiones específicas del NDR (como el

rafe caudal), generan alteraciones en las conductas de ansiedad experimental. Estos experimentos permitirán determinar si el sistema MCHérgico en las diferentes subregiones del NDR contribuye de manera específica a la inducción de conductas tipo pro-depresivas y/o de ansiedad.

- Si bien observamos una inervación MCHérgica homogénea en el NDR, es indispensable realizar un estudio cuantitativo con el fin de identificar posibles diferencias en la inervación MCHérgica en función de las subregiones estudiadas en el NDR. A su vez, sería interesante extender esta caracterización a aquellas regiones de proyección del NDR y NMR vinculadas con la fisiopatología de la depresión (Hc, CPF, Am).
- Si bien evidenciamos la presencia de aposiciones entre fibras MCHérgicas, neuronas 5-HTérgicas y GABAérgicas, es necesario confirmar, mediante microscopía electrónica o microscopía confocal de triple inmuno-marcado fluorescente con un marcador de sinapsis, si dichos contactos implican la presencia de sinapsis entre ambos componentes.
- Teniendo en cuenta las acciones diferenciales de MCH a nivel del NDR y NMR, sería interesante caracterizar el patrón de inervación MCHérgica y localización de los MCHR-1 a nivel del NMR, así como determinar si existen diferencias en la densidad de expresión del MCHR-1 entre ambos núcleos.

IX. REFERENCIAS

A

- Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, Lowry CA. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1018: 46–57. 2004.
- Adamantidis A, de Lecea L. A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides.* 30 (11): 2066-70. 2009.
- Adamantidis A, Salvert D, Goutagny R, Lakaye B, Gervasoni D, Grisar T, Luppi PH, Fort P. Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. *Eur J Neurosci.* 27: 1793-800. 2008.
- Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev.* 39:154-180. 2002.
- Adell A, Castro E, Celada P, Bortolozzi A, Pazos A, Artigas F. Strategies for producing faster acting antidepressants. *Drug Discov Today.* 10 (8): 578-85. 2005.
- Aghajanian GK, Vandermaelen CP. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci.* 2 (12): 1786-92. 1982.
- Ahnaou A, Drinkenburg WH, Bouwknecht JA, Alcazar J, Steckler T, Dautzenberg FM. Blocking melanin-concentrating hormone MCH (1) receptor affects rat sleep-wake architecture. *Eur J Pharmacol.* 579: 177-88. 2008.
- Alvarez E, Perez V, Artigas F. Pharmacology and clinical potential of vortioxetine in the treatment of major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 10: 1297–1307. 2014.
- American-Psychiatric-Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Forth ed., Washington DC; 1994.
- An S, Cutler G, Zhao JJ, Huang S, Tian H, Li W, Liang L, Rich M, Bakleh A, Du J, Chen J, Dai K. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 98 (13):7576-7581. 2001.
- Araneda S, Gysling K, Calas A. Raphe serotonergic neurons projecting to the olfactory bulb contain galanin or somatostatin but not neurotensin. *Brain Res Bull.* 49 (3): 209-14. 1999.

- Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacol.* 25: 892-903. 2001.
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res.* 136: 443-453. 2002.
- Archer J. Test for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 21 (2): 205-235. 1973.
- Artigas F. Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *Eur Neuropsychopharmacol.* DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.04.013>. *In Press*.

B

- Bach-Mizrachi H, Underwood M D, Kassir S A, Bakalian M J, Sibille E, Tamir H, Mann JJ, Arango V. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacol.* 31: 814-24. 2006.
- Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Tin A, Ellis SP, Mann JJ, Arango V. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Mol Psychiatry.* 13 (5): 507-13. 2008.
- Bachner D, Kreienkamp H, Weise C, Buck F, Richter D. Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Lett.* 457: 522-524. 1999.
- Backberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B. Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur.J. Neurosci.* 15: 315–328. 2002.
- Bayer L, Eggermann E, Serafin M, Grivel J, Machard D, Muhlethaler M, Jones BE. Opposite effects of noradrenaline and acetylcholine upon hypocretin/orexin versus melanin concentrating hormone neurons in rat hypothalamic slices. *Neuroscience.* 130:807–11. 2005.
- Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol.* 91 (2): 994-1005. 2004.

- Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 7 (2): 137-51. 2006.
- Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* 172 (2):185-97. 2011.
- Bittencourt J, Celis ME. *Peptides.* 29 : 1441-50. 2008.
- Bittencourt JC, Frigo L, Rissman RA, Casatti CA, Nahon JL, Bauer JA. The distribution of melanin-concentrating hormone in the monkey brain (*Cebusapella*). *Brain Res.* 804: 140–143.1998.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319: 218-245.1992.
- Blier P, de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci.* 15: 220-226. 1994.
- Blier P, de Montigny C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacol.* 21(2): 91-98. 1999.
- Blier P, Gobbi G, Haddjeri N, Santarelli L, Mathew G, Hen R. Impact of substance P receptor antagonism on the serotonin and norepinephrine systems: relevance to the antidepressant/anxiolytic response. *J Psychiatry Neurosci.* 29(3): 208-18. 2004.
- Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KÆ, Lapierre JL, Siegel JM. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun.*4:1547-15. 2013.
- Bombardi C. Neuronal localization of 5-HT_{2A} receptor immunoreactivity in the rat hippocampal region. *Brain Research Bulletin.* 87:259-273. 2012.
- Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I, Blackburn TP, Branchek TA, Gerald C, Vaysse PJ, Forray C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med.* 8(8):825-30. 2002.
- Broberger C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res.* 848: 101–13. 1999.

C

- Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA, Beck SG. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacol.* 61: 524-43. 2011.
- Carlini VP, Schiöth HB, de Barioglio SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) reverts the behavioral effects induced by inescapable stress. *Peptides.* 27: 2300-2306. 2006.
- Carobrez A, Bertoglio L. ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29: 1193-1205. 2005.
- Carvalho AF, Berk M, Hyphantis TN, McIntyre RS. The integrative management of treatment-resistant depression: a comprehensive review and perspectives. *Psychother Psychosom.* 83 (2): 70-88. 2014.
- Catena-Dell'Osso M, Fagiolini A, Marazziti D, Baroni S, Bellantuono C. Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini Rev Med Chem.* 13: 2-10. 2013.
- Chaki S, Funakoshi T, Hirota-Okuno S, Nishiguchi M, Shimazaki T, Iijima M, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like profile of ATC0065 and ATC0175: nonpeptidic and orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 313: 831-9. 2005.
- Chambers J, Ames RS, Bergsma D, Muir A, Fitzgerald LR, Hervieu G, Dytko GM, Foley JJ, Martin J, Liu WS, Park J, Ellis C, Ganguly S, Konchar S, Cluderay J, Leslie R, Wilson S, Sarau HM. Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature.* 400 (6741): 261-5. 1999.
- Chee MJ, Pissios P, Prasad D, Maratos-Flier E. Expression of melanin-concentrating hormone receptor 2 protects against diet-induced obesity in male mice. *Endocrinology* 155(1): 81-8. 2014.
- Chung S, Hopf FW, Nagasaki H, Li CY, Belluzzi JD, Bonci A, Civelli O. The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci.* 106 (16): 6772-7. 2009.
- Chung S, Parks GS, Lee C, Civelli O. Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *J Mol Neurosci.* 43:115-21. 2011.
- Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Geddes JR, Higgins JP, Churchill R, Watanabe N, Nakagawa A, Omori IM, McGuire H, Tansella M, Barbui C. Comparative efficacy and

acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*. 373 (9665): 746-58. 2009.

-Consoni FT, Vital MA, Andreatini R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol*. 16:451–458. 2006.

-Croizier S, Cardot J, Brischoux F, Fellmann D, Griffond B, Risold PY. The vertebrate diencephalic MCH system: A versatile neuronal population in an evolving brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 34: 65-87. 2013.

-Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La Roche A, Risold PY. A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. *PLoS One*. 5(11):15471. 2010.

-Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*. 23: 238-245. 2002.

-Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*. 29: 547-569. 2005.

D

-Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system, I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*. 62 (232): 1-55. 1964.

-David DJ, Klemenhagen KC, Holick KA, Saxe MD, Mendez I, Santarelli L, Craig DA, Zhong H, Swanson CJ, Hegde LG, Ping XI, Dong D, Marzabadi MR, Gerald CP, Hen R. Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-[[4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl]methyl}(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther*. 321: 237-248. 2007.

-Del Cid-Pellitero E, Jones BE. Immunohistochemical evidence for synaptic release of GABA from melanin-concentrating hormone containing varicosities in the locus coeruleus. *Neuroscience*. 223: 269-76. 2012.

-Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol*. 207: 239-254. 1982.

- Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* (Berl). 121: 66-72. 1995.
- Devera A, Paskovich C, Lagos P, Falconi A, Sampogna S, Chase MH, Torterolo P. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res*. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.032. 2014.
- Diaz N, Ruiz A. Estudio epidemiológico de la población asistida en el Departamento de siquiatría del Hospital de Clínicas. Período 1999-2000. *Rev Med Uruguay*. 18:48-58. 2002.
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry*. 46:1375–1387. 1999.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*. 213 (1-2): 93-118. 2008.

E

- Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol*. 432 (1): 1-19. 2001.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*. 402 (4): 442-59. 1998.
- Elias CF, Sita LV, Zambon BK, Oliveira ER, Vasconcelos LA, Bittencourt JC. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *J Chem Neuroanat*. 35 (2): 188-201. 2008.
- Esler M, Lambert E, Alvarenga M, Socratous F, Richards J, Barton D, Pier C, Brenchley C, Dawood T, Hastings J, Guo L, Haikerwal D, Kaye D, Jennings G, Kalff V, Kelly M, Wiesner G, Lambert G. Increased brain serotonin turnover in panic disorder patients in the absence of a panic attack: reduction by a selective serotonin reuptake inhibitor. *Stress*. 10(3): 295-304. 2007.

F

- Fava M, Kendler KS. Major depressive disorder. *Neuron*, 28:335-341. 2000.
- Fava M, Rush AJ, Alpert JE, Balasubramani GK, Wisniewski SR, Carmin CN, Biggs MM, Zisook S, Leuchter A, Howland R, Warden D, Trivedi MH. Difference in treatment outcome in outpatients with anxious versus nonanxious depression: A STAR*D Report. *Am J Psychiatry*. 165:342–351. 2008.
- Ferrari AJ, Norman RE, Freedman G, Baxter AJ, Pirkis JE, Harris MG, Page A, Carnahan E, Degenhardt L, Vos T, Whiteford HA. The Burden Attributable to Mental and Substance Use Disorders as Risk Factors for Suicide: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *PlosOne*. 9 (4): 91936. 2013.
- Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, de Almeida RM, Miczek KA. Serotonin and aggressive behavior in rodents and nonhuman primates: predispositions and plasticity. *Eur J Pharmacol*. 526:259–273. 2005.
- Forray C. The MCH receptor family: feeding brain disorders? *Curr Opin Pharmacol*. 3(1):85-9. 2003.

G

- Gao XB, van den Pol AN. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J Physiol* 533: 237-52. 2001.
- Gao XB, van den Pol AN. Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons. *J Physiol*. 542: 273–286. 2002.
- Gao XB, Ghosh PK, van den Pol AN. Neurons synthesizing melanin-concentrating hormone identified by selective reporter gene expression after transfection in vitro: transmitter responses. *J Neurophysiol*. 90(6):3978-85. 2003.
- Garcia-Fuster MJ, Parks GS, Clinton SM, Watson SJ, Akil H and Civelli O. The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *Eur Neuropsychopharmacol*. 22 (8): 607-13. 2012.
- Gardner KL, Thirivikraman KV, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Early life experience alter behavior during social defeat: focus on serotonergic system. *Neurosc*. 136: 181-191. 2005.

- Gehlert DR, Rasmussen K, Shaw J, Li X, Ardayfio P, Craft L, Coskun T, Zhang HY, Chen Y, Witkin JM. Preclinical evaluation of melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonism for the treatment of obesity and depression. *J Pharmacol Exp Ther.* 329(2): 429-438. 2009.
- Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolaños CA, Marsh DJ, Bednarek MA, Bibb JA, Maratos-Flier E, Nestler EJ, DiLeone RJ. The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci.* 25(11): 2933-2940. 2005.
- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. Role and origin of the GABAergic innervations of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci.* 20:4217-4225. 2000.
- Gonzalez MI, Vaziri S, Wilson CA. Behavioral effects of alpha-MSH and MCH after central administration in the female rat. *Peptides* 17:171-177. 1996.
- Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 129–141. 1996.
- Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides.* 30 (11): 2031-2039. 2009.

H

- Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 32: 695-708. 2012.
- Hale MW, Lowry CA. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacol.* 213: 243-264. 2011.
- Harthoorn LF, Sañé A, Nethe M, Van Heerikhuize JJ. Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol* 25:1209–1223. 2005.
- Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 2418-22. 2009.
- Hawes BE, Kil E, Green B, O'Neill K, Fried S, Graziano MP. The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 141: 4524-4532. 2000.

-Hensler JG. Serotonin. In Siegel J, Wayne Albers R, Brady S, Price D (7th Eds.). Basic Neurochemistry, molecular, cellular and mediocal aspects. Elsevier Academic Press. London, UK. 2006.

-Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, Leslie RA. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci.* 12 (4): 1194-216. 2000.

-Hill J, Duckworth M, Murdock P, Rennie G, Sabido-David C, Ames RS, Szekeres P, Wilson S, Bergsma DJ, Gloger IS, Levy DS, Chambers JK, Muir AI. Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *J Biol Chem* 276: 20125–20129. 2001.

-Holtzheimer PE, Nemeroff CB. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx.* 3 (1): 42-56. 2006.

I

-Ito M, Ishihara A, Gomori A, Matsushita H, Ito M, Metzger JM, Marsh DJ, Haga Y, Iwaasa H, Tokita S, Takenaga N, Sato N, MacNeil DJ, Moriya M, Kanatani A. Mechanism of the anti-obesity effects induced by a novel melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonist in mice. *Br J Pharmacol.* 159 (2): 374-83. 2010.

J

-Jahanshahi A, Steinbusch HW, Temel Y. Distribution of dopaminergic cell bodies in the median raphe nucleus of the rat brain. *J Chem Neuroanat.* 53: 60-3. 2013.

-Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 72: 165-229. 1992.

-Jego S, Adamantidis A. MCH neurons: vigilant workers in the night. *Sleep.* 36: 1783-1786. 2013.

-Jobst EE, Enriori PJ, Cowley MA. The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab.* 15: 488-99. 2004.

K

- Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BI. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*. 305: 321-323. 1983.
- Kela J, Salmi P, Rimondini-Giorgini R, Heilig M, Wahlestedt C. Behavioural analysis of melanin-concentrating hormone in rats: evidence for orexigenic and anxiolytic properties. *Regul Pept* 114: 109-114. 2003.
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO. Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting the onset of major depression. *Am J Psych*. 158, 582–586. 2001.
- Kennedy AR, Todd JF, Dhillo WS, Seal LJ, Ghatei MA, O'Toole CP, Jones M, Witty D, Winborne K, Riley G, Hervieu G, Wilson S, Bloom SR. Effect of direct injection of melanin-concentrating hormone into the paraventricular nucleus: further evidence for a stimulatory role in the adrenal axis via SLC-1. *J Neuroendocrinol*. 15: 268-72. 2003.
- Kennedy AR, Todd JF, Stanley SA, Abbott CR, Small CJ, Ghatei MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, in vivo and in vitro, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology*. 142: 3265-8. 2001.
- Kerman IA, Bernard R, Bunney WE, Jones EG, Schatzberg AF, Myers RM, Barchas JD, Akil H, Watson SJ, Thompson RC. Evidence for transcriptional factor dysregulation in the dorsal raphe nucleus of patients with major depressive disorder. *Front Neurosci*. 6 (135): 1-14 2012.
- Kilduff TS and de Lecea L. Mapping of the mRNAs for the hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone receptors: networks of overlapping peptide systems. *J Comp Neurol*. 435 (1): 1-5. 2001.
- Kirby LG, Rice KC, Valentino RJ. Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacol*. 22(2):148-62. 2000.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience*. 116:669–683. 2003.
- Kistler-Heer V, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Melanocortin and MCH precursor-derived NEI effects on striatum-midbrain co-cultures. *Peptides*. 19:1317–27. 1998.

-Kokkotou E, Moss AC, Torres D, Karagiannides I, Cheifetz A, Liu S, O'Brien M, Maratos-Flier E, Pothoulakis C. Melanin-concentrating hormone as a mediator of intestinal inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.*105: 10613–10618. 2008.

-Konadhode RR, Pelluru D, Blanco-Centurion C, Zayachkivsky A, Liu M, Uhde T, Glen WB Jr, van den Pol AN, Mulholland PJ, Shiromani PJ. Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. *J Neurosci.* 33 (25): 10257-63. 2013.

-Korosi A, Veening JG, Kozicz T, Henckens M, Dederen J, Groenink L, van der Gugten J, Olivier B, Roubos EW. Distribution and expression of CRF receptor 1 and 2 mRNAs in the CRF over-expressing mouse brain. *Brain Res.* 1072 (1): 46-54. 2006.

L

-Lacoste B, Riad M, Descarries L. Immunocytochemical evidence for the existence of substance P receptor (NK1) in serotonin neurons of rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci.* 23 (11): 2947-58. 2006.

-Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 1265: 103-110. 2009.

-Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Monti JM. Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Res.* 1369: 112-118. 2011a.

-Lagos P, Urbanavicius J, Scorza C, Miraballes R and Torterolo P. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav Brain Res.* 218: 259-266. 2011b.

-Lee C, Parks GS, Civelli O. Anxiolytic effects of the MCHR1 antagonist TPI 1361-17. *J Mol Neurosc.* 43 (2): 132-7. 2011.

-Lembo PM, Grazzini E, Cao J, Hubatsch DA, Pelletier M, Hoffert C, St-Onge S, Pou C, Labrecque J, Groblewski T, O'Donnell D, Payza K, Ahmad S, Walker P. The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol.* 1: 267-271.1999.

-Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther.* 46 (3): 321-40. 1990.

- Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci.* 22(21): 9453-64. 2002.
- López-Hill X, Prieto JP, Meikle MN, Urbanaviciusa J, Abin-Carriquiry JA, Prunell G, Umpiérrez E, Scorza MC. Coca-paste seized samples characterization: Chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res.* 221: 134–141. 2011.
- López-Rodríguez F, Kim J, Poland RE. Total sleep deprivation decreases immobility in the forced-swim test. *Neuropsychopharmacol.* 29(6):1105-11. 2004.
- Lowry CA, Evans AK, Gasser PJ, Hale MW, Staub DR, Shekhar A. Topographical organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and the medial raphe nucleus. In Monti JM et al. (Eds), *Serotonin and Sleep: molecular, functional and clinical aspects.* Birkhauser Verlag, Switzerland. 25-68 2008.
- Lu ZH, Fukuda S, Minakawa Y, Yasuda A, Sakamoto H, Sawamura S, Takahashi H, Ishii N. Melanin concentrating hormone induces hippocampal acetylcholine release via the medial septum in rats. *Peptides.* 44: 32-9. 2013.
- Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol.* 8: 523–532. 1997.
- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 107(3):379-86. 2001.

M

- Mackay FR, Dunn NR, Martin RM, Pearce GL, Freemantle SN, Mann RD. Newer antidepressants: a comparison of tolerability in general practice. *Br. J. Gen. Pract.* 49 (448): 892-896. 1999.
- MacNeil DJ. The role of melanin-concentrating-hormone and its receptors in energy homeostasis. *Front Endocrinology* 4 (49):1-14. 2013.
- Mandelli L, Serretti A. Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: An update. *Neurosc Biobehav Rev.* 37: 2375-2397. 2013.
- Mann JJ, Brent DA, Arango V. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system, *Neuropsychopharmacol.* 24: 467-77. 2001.

- Maulon-Feraille L, Della Zuana O, Suply T, Rovere-Jovene C, Audinot V, Levens N, Boutin JA, Duhault J, Nahon JL. Appetite-Boosting Property of Pro-Melanin-Concentrating Hormone^{131–165} (Neuropeptide-Glutamic Acid-Isoleucine) Is Associated with Proteolytic Resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 302 (2): 766-73. 2002.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3 (11): e442. 2006.
- Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 92:263–271. 2007.
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol.* 70(2): 83-244. 2003.
- Millan MJ, Gobert A, Panayi F, Rivet JM, Dekeyne A, Brocco M, Ortuno JC, Di Cara B. The melanin-concentrating hormone¹ receptor antagonists, SNAP-7941 and GW3430, enhance social recognition and dialysate levels of acetylcholine in the frontal cortex in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 11 (8): 1105-22. 2008
- Ministerio de Salud Pública. Plan nacional de prevención del suicidio. Para Uruguay 2011-2015 “Un compromiso con la vida”. 2010.
- Miret M, Ayuso-Mateos JL, Sanchez-Moreno, Vieta E. Depressive disorders and suicide: Epidemiology, risk factors, and burden. *Neurosci Biobehav Rev.* 37: 2372-2374. 2013
- Moden JI, Haude K, Carroll R, Goodspeed A, Cook LB. Analyzing the role of receptor internalization in the regulation of melanin-concentrating hormone signaling. *Int J Endocrinol.* 1-10. 2013.
- Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur J Neurosci.* 21:2807-2816. 2005.
- Montalban A. El suicidio: la urgencia de un grave problema. *Rev Med Uruguay,* 20:91. 2004.
- Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 48(4):254-60. 1955.
- Montgomery SA, Baldwin DS, Riley A. Antidepressant medications: a review of the evidence for drug-induced sexual dysfunction. *J. Affect Disord.* 69 (1-3): 119-140. 2002.
- Montgomery KC, Monkman JA. The relation between fear and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48 (2): 132-136. 1955.

- Monti J M. The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med Rev.* 14: 307-317. 2010a.
- Monti JM. The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Med Rev.* 14: 319-327. 2010b.
- Monzon ME, Varas MM, De Barioglio SR. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. *Peptides* 22: 1043-1047. 2001.
- Moore NA, Sargent BJ, Guzzo PR, Surman MD. From preclinical to clinical development: The example of a novel treatment for obesity. *Neurobiology of Disease* 61: 47-54. 2014
- Mori M, Harada M, Terao Y, Sugo T, Watanabe T, Shimomura Y, Abe M, Shintani Y, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 1013-1018. 2001.
- Mul JD, la Fleur SE, Toonen PW, Afrasiab-Middelmann A, Binnekade R, Schetters D, Verheij MM, Sears RM, Homberg JR, Schoffelmeer AN, Adan RA, DiLeone RJ, De Vries TJ, Cuppen E. Chronic loss of melanin-concentrating hormone affects motivational aspects of feeding in the rat. *PLoS One.* 6 (5):19600. 2011.

N

- Nahon JL, Presse F, Bittencourt, JC, Sawchenko PE, Vale W. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides co-expressed in the dorsolateral hypothalamus. *Endocrinology* 125, 2056–2065. 1989.
- Nahon JL. The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C R Biol.* 329 (8): 623-38. 2006.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* 34: 13-25. 2002.
- Neumeister A, Young T, Stastny J. Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter. *Psychopharmacol.* 174: 512-524. 2004.
- NICE, 2004. Depression: Management of Depression in Primary and Secondary Care. In: Clinical Practice Guideline No 23. National Institute for Clinical Excellence, London.

- NICE, 2009. The Treatment and Management of Depression in Adults. Update. National Institute for Clinical Excellence, London.
- Nollet M, Gaillard P, Minier F, Tanti A, Belzung C, Leman S. Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacol.* 61: 336-346. 2011.
- Nordström P, Samuelsson M, Asberg M, Träskman-Bendz L, Aberg-Wistedt A, Nordin C, Bertilsson L. CSF 5-HIAA predicts suicide risk after attempted suicide. *Suicide Life Threat Behav.* 24(1):1-9. 1994.
- Nutt DJ. Treatment of depression and concomitant anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol.* 10 (4): 433-437. 2000.
- Nutt DJ, Stein DJ. Understanding the neurobiology of comorbidity in anxiety disorders. *CNS Spectr.* 11:13-20. 2006.

P

- Pachoud B, Adamantidis A, Ravassard P, Luppi PH, Grisar T, Lakaye B, Salin PA. Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *J Neurophysiol.* 104 (3): 1417-25. 2010.
- Palagini L, Baglioni C, Ciapparelli A, Gemignani A, Riemann D. REM sleep dysregulation in depression: State of the art. *Sleep Med Rev.* 17 (5): 377-90. 2013
- Palazidou E. The neurobiology of depression. *Br Med Bull.* 101: 127-45. 2012.
- Parkes D, Vale W. *Endocrinology.* 131 : 1826-31. 1992.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. Sydney: Academic Press. 2005.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods,* 14 (3): 149-67. 1985.
- Pissios P, Ozcan U, Kokkotou E, Okada T, Liew CW, Liu S, Peters JN, Dahlgren G, Karamchandani J, Kudva YC, Kurpad AJ, Kennedy RT, Maratos-Flier E, Kulkarni RN. Melanin concentrating-hormone is a novel regulator of islet function and growth. *Diabetes* 56, 311–319. 2007.
- Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated

with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci*. 21: 7397-7403. 2001.

-Pollak Dorocic I, Fürth D, Xuan Y, Johansson Y, Pozzi L, Silberberg G, Carlén M, Meletis K. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron*. 83 (3): 663-78. 2014.

-Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 47: 379-391. 1978.

-Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C, Roux S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8: Unit 8, 10A. 2001.

-Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R. Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol*. 60 (1):13-35. 2000.

Q

-Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*. 380 (6571): 243-7. 1996.

R

-Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB. Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. *J Neurosci*. 28(37):9101-10. 2008.

- Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Al Wafai R, Khaku A, Mondello S., Gold MS, Kobeissy FH. An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neurosc*. 240: 204-218.

-Rasmussen K, Heym J, Jacobs BL. Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats, *Exp Neurol*. 83: 302-17. 1984.

-Roche M, Commons KG, Peoples A, Valentino RJ. Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *J Neurosci*. 23 (3): 970-7. 2003.

Rodgers R, Cao J, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J Med Biol Res*. 30: 289-304. 1997.

-Rondini TA, Donato J. Jr., Rodrigues C, Bittencourt JC, Elias CF. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. *J Chem Neuroanat.* 39: 51–62. 2010.

-Roy M, David NK, Danao JV, Baribault H, Tian H, Giorgetti M. Genetic inactivation of Melanin-Concentrating Hormone receptor subtype 1 (MCHR1) in mice Exerts anxiolytic-like behavioral effects. *Neuropsychopharmacology.* 31:112–120. 2006.

-Roy M, David N, Cueva M, Giorgetti M. A Study of the Involvement of Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 (MCHR1) in Murine Models of Depression. *Biol Psychiatry.* 31: 112-120. 2006.

S

-Sailer AW, Sano H, Zeng Z, McDonald TP, Pan J, Pong SS, Feighner SD, Tan CP, Fukami T, Iwaasa H, Hreniuk DL, Morin NR, Sadowski SJ, Ito M, Ito M, Bansali A, Ky B, Figueroa DJ, Jiang Q, Austin CP, MacNeil DJ, Ishihara A, Ihara M, Kanatani A, Van der Ploeg LHT, Howard AD, Liu Q. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98 (13): 7564-7569. 2001.

-Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435(1):26-40. 2001.

-Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature.* 400: 265-269.1999.

-Sakurai T, Ogawa K, Ishihara Y, Kasai S, Nakayama M. The MCH(1) receptor, an anti-obesity target, is allosterically inhibited by 8-methylquinoline derivatives possessing subnanomolar binding and long residence times. *Br J Pharmacol.* 171(5):1287-98. 2014.

-Sapin E, Bérrod A, Léger L, Herman PA, Luppi PH, Peyron C. A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. *PLoS One.* 5(7):11766. 2010.

-Sears RM, Liu RJ, Narayanan NS, Sharf R, Yeckel MF, Laubach M, Aghajanian GK, DiLeone RJ. Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. *J Neurosci.* 30 (24): 8263-73. 2010.

-Shaw FZ, Chuang SH, Shieh KR, Wang YJ. Depression- and anxiety-like behaviors of a rat model with absence epileptic discharges. *Neuroscience.* 160: 382-393.2009.

- Shelton RC, Tollefson GD, Tohen M, Stahl S, Gannon KS, Jacobs TG, Buras WR, Bymaster FP, Zhang W, Spencer KA, Feldman PD, Meltzer HY. A Novel Augmentation Strategy for Treating Resistant Major Depression. *Am. J Psychiatry*. 158: 131-134. 2001.
- Shishkina GT, Kalinina TS, Dygalo NN. Serotonergic changes produced by repeated exposure to forced swimming: correlation with behavior. *Ann N Y Acad Sci*. 1148:148-53. 2008.
- Silva M, Aguiar DC, Diniz CR, Guimarães FS, Joca SR. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced Fos expression in overlapping brain regions. *Cell Mol Neurobiol*. 32:443-453. 2012.
- Shi Y. Beyond skin color: emerging roles of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and other physiological functions. *Peptides*. 25 (10): 1605-11. 2004.
- Skofitsch G, Jacobowitz DM, Zamir N. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull*. 15(6): 635-49. 1985.
- Siligardi G, Campbell MM, Gibbons WA, Drake F. Conformational analysis of the melanin-concentrating hormone core by circular dichroic spectroscopy. Disulphide bridge and tyrosine contributions. *Eur. J. Biochem* 2006: 23-29. 1992.
- Slavich GM, Monroe SM, Gotlib IH. Early parental loss and depression history: associations with recent life stress in major depressive disorder. *J Psych Res*. 1146–1152. 2011.
- Smith DG, Davis RJ, Rorick-Kehn L, Morin M, Witkin JM, McKinzie DL, Nomikos GG, Gehlert DR. Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. *Neuropsychopharmacol*. 31:1135-1145. 2006.
- Smith DG, Hegde LG, Wolinsky TD, Miller S, Papp M, Ping X, Edwards T, Gerald CP, Craig DA. The effects of stressful stimuli and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation are reversed by the melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist SNAP 94847 in rodents. *Behav Brain Res*. 197: 284-291. 2009.
- Soares JC, Mann JJ. The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies. *Biol Psychiatry*. 41:86-106. 1997.
- Spaethling JM, Piel D, Dueck H, Buckley PT, Morris JF, Fisher SA, Lee J, Sul J, Kim J, Bartfai T, Beck SG, Eberwine JH. Serotonergic neuron regulation informed by in vivo single-cell transcriptomics. *FASEB Journal*. 28: 771-780. 2014.

-Spiacci A Jr., Coimbra NC, Zangrossi H Jr. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors. *Neurosci* 227: 350-360. 2012.

-Stamp JA, Semba K. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res.* 677:39-49. 1995.

T

-Takenoya F, Hirayama M, Kageyama H, Funahashi H, Kita T, Matsumoto H, Ohtaki T, Katoh S, Takeuchi M, Shioda S. Neuronal interactions between galanin-like-peptide- and orexin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons. *Regul Pept.* 126:79–83. 2005.

-Tan CP, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, Feigher SD, Palvha OC, Pong SS, Figueroa DJ, Austin CP, Jiang MM, Yu H, Ito J, Ito M, Ito M, Guan XM, MacNeil DJ, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species- specific gene expression. *Genomics* 79:785-792. 2002.

-Tan SK, Hartung H, Visser-Vandewalle V, Steinbusch HW, Temel Y, Sharp T. A combined in vivo neurochemical and electrophysiological analysis of the effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on 5-HT transmission. *Exp Neurol.* 233(1):145-53. 2011.

-Tao R, Ma Z, Auerbach SB. Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br J Pharmacol.* 119 (7): 1375-84. 1996.

-Temel Y, Boothman LJ, Blokland A, Magill PJ, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V. Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 17087-17092. 2007.

-Thase ME, Corya SA, Osuntokun O, Case M, Henley DB, Sanger TM, Watson SB, Dubé S. A randomized, double-blind comparison of olanzapine/fluoxetine combination, olanzapine, and fluoxetine in treatment-resistant major depressive disorder. *Clin Psychiatry.* 68 (2): 224-36. 2007.

- Tiger M, Rück C, Forsberg A, Varrone A, Lindefors N, Halldin C, Farde L, Lundberg J. Reduced 5-HT(1B) receptor binding in the dorsal brain stem after cognitive behavioural therapy of major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 223 (2): 164-70. 2014.
- Törk I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci.* 600:9-34. 1990.
- Tortero P, Lagos P, Monti JM. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Frontiers in Neurology.* 2 (14): 1-12. 2011.
- Tortero P, Sampogna S, Chase MH. MCHergic projections to the nucleus pontis oralis participate in the control of active (REM) sleep. *Brain Res.* 1268: 76-87 2009.
- Tortero P, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness. *Brain Res* 1119: 101–114. 2006.
- Tortero P, Scorza C, Urbanavicius J, Devera A, Benedetto L, Pascovich C, Lagos P, Chase MH, Monti J. Avances en el estudio de la neurobiología de la depresión: rol de la hormona concentradora de melanina. *Rev Méd Urug.* 30(2):8-16. 2014.
- Tyrer P, Baldwin D. Generalised anxiety disorder. *Lancet.* 368: 2156-2166. 2006.

U

- Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V. Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol Psychiatry.* 46: 473-83. 1999.

V

- van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron.* 42(4):635-52. 2004.
- Varas MM, Pérez MF, Ramírez OA, de Barioglio SR. Increased susceptibility to LTP generation and changes in NMDA-NR1 and -NR2B subunits mRNA expression in rat hippocampus after MCH administration. *Peptides.* 24 (9): 1403-11. 2003.
- Vasudeva RK, Lin RC, Simpson KL, Waterhouse BD. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrenergic cell groups. *J Chem Neuroanatomy.* 41: 281-293. 2011.

Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 125 (3): 1660-1665. 1989.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci.* 4: 19. 2003.

Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 313 (4): 643-68. 1991.

Vertes RP, Crane AM. Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the supramedian nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *J Comp Neurol.* 378(3):411-24. 1997.

Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 407 (4):555-82. 1999.

Vertes RP, Linley SB. Efferent and afferent connections of the dorsal and median raphe nuclei in rat. In Monti JM et al. (Eds), *Serotonin and Sleep: molecular, functional and clinical aspects.* Birkhauser Verlag, Switzerland. 25-68 2008.

Viale S, Ortola C, Hervieu G, Furuta M, Barbero P, Steiner DF, Seidah NG, Nahon JL. Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals. *J Biol Chem* 274 (10): 6536-6545. 1999.

W

-Walker FR. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacol.* 67: 304-317.2013

-Wang S. Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, MCH-R2. *J. Biol. Chem.* 276: 34664–34670. 2001.

-Wang QP, Koyama Y, Guan JL, Takahashi K, Kayama Y, Shioda S. The orexinergic synaptic innervation of serotonin- and orexin 1-receptor-containing neurons in the dorsal raphe nucleus. *Regul Pept.* 126 (1-2): 35-42. 2005.

-Weiss S, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish C. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosc Biobehav Rev.* 23: 265-271. 1998.

- Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L. Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*. 83 (3): 645-62. 2014.
- Willner P, Scheel-Kruger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev*. 37 (10): 2331-71. 2013.
- Wellman PJ. Norepinephrine and the control of food intake. *Nutrition* 16: 837–842, 2000.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*. 74: 683-701. 2001.
- World Health Organization. Preventing suicide: a global imperative. World Health Organization. 2014.
- Wu Z, Fang Y. Comorbidity of depressive and anxiety disorders: challenges in diagnosis and assessment. *Shanghai Archives of Psychiatry*. 26(4): 227-231. 2014.

Y

- Yoon YS, Lee HS. Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* 1490: 72-82. 2013.

X. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors, and reversion by nortriptyline

Jessika Urbanavicius^a, Patricia Lagos^c, Pablo Torterolo^c and Cecilia Scorza^b

Melanin-concentrating hormone (MCH) administered within the rat dorsal raphe nucleus (DRN) has been shown to elicit prodepressive behaviors in the forced-swim test. The present study was designed to evaluate the time course (30 and 60 min) and dose dependence (25–100 ng) of this effect, and whether it would be antagonized by an intra-DRN microinjection of the MCH-1 receptor antagonist ATC0175 (ATC, 1 mmol/l) or intraperitoneal pretreatment with the noradrenergic antidepressant nortriptyline (20 mg/kg). The results showed that the behavioral effect of MCH was time and dose dependent as immobility was increased, and climbing decreased, only by the 50 ng MCH dose at T_{30} . The effect was mediated by MCH-1 receptors as a significant blockade of this behavioral response was observed in ATC-pretreated animals. ATC did not by itself modify animal behavior. Nortriptyline also prevented the prodepressive-like effect of MCH. Concomitantly, the effect of MCH (50 ng) at T_{30} on anxiety-related behaviors was assessed using the elevated plus-maze. Interestingly, these behaviors were

unchanged. In conclusion, MCH administration within the DRN elicits, through the MCH-1 receptor, a depression-related behavior that is not accompanied by changes in anxiety and that is prevented by a noradrenergic antidepressant. *Behavioural Pharmacology* 25:316–324 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Behavioural Pharmacology 2014, 25:316–324

Keywords: ATC0175, forced-swim test, melanin-concentrating hormone, neuropeptides, noradrenaline, serotonin

^aLaboratory of Cell Biology, ^bDepartment of Experimental Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable and ^cDepartment of Physiology, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay

Correspondence to María Cecilia Scorza, PhD, Department of Experimental Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, ZP11600 Montevideo, Uruguay
E-mails: scorzacecilia@gmail.com, cscorza@iibce.edu.uy

Received 7 October 2013 Accepted as revised 19 May 2014

Introduction

Previous anatomical and behavioral studies have shown that melanin-concentrating hormone (MCH) is involved in the modulation of emotional states, in addition to its classical functions such as food intake control, energy balance, and sleep behaviors (Chung *et al.*, 2009, 2011; Torterolo *et al.*, 2011; Blouin *et al.*, 2013). However, little is known about the brain regions, pathways, and mechanisms that relate the MCHergic system to depressive and anxiety states.

MCH is a cyclic neuropeptide of 19 amino acids. Its biological function in rodents is mediated by a G-protein-coupled receptor subtype known as MCH-1 (MCHR-1; Saito *et al.*, 2001). MCH is predominantly synthesized by neurons located in the lateral hypothalamus and the incertohypothalamic area (Bittencourt *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 2001), which send projections to several brain regions (Bittencourt *et al.*, 1992; Bittencourt, 2011). There is evidence that MCHergic fibers reach the dorsal raphe nucleus (DRN) in rats (Bittencourt *et al.*, 1992; Lagos *et al.*, 2011a; Yoon and Lee, 2013). The DRN contains the vast majority of the serotonergic neurons of the brain (Azmitia and Segal, 1978; Jacobs and Azmitia, 1992; Monti, 2010; Calizo *et al.*, 2011) and it has been suggested that a dysfunction in the serotonergic neurons

of the DRN underlies major depression (Underwood *et al.*, 1999; Arango *et al.*, 2002).

We have reported previously that MCH induced a depressive-like behavior in the forced-swimming test (FST), that is a significant increase in immobility and decrease in climbing times, immediately following a microinjection into the DRN of the rat (time 0, T_0). MCH immunoneutralization (i.e. anti-MCH antibodies microinjected into DRN) elicited an antidepressant-like behavioral response in the FST, defined by a significant decrease in immobility and increase in swimming behavior (Lagos *et al.*, 2011a). It has also been shown that MCH microinjected within the DRN increased, for at least 6 h, the time spent in REM sleep (Lagos *et al.*, 2009), a behavioral disturbance observed in depressive patients (Palagini *et al.*, 2013). Overall, these results support the idea that the MCHergic system plays a role in the induction of depressive-like behaviors through the modulation of neuronal activity within the DRN (Lagos *et al.*, 2009, 2011a).

The effect of MCH in the FST was partially prevented by systemic and subchronic treatment with fluoxetine, a selective 5-hydroxytryptamine (5-HT) reuptake inhibitor. This finding led us to propose that a serotonergic mechanism may be involved (Lagos *et al.*, 2011a).

However, it was observed that MCH induced a behavioral pattern that is in contrast to that described previously for a prototypical noradrenergic antidepressant, which decreases immobility by increasing climbing behavior, but not for a serotonergic antidepressant, which decreases immobility by increasing swimming behavior (Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2002). Therefore, a noradrenergic role in this prodepressive effect should also be considered.

In the present study, a detailed characterization (time course and dose dependence) of the behavioral effects elicited by MCH intra-DRN was performed in rats using the FST. The specificity of MCH action was studied using intra-DRN pretreatment with ATC0175 (ATC), a potent MCH antagonist with a high affinity for MCHR-1 (Chaki *et al.*, 2005). In addition, we evaluate whether the systemic pretreatment with nortriptyline (Nor), a tricyclic antidepressant and noradrenaline (NA) reuptake inhibitor (Roubert *et al.*, 2001; Dell'Osso *et al.*, 2011), would revert the prodepressive effects elicited by MCH. Considering that anxiety commonly co-occurs clinically with depression (Nutt and Stein, 2006), the effect of an MCH microinjection into the DRN on anxiety-related behaviors was also explored using the elevated plus-maze (EPM) test.

Methods

Subjects

A total of 153 male Wistar rats (240–260 g), bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo, Uruguay), were used in this study. Rats were housed in groups of five to six in plastic cages (50 × 37.5 × 21 cm), with food and water freely available, under controlled conditions (temperature 22 ± 2°C, 12 h light–dark cycle, lights on at 07:00 h). All procedures were carried out in accordance with the IIBCE Bioethics Committee's requirements under the current ethical regulations of the National Law on Animal Experimentation No. 18.611, taking into account the 'Guidelines for the care and use of laboratory animals' (8th ed., National Academy Press, Washington DC, 2011). Adequate measures were adopted to minimize discomfort or stress of the animals, and all efforts were made to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data.

In all behavioral experiments, rats were used only once. Experiments were conducted between 11:00 and 16:00 h, and behavior was rated simultaneously by two trained researchers.

Surgical procedures

Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) from Konsol Köning S.A Laboratory and mounted in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). A small hole was drilled in the skull at coordinates that were determined

relative to the Bregma according to the atlas of Paxinos and Watson (2005): anterior, –7.8 mm and lateral to the midline, +3.2 mm. A stainless-steel guide cannula (21 G, length 20 mm) was slowly inserted at a 30° angle and left 1 mm above the target (–5 mm vertical from the dura mater) to minimize cellular damage at the injection site. Three small stainless-steel screws serving as anchors were cemented to the skull with dental acrylic. After recovering from anesthesia, the rats were returned into their home cages in groups of three to four until the day of the experiment (5–6 days after guide cannula implantation).

Drugs and microinjection procedure

MCH (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA; #070-47) was diluted in saline to obtain a final concentration of 0.125, 0.25, and 0.5 µg/µl (25, 50, and 100 ng, respectively).

Aliquots were prepared, frozen at –20°C, and thawed immediately before use. The MCHR-1 antagonist N-[cis-4-[[4-(dimethylamino)-2-quinazolinyl] amino] cyclohexyl]-3,4-difluorobenzamide hydrochloride, ATC (Tocris Bioscience, Bristol, UK), was diluted in a 1.5% solution of Tween 80 and distilled water to obtain a final concentration of 1 mmol/l. Nor hydrochloride was generously donated by Urufarma Laboratories (Montevideo, Uruguay).

One day before the behavioral experiments, rats were brought in their home cages to the experimental room, where they remained undisturbed until the beginning of the experimental sessions. On the test day, MCH, ATC, or their respective vehicle solutions were microinjected into the DRN through an administration cannula (27 G, length 21 mm) connected to an infusion pump (Harvard Apparatus; Insteck, Plymouth Meeting, PA, USA) and introduced slowly through the guide cannula toward a final position in the DRN (–6 mm vertical). Then, the animals were allowed to move freely in a cage (26 × 20 × 13 cm) while MCH, ATC, or vehicle was perfused at a flow rate of 0.1 µl/min for 2 min (final volume of 0.2 µl); thereafter, the cannula was left in position for one additional minute to allow drug diffusion.

Forced-swim test

The FST was performed as described previously (Detke *et al.*, 1995; Lucki, 1997; Lagos *et al.*, 2011a). Briefly, rats were placed in a plexiglas cylinder (30 cm internal diameter, 50 cm height) containing 23–24°C water at a depth of 30 cm, preventing the rats from supporting themselves touching the bottom with their paws. Animals were exposed to a swim session for 15 min (pretest session) and they were then dried and returned to their home cages. Twenty-four hours later, a test session (5 min) was carried out, during which immobility (passive behavior) as well as swimming and climbing time (active behaviors) were recorded (Detke *et al.*, 1995). The total duration of

each behavior was scored in seconds (s). Immobility was assigned when no additional activity was observed other than that required to keep the head and nose above the water level. Swimming behavior was defined as movements (usually horizontal) throughout the cylinder, and climbing behavior consisted of vigorous and upward-directed movements of the forepaws along the cylinder wall (Porsolt *et al.*, 1978; Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2002).

For the time-course study, MCH (50 ng) or saline was microinjected into the DRN in different groups of animals, and behavioral effects in the FST were evaluated independently 30 and 60 min (T_{30} and T_{60} , respectively) after the end of each microinjection procedure. Two other doses of MCH (25 and 100 ng) were tested in other groups of animals at T_{30} only to evaluate the dose dependence of the behavioral effects.

To study the specificity of MCH action, a second group of implanted animals was pretreated with intra-DRN ATC 1 mmol/l or vehicle, followed 10 min later by an intra-DRN injection of MCH or saline (vehicle + saline, vehicle + MCH, ATC + saline, and ATC + MCH groups).

A third group of implanted animals was pretreated with three doses of Nor (20 mg/kg, intraperitoneally) administered 1 h after the end of the pretest session and 5 and 1 h before the test session (Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2002). A control group received vehicle (saline) injections under the same schedule. Animals pretreated with either vehicle or Nor were then microinjected with intra-DRN MCH or saline and 30 min later were tested in the FST (vehicle + saline, vehicle + MCH, Nor + saline, and Nor + MCH groups).

Open-field test

To control for the nonspecific effects of MCH on the behaviors evaluated in the FST, an additional group of animals was treated with MCH or saline and locomotor activity was measured. The open-field test (OFT) was conducted as described previously (Lagos *et al.*, 2011a). The apparatus consisted of a square box (60 × 60 cm) with red acrylic walls (40 cm high), homogeneously illuminated (150 lux). Locomotor activity was recorded automatically by a camera connected to a computer equipped with Ethovision software 7.0 (Noldus, Wageningen, the Netherlands). We measured the horizontal locomotor activity, defined as the total distance moved in meters (m). Time (s) spent in the center of the field was also recorded. Before each session, the floor was cleaned with alcohol (30%). Thirty minutes (T_{30}) after intra-DRN MCH (25, 5.0 and 100 ng) or saline microinjections, the animals, naive to the OFT, were individually placed in the center of the field and locomotion was recorded during 5 min.

Elevated plus-maze

The EPM was made of wood and consisted of two opposed open arms (50 × 10 cm) crossed at a 90° angle

with two opposed closed arms (50 × 10 × 40 cm), which extended from a 10 × 10 cm central platform. The maze was elevated 50 cm above the floor (Pellow and File, 1986) and homogeneously illuminated (190–200 lux). Thirty minutes (T_{30}) after intra-DRN MCH (50 ng) or saline microinjections, the animal was individually placed on the central platform of the EPM facing a closed arm and allowed to freely explore the EPM for 5 min. The frequency of entries and time spent in open and closed arms, frequency of risk assessment, and head dipping were recorded. EPM performance was also videotaped and the distance moved (m) by the animal was recorded automatically using the Ethovision software. The EPM was cleaned with alcohol (30%) between animals.

Histology

To confirm the microinjection site, rats were deeply anesthetized with urethane (1.2 g/kg, intraperitoneally; Sigma, St. Louis, MO, USA) and perfused transcardially with a heparinized saline solution, followed by a fixative solution containing 4% paraformaldehyde. Brains were dissected out and processed for histological procedures. Brains were coronally sectioned at 30 μm using a cryostat (Leica Microsystem CM 1900, Wetzlar, Germany). Then, sections were mounted on gelatin-coated slides and stained by the Nissl method. Brain sections were analyzed to determine the correct cannula placement and the microinjection sites following the atlas of Paxinos and Watson (2005). Animals with cannula placement and microinjections outside the DRN were discarded. Microphotographs indicating localizations of microinjections within the DRN have been shown in previous studies from our group (Lagos *et al.*, 2009, 2011a, 2011b).

Statistical analysis

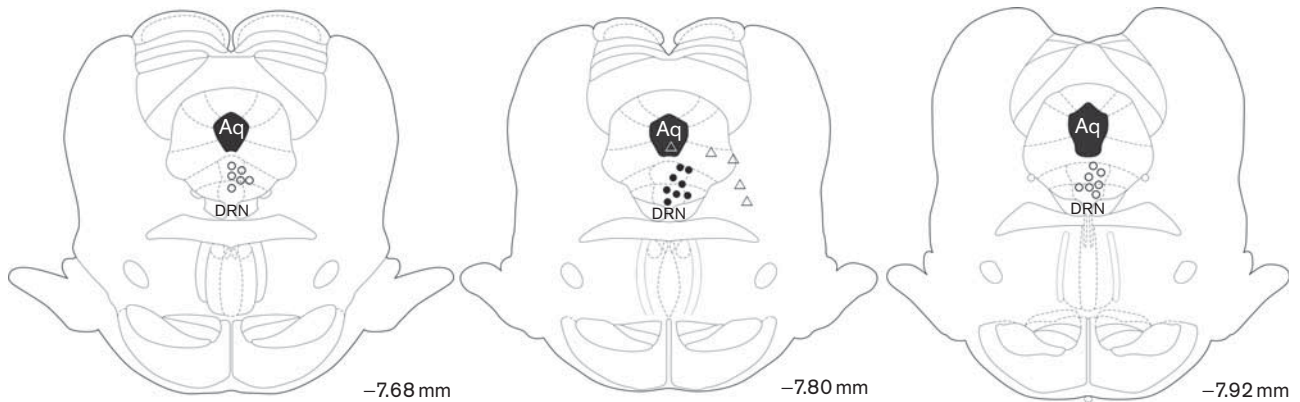
Data are reported as mean ± SEM and were analyzed by one-way analysis of variance for independent measures, followed by a post-hoc Newman–Keuls test. The two-tailed unpaired Student's *t*-test was also utilized. Statistical significance was set at a *P* value of less than 0.05.

Results

Evaluation of cannula localization

In Fig. 1 the DRN sites where MCH, ATC, or vehicle were microinjected are shown in composite diagrams. The microinjection sites of 137 rats are marked as dark spots (at −7.80 mm from the bregma) and in open circles (at −7.68 and −7.92 mm) for 16. Each dark spot represents 9–17 microinjection sites. Open triangles represent the microinjection sites of 25 animals that were discarded (each represents 5–10 injection sites) because the cannula was localized in the periaqueductal gray, aqueduct, or lateral to the DRN. Variable or no behavioral effects were observed when cannula placement was outside the DRN. Only those animals with a correct anatomical localization were included in the data analysis.

Fig. 1



Representative localization of microinjection sites in the dorsal raphe nucleus. The figure shows a schematic diagram of coronal sections at three different levels (-7.68 , -7.80 , and -7.92 mm from Bregma) according to the atlas of Paxinos and Watson (2005), showing the MCH or saline microinjection sites as dark spots (each representing 9–17 animals) and 16 open circles (each representing an individual animal). Open triangles represent 5–10 sites of injection outside the DRN. DRN, dorsal raphe nucleus; MCH, melanin-concentrating hormone.

Time course of the effect of MCH in the FST

Figure 2 shows the effect of MCH (50 ng) in the FST, evaluated 30 (Fig. 2a–c) and 60 min (Fig. 2d–f) after microinjection into the DRN. MCH significantly increased the immobility time compared with the respective control group at T_{30} [$t_{(12)}=3.18$, $P<0.01$]; this parameter was not significantly altered at T_{60} [$t_{(12)}=2.09$, $P=0.06$; Fig. 2d]. For swimming behavior, no significant differences were found between saline-treated and MCH-treated groups at either evaluation time [$t_{(12)}=1.88$, $P=0.08$ and $t_{(12)}=1.54$, NS for T_{30} and T_{60} , respectively; Fig. 2b and e]. However, MCH led to a significant decrease in climbing time at T_{30} [$t_{(12)}=2.23$, $P<0.05$] and T_{60} [$t_{(12)}=2.42$, $P<0.05$] compared with the respective control group (Fig. 2c and f). Overall, MCH induced a clear depressive-like response at T_{30} , but this effect was less evident at T_{60} .

Dose dependence of the effect of MCH in the FST

As significant differences in immobility and climbing time were observed 30 min after MCH (50 ng) microinjection, we selected this time to test the effect of MCH at two more doses (25 and 100 ng). Data from the previous test with MCH 50 ng at T_{30} were included in the analysis. Figure 3 shows that MCH elicits different behavioral profiles depending on the dose. A significant reduction in immobility time was observed when MCH was microinjected at the lowest concentration (25 ng) [$t_{(10)}=2.33$, $P<0.05$; Fig. 3a], without modifying swimming (Fig. 3b) or climbing (Fig. 3c) time [$t_{(10)}=0.78$, 0.70, respectively, NS]. As reported above, MCH (50 ng) significantly increased immobility time ($P<0.01$; Fig. 3a), with a concomitant decrease in climbing time ($P<0.05$; Fig. 3c), but no effect on swimming time (Fig. 3b). Neither immobility [$t_{(16)}=1.27$, $P=0.22$] nor swimming [$t_{(16)}=1.31$, $P=0.22$] behavior was altered significantly by

MCH 100 ng; however, a significant decrease in climbing behavior was observed [$t_{(16)}=2.61$, $P<0.05$; Fig. 3c].

Locomotor activity was unchanged at any of the doses of MCH tested [$F_{(3,24)}=0.51$, NS; Table 1]; thus, nonspecific effects can be excluded as an explanation for the FST results. However, the time spent in the center of the field was significantly increased by MCH 50 ng [$F_{(3,24)}=15.63$, $P<0.001$; post-hoc $P<0.001$], but not by MCH 25 and 100 ng.

Effects of MCH in the FST in ATC pretreated animals

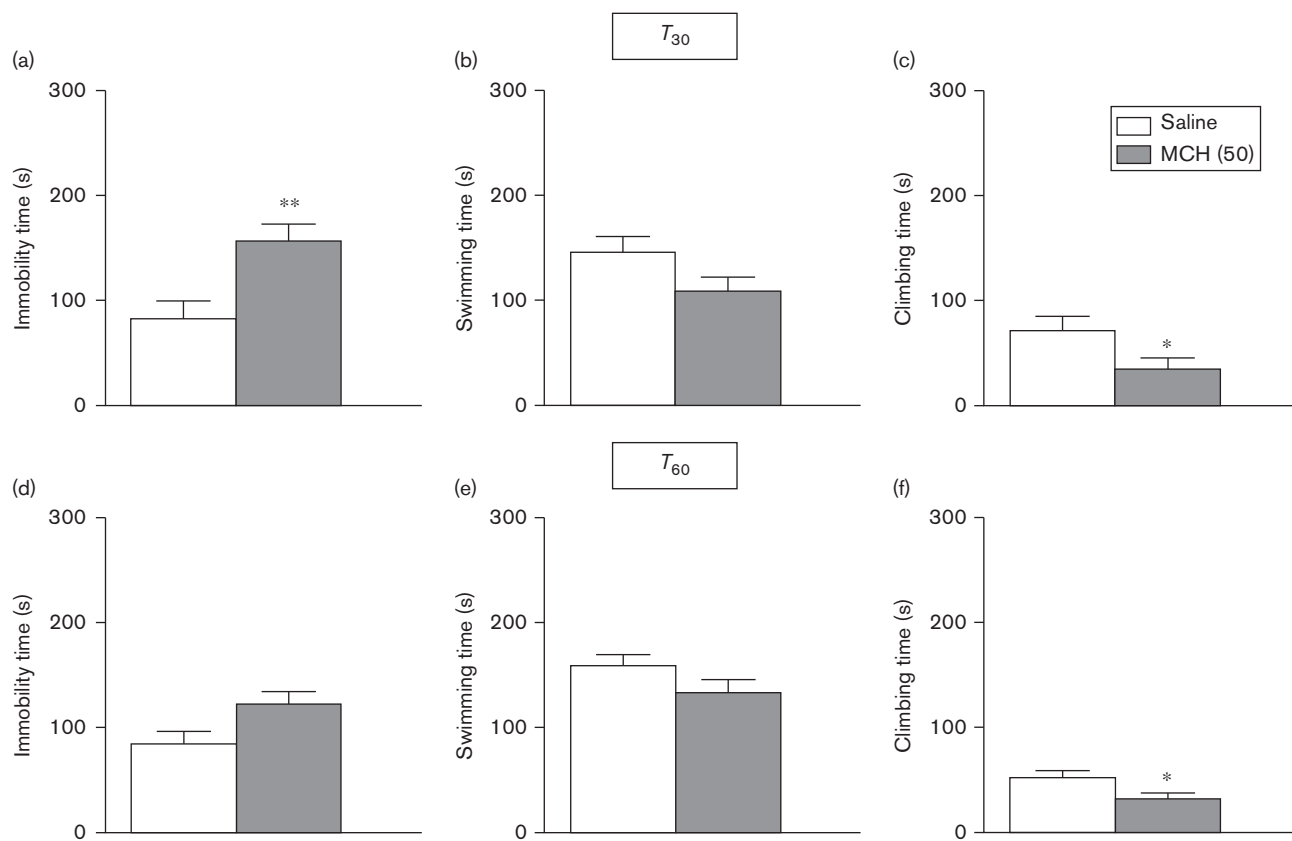
Figure 4 shows the effect on behavior in the FST of intra-DRN MCH (50 ng), evaluated at T_{30} , in ATC-pretreated or vehicle-pretreated animals. For immobility time, a significant effect of treatment was observed [$F_{(3,24)}=4.33$, $P<0.05$]. MCH significantly increased immobility time in vehicle-pretreated animals (vehicle + saline vs. vehicle + MCH, $P<0.05$; Fig. 4a), but this effect was absent in ATC-pretreated animals (vehicle + MCH vs. ATC + MCH, $P<0.05$; Fig. 4a). Intra-DRN ATC did not alter immobility time compared with the control group.

No significant treatment effects were observed on swimming behavior [$F_{(3,24)}=1.35$, NS; Fig. 4b], but there was a significant treatment effect on climbing behavior [$F_{(3,24)}=4.42$, $P<0.05$]. A significant reduction in climbing behavior was elicited by MCH (vehicle + saline vs. vehicle + MCH, $P<0.05$; Fig. 4c) and this effect was significantly prevented by pretreatment with ATC (vehicle + MCH vs. ATC + MCH, $P<0.05$). ATC *per se* did not significantly alter climbing behavior compared with the control group.

Effects of MCH in the FST in nortriptyline-pretreated animals

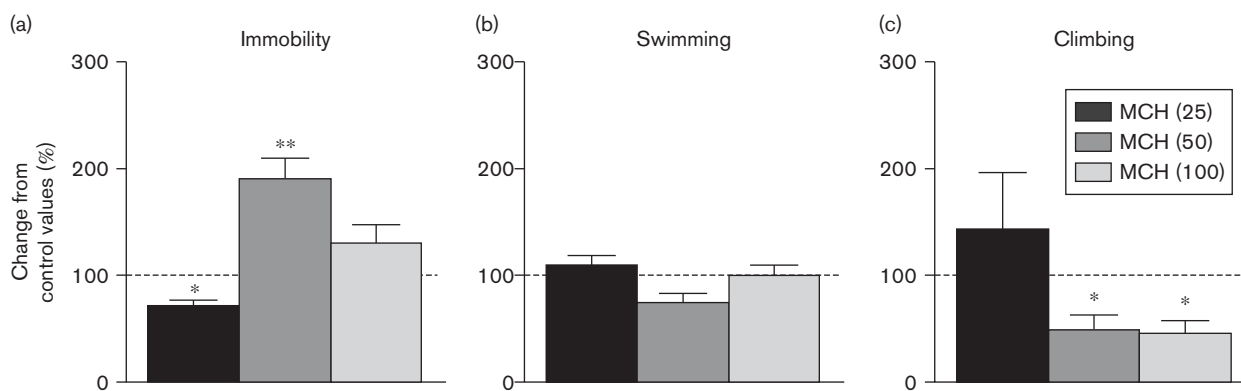
Figure 5 shows the effects of MCH (50 ng), evaluated 30 min after microinjection into the DRN in

Fig. 2



Effects of MCH 50 ng or saline on behavior in the FST 30 (T_{30} ; a–c) and 60 min (T_{60} ; d–f) after microinjection into the DRN. Bars represent mean \pm SEM of time spent in immobility, swimming, or climbing behavior. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, relative to the respective control group; Student t -test; $n = 7$ per group. DRN, dorsal raphe nucleus; FST, forced-swim test; MCH, melanin-concentrating hormone.

Fig. 3



Effects of MCH 25, 50, and 100 ng or saline on behavior in the FST 30 min after microinjection into the DRN. Data are shown as percent change in relation to the respective control group \pm SEM. The absolute values (mean \pm SEM) for control and treated animals, respectively, were as follows: Immobility time (a) 25 ng, 99.5 ± 11.0 versus 71.1 ± 5.1 ; 50 ng, 82.4 ± 16.7 versus 156.7 ± 16.2 ; 100 ng, 86.2 ± 13.1 versus 112.1 ± 15.4 . Swimming time (b) 25 ng, 169.0 ± 11.3 versus 184.0 ± 15.3 ; 50 ng, 145.9 ± 14.5 versus 108.6 ± 13.4 ; 100 ng, 165.7 ± 11.0 versus 165.9 ± 14.6 . Climbing time (c) 25 ng, 31.5 ± 8.4 versus 44.8 ± 16.9 ; 50 ng, 71.7 ± 13.1 versus 35.2 ± 8.7 ; 100 ng, 48.1 ± 6.4 versus 22.0 ± 5.7 . * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, for difference from the respective control group, two-tailed unpaired Student t -test; $n = 6-9$ per group. DRN, dorsal raphe nucleus; FST, forced-swim test; MCH, melanin-concentrating hormone.

Table 1 Effect of MCH microinjection into the DRN in the open-field test

Parameters	Treatment			
	Control	MCH (25)	MCH (50)	MCH (100)
Distance moved (m)	22.2±1.1	18.9±3.1	21.9±1.6	20.8±2.2
Center time (s)	3.1±1.4	3.2±1.2	11.2±1.2***	1.2±0.4

Values are represented as mean±SEM.

The control group was microinjected with saline.

One-way ANOVA, followed by Newman-Keuls test, $n=6-7$ for each group.

The effects were evaluated 30 min after the microinjection.

ANOVA, analysis of variance; DRN, dorsal raphe nucleus; MCH, melanin-concentrating hormone.

*Statistical differences versus the control group.

*** $P<0.001$.

Nor-pretreated or vehicle-pretreated animals. A significant effect of treatment on immobility time was observed [$F_{(3,30)}=8.09$, $P<0.001$]. Post-hoc analysis showed a significant increase in the immobility time following MCH relative to vehicle-pretreated animals (vehicle + saline vs. vehicle + MCH, $P<0.01$; Fig. 5a), but Nor pretreatment significantly prevented this effect (vehicle + MCH vs. Nor + MCH, $P<0.001$; Fig. 5a). Administration of Nor plus intra-DRN saline induced a nonsignificant reduction in immobility time compared with the control group.

No treatment effects were observed on swimming behavior [$F_{(3,30)}=0.66$, NS; Fig. 5b]. However, in the case of climbing behavior, there was a significant treatment effect [$F_{(3,30)}=16.11$, $P<0.001$]. Post-hoc tests showed that, compared with the control group, MCH significantly reduced climbing behavior (vehicle + saline vs. vehicle + MCH, $P<0.01$; Fig. 5c), and this effect was significantly prevented by Nor pretreatment (vehicle + MCH vs. Nor + MCH, $P<0.001$). Consistent with the literature (Cryan *et al.*, 2002; Consoni *et al.*,

2006), systemic administration of Nor significantly increased climbing time compared with the control group (Nor + saline vs. vehicle + saline, $P<0.01$).

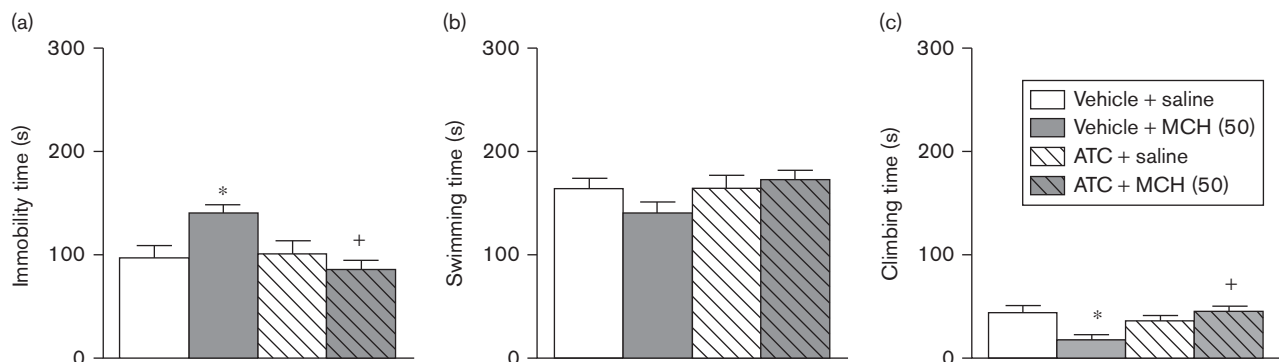
Evaluation of the effect of MCH in the elevated plus-maze

Table 2 shows that the microinjection of MCH (50 ng) into the DRN at T_{30} did not modify anxiety-related behaviors or the distance moved in the EPM.

Discussion

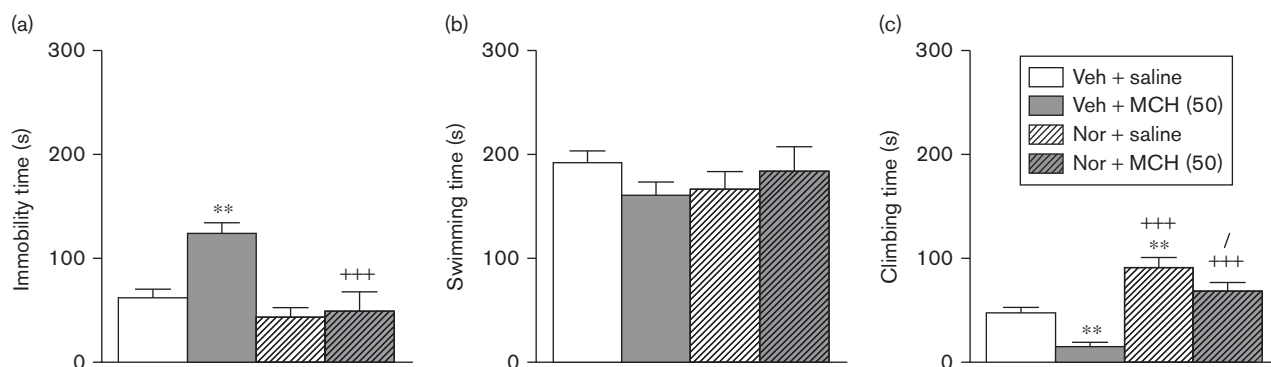
In the present study, we characterized the time course and dose-dependent behavioral effects induced by MCH microinjection into the DRN. This evaluation showed that the effect of MCH was time and dose dependent. Although MCH induced a clear depressive-like effect at 30 min after microinjection (T_{30}) using a 50 ng dose, this behavioral response disappeared 60 min after MCH microinjection. Also, the lower dose of MCH (25 ng) seemed to elicit an antidepressive effect at T_{30} , whereas the higher dose assayed (100 ng) only decreased the climbing behavior. On the basis of these results and according to previous data (Lagos *et al.*, 2011a) collected at T_0 , we considered that pretreatment times of 0–30 min and the 50 ng dose are the optimal conditions under which to continue the study of the mechanisms underlying the induction of depressive-related behaviors by intra-DRN MCH. Furthermore, the induction of a depressive-like response involves the activation of MCH-1 receptors, as ATC, the specific MCHR-1 antagonist, significantly reversed the effects of MCH.

Although a putative mechanism was not investigated directly, we have previously suggested that a link between the depressive-like effect of MCH and a decreased serotonergic neuronal activity within the DRN could be considered (Lagos *et al.*, 2011a). Several lines of

Fig. 4

Effect of MCH (50 ng) or saline on behavior in the FST 30 min after microinjection into the DRN in vehicle-pretreated or ATC-pretreated animals. The MCHR-1 antagonist ATC and vehicle were microinjected into the DRN 10 min before MCH microinjection. The bars represent mean±SEM of immobility time (a), swimming time (b), and climbing time (c). * $P<0.05$ versus vehicle + saline; + $P<0.05$ versus vehicle + MCH, one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test; $n=6-7$ per group. ANOVA, analysis of variance; DRN, dorsal raphe nucleus; FST, forced-swim test; MCH, melanin-concentrating hormone.

Fig. 5



Effects of MCH (50 ng) or saline on behavior in the FST 30 min after the microinjection into the DRN in vehicle-pretreated or nortriptyline (Nor)-pretreated animals. Nor and vehicle were administered intraperitoneally 24, 5, and 1 h before the FST test session. The bars represent mean \pm SEM of immobility time (a), swimming time (b), and climbing time (c). *versus vehicle+saline; ⁺versus vehicle+MCH; [/]versus Nor +saline; ^{/'} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$; ⁺⁺⁺ $P < 0.001$; one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls test; $n = 7-8$ per group. ANOVA, analysis of variance; DRN, dorsal raphe nucleus; FST, forced-swim test; MCH, melanin-concentrating hormone.

Table 2 Effect of MCH microinjection into the DRN in the elevated plus-maze

Parameters	Treatment	
	Saline	MCH (50)
Entries OA (%)	19.8 \pm 8.6	20.3 \pm 5.6
Time OA (%)	8.2 \pm 3.5	10.1 \pm 3.5
Entries CA (%)	80.2 \pm 8.6	79.6 \pm 5.6
Time CA (%)	83.0 \pm 4.1	82.9 \pm 4.8
Risk assessment	1.8 \pm 0.4	3.4 \pm 0.6
Head dipping	4.5 \pm 1.9	4.2 \pm 1.7
Distance moved (m)	13.1 \pm 1.1	14.4 \pm 1.7

Values are represented as mean \pm SEM.

Student *t*-test, $N = 7$ for each group.

No statistical differences were found between the control and the MCH-treated groups.

The effects were evaluated 30 min after the microinjection.

CA, closed arms; DRN, dorsal raphe nucleus; MCH, melanin-concentrating hormone; OA, open arms.

evidence support this hypothesis. It is well known that the DRN receives a dense network of MCHergic fibers (Bittencourt *et al.*, 1992; Torterolo *et al.*, 2008; Lagos *et al.*, 2009), which probably modulates DRN serotonergic neuronal activity. In preliminary studies, we observed that the intracerebroventricular or juxtacellular application of MCH into the DRN mainly decreased the firing rate of recorded units, which, from their basal electrophysiological characteristics, resembled the serotonergic neuronal phenotype (Pascovich *et al.*, 2011). In addition, perfusion of MCH (30 μ mol/l) intra-DRN decreased extracellular 5-HT levels measured by microdialysis (Urbanavicius *et al.*, 2013). In behavioral experiments, we had shown previously that the depressive-like profile induced by MCH introduction into the DRN was partially prevented by the systemic and subchronic administration of fluoxetine, an antidepressant drug, which increases the serotonergic neurotransmission by the inhibition of 5-HT reuptake (Lagos *et al.*, 2011a).

Moreover, microinjections of MCH into the DRN promoted the generation of REM sleep (Lagos *et al.*, 2009), a behavioral disturbance distinctive of depressive patients (Palagini *et al.*, 2013), whereas the immunoneutralization of this neuropeptide within the DRN inhibited REM sleep (Lagos *et al.*, 2011b). These results suggested that MCH inhibits the 'permissive' REM-off serotonergic neurons of the DRN (Monti, 2010; Palagini *et al.*, 2013). In accordance with all these results, it was shown that inhibition of DRN serotonergic neurons by electrical stimulation of the subthalamic nucleus elicited a depression-related behavior in the FST, which was reversed by citalopram, another 5-HT-enhancing antidepressant (Temel *et al.*, 2007). Taken together, this evidence strongly supports a serotonergic mechanism underlying the physiological effects of intra-DRN MCH. However, the participation of other neurotransmitters cannot be ruled out as the three doses of MCH tested induced different patterns of behavior in the FST. It is possible that depending on the dose, MCH modulates the serotonergic system directly and other neurotransmission systems indirectly. In fact, the activity of serotonergic neurons is highly controlled by local GABAergic interneurons, intrinsic serotonergic mechanisms, and afferent pathways of other neurotransmission systems to the DRN, such as GABAergic, glutamatergic, serotonergic, or noradrenergic (Adell *et al.*, 2002). In the present study, we showed that systemic pretreatment with Nor prevented the behavioral effect of intra-DRN MCH. Moreover, Nor could completely restore to control levels the behavioral changes induced by MCH (i.e. increased immobility time and decreased climbing behavior), which were only partially blocked by fluoxetine pretreatment (the increase in immobility time was significantly blocked, but the decrease in climbing behavior was not affected; Lagos *et al.*, 2011a). It is

possible that the systemic administration of Nor compensates the behavioral deficit by an antidepressant effect that is independent of the mechanism by which MCH elicits a prodepressive response. However, other interpretations could also be considered.

DRN 5-HT neurons receive ascending noradrenergic afferents that originate from the locus coeruleus (LC) (Anderson *et al.*, 1977; Baraban and Aghajanian, 1981) and it is well established that NA neurons modulate the serotonergic system (Clement *et al.*, 1992; Yoshioka *et al.*, 1992). Therefore, it is possible to consider a local effect of MCH on noradrenergic neurotransmission within the DRN. The intra-DRN microinjection of MCH could directly inhibit the noradrenergic transmission (probably through MCHergic receptors located on noradrenergic terminals), leading to disruption of a local 5-HT/NA balance. This could explain the behavioral pattern observed after MCH and its restoration by Nor treatment. Conversely, the serotonergic innervation of the LC derives partly from the DRN (Morgane and Jacobs, 1979; Vertes and Kocsis, 1994), and there is considerable evidence indicating that the serotonergic system functionally influences brain NA neurons (Haddjeri *et al.*, 1997; Kaehler *et al.*, 1999; Szabo and Blier, 2001). Therefore, a distal (or indirect) effect of intra-DRN MCH on LC NA neurons cannot be excluded.

Taken together, our data suggest that changes in the noradrenergic system are also directly or indirectly involved in the action of MCH. In this context, we have recently reported a prodepressive effect of MCH microinjected into the median raphe nucleus (MnR; López Hill *et al.*, 2013), although some differences were detected. A lower efficacy of MCH was observed in comparison with DRN microinjection (100 ng of MCH was needed to induce a depressive-like response in the MnR), and a different behavioral pattern was elicited by MCH (i.e. an increase in immobility time and decrease in swimming behavior, with no change in climbing behavior). We have proposed that MCH acts differently on the activity of MnR and DRN neurons altering the 5-HT/NA balance in both regions (López Hill *et al.*, 2013). Additional experiments should be conducted to clarify the anatomical and neurochemical bases of the action of MCH in the raphe nuclei.

In the present paper, we also showed that the depressive-like effect of MCH 50 ng at T_{30} was not accompanied by changes in anxiety-related behaviors, evaluated in the EPM. A similar lack of effect on anxiety-related behaviors in the EPM was observed previously following an intra-DRN microinjection of MCH at doses of 50 and 100 ng (T_0) (Urbanavicius, 2013, unpublished data). The increase observed in the time spent in the center of the OFT suggests an anxiolytic effect of MCH. However, although it is unclear why MCH induced this effect in the OFT, the EPM is considered a more specific and

widely used paradigm to assess behaviors related to experimental anxiety (Pellow and File, 1986; Razafsha *et al.*, 2013).

These findings suggest that MCHergic projections to DRN neurons do not have functional consequences for anxiety, at least at the same dose at which the prodepressive effect is observed. The effect of central administration of MCH on anxiety-related behavior is unclear (Basso *et al.*, 2006): the intracerebroventricular injection of MCH or infusion directly into different brain regions has been reported to induce both anxiogenic (Gonzalez *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2006) and anxiolytic effects (Monzon and De Barioglio, 1999; Kela *et al.*, 2003; Carlini *et al.*, 2006). Here, we provide evidence that the DRN is not involved in the induction of anxiety-related behaviors by MCH. On the contrary, our data support a role for an MCHergic modulation on DRN neurons in the regulation of depression-related behaviors.

Conclusion

We showed that MCH is functionally related to depressive-like, but not anxiety-related behaviors. In addition, the mechanism of action of MCH was shown to be mediated by MCHR-1 and probably involves a modulation of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the DRN.

Acknowledgements

This study was fully supported by Grant Fondo Clemente Estable (FCE/1/2011/1/5997 – ANII) and PEDECIBA (Uruguay). J.U. currently has a postgraduate fellowship from ANII and is a PhD student of PEDECIBA. The authors thank Ximena López Hill for technical assistance in the FST experiments.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

- Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* **39** (2–3):154–180.
- Anderson CD, Pasquier DA, Forbes WB, Morgane PJ (1977). Locus coeruleus-to-dorsal raphe input examined by electrophysiological and morphological methods. *Brain Res Bull* **2**:209–221.
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ (2002). Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res* **136**:443–453.
- Azmitia EC, Segal M (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* **179**:641–667.
- Baraban JM, Aghajanian GK (1981). Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res* **204**:1–11.
- Basso AM, Bratcher NA, Gallagher KB, Cowart MD, Zhao C, Sun M, *et al.* (2006). Lack of efficacy of melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonists in models of depression and anxiety. *Eur J Pharmacol* **540** (1–3):115–120.
- Bittencourt JC (2011). Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* **172**:185–197.
- Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, *et al.* (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immunohistochemical and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* **319**:218–245.

- Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, *et al.* (2013). Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun* **4**:1547.
- Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, *et al.* (2011). Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* **61**:524–543.
- Carlini VP, Schiöth HB, de Bariooglio SR (2006). Melanin-concentrating hormone (MCH) reverses the behavioral effects induced by inescapable stress. *Peptides* **27**:2300–2306.
- Chaki S, Funakoshi T, Hirota-Okuno S, Nishiguchi M, Shimazaki T, Iijima M, *et al.* (2005). Anxiolytic- and antidepressant-like profile of ATC0065 and ATC0175: nonpeptidic and orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:831–839.
- Chung S, Hopf FW, Nagasaki H, Li CY, Belluzzi JD, Bonci A, Civelli O (2009). The melanin-concentrating hormone system modulates cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:6772–6777.
- Chung S, Verheij MM, Hesselting P, van Vugt RW, Buell M, Belluzzi JD, *et al.* (2011). The melanin-concentrating hormone (MCH) system modulates behaviors associated with psychiatric disorders. *PLoS One* **6**:1–10.
- Clement HW, Gems D, Wesemann W (1992). Serotonin-norepinephrine interactions: a voltammetric study on the effect of serotonin receptor stimulation followed in the N. raphe dorsalis and the locus coeruleus of the rat. *J Neural Transm Gen Sect* **88**:11–23.
- Consoni FT, Vital MA, Andreatini R (2006). Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**:451–458.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* **23**:238–245.
- Dell'Osso B, Palazzo MC, Oldani L, Altamura AC (2011). The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects. *CNS Neurosci Ther* **17**:723–732.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* **121**:66–72.
- Gonzalez MI, Vaziri S, Wilson CA (1996). Behavioral effects of alpha-MSH and MCH after central administration in the female rat. *Peptides* **17**:171–177.
- Haddjeri N, de Montigny C, Blier P (1997). Modulation of the firing activity of noradrenergic neurones in the rat locus coeruleus by the 5-hydroxytryptamine system. *Br J Pharmacol* **120**:865–875.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* **72**:165–229.
- Kaehler ST, Singewald N, Philippu A (1999). Dependence of serotonin release in the locus coeruleus on dorsal raphe neuronal activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **359**:386–393.
- Kela J, Salmi P, Rimondini-Giorgini R, Heilig M, Wahlestedt C (2003). Behavioural analysis of melanin-concentrating hormone in rats: evidence for orexigenic and anxiolytic properties. *Regul Pept* **114** (2–3):109–114.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM (2009). Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* **1265**:103–110.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM (2011a). Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav Brain Res* **218**:259–266.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Monti JM (2011b). Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: effects on sleep and wakefulness. *Brain Res* **1369**:112–118.
- López Hill X, Pascovich C, Urbanavicius J, Torterolo P, Scorza MC (2013). The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH: differences with the dorsal raphe nucleus. *Peptides* **50**:96–99.
- Lucki I (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* **8** (6–7):523–532.
- Monti JM (2010). The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med Rev* **14**:307–317.
- Monzon ME, De Bariooglio SR (1999). Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. *Physiol Behav* **67**:813–817.
- Morgane PJ, Jacobs MS (1979). Raphe projections to the locus coeruleus in the rat. *Brain Res Bull* **4**:519–534.
- Nutt DJ, Stein DJ (2006). Understanding the neurobiology of comorbidity in anxiety disorders. *CNS Spectr* **11** (Suppl 12):13–20.
- Palagini L, Baglioni C, Ciapparelli A, Gemignani A, Riemann D (2013). REM sleep dysregulation in depression: state of the art. *Sleep Med Rev* **17**:377–390.
- Pascovich C, Devera A, Lagos P, Costa A, Falconi A, Torterolo P (2011). *Melanin-concentrating hormone (MCH) decreases presumed serotonergic neuronal activity in the dorsal and median raphe nucleus*. Huerta Grande, Argentina: Congreso de la Sociedad Argentina de Neurociencias.
- Paxinos G, Watson C (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Sydney: Academic Press.
- Pellow S, File SE (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **24**:525–529.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* **47**:379–391.
- Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai RA, Khaku A, Mondello S, *et al.* (2013). An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience* **240**:204–218.
- Roubert C, Cox PJ, Bruss M, Hamon M, Bönisch H, Giros B (2001). Determination of residues in the norepinephrine transporter that are critical for tricyclic antidepressant affinity. *J Biol Chem* **276**:8254–8260.
- Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* **435**:26–40.
- Smith DG, Davis RJ, Rorick-Kehn L, Morin M, Witkin JM, McKinzie DL, *et al.* (2006). Melanin-concentrating hormone-1 receptor modulates neuroendocrine, behavioral, and corticolimbic neurochemical stress responses in mice. *Neuropsychopharmacology* **31**:1135–1145.
- Szabo ST, Blier P (2001). Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res* **922**:9–20.
- Temel Y, Boothman LJ, Blokland A, Magill PJ, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2007). Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:17087–17092.
- Torterolo P, Lagos P, Sampogna S, Chase MH, Torterolo P, Lagos P, Monti JM (2008). Melanin-concentrating hormone (MCH) immunoreactivity in non-neuronal cells within the raphe nuclei and subventricular region of the brainstem of the cat. *Brain Res* **1210**:163–178.
- Torterolo P, Monti JM (2011). Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Front Neurol* **2**:1–12.
- Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V (1999). Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol Psychiatry* **46**:473–483.
- Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Scorza C (2013). Role of melanin concentrating hormone (MCH) on the dorsal raphe nucleus (DRN): its relevance for depression. *J Neurochem* **125**:265.
- Vertes RP, Kocsis B (1994). Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* **340**:11–26.
- Yoon YS, Lee HS (2013). Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* **1490**:72–82.
- Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Smith CB, Saito H (1992). Alpha 2-adrenoceptor modulation of 5-HT biosynthesis in the rat brain. *Neurosci Lett* **139**:53–56.



The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH: Differences with the dorsal raphe nucleus



Ximena López Hill^a, Claudia Pascovich^b, Jessika Urbanavicius^a, Pablo Torterolo^b, María Cecilia Scorza^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2013

Received in revised form 1 October 2013

Accepted 1 October 2013

Available online 11 October 2013

Keywords:

Neuropeptide
Mood disorders
Hypothalamus
Depression
Raphe nuclei

ABSTRACT

An emerging body of evidence involves the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone (MCH) in the regulation of emotional states. We have reported a pro-depressive effect induced by MCH after its microinjection into the dorsal raphe nucleus (DR) evaluated in the forced swimming test (FST) in rats. Here we extended this study to the median raphe nucleus (MnR). Firstly, the presence of MCH-containing fibers in the rat MnR was analyzed by means of immunohistochemistry. Secondly, the behavioral effect induced by the microinjection of MCH into the MnR was assessed using the FST. Morphological results showed a large density of MCHergic fibers within the MnR. Behavioral results indicated that 100 ng of MCH (but not 50 ng) significantly increased the immobility time and decreased the swimming time, demonstrating a depressive-like effect. In contrast, climbing behavior was not significantly affected. Present findings revealed that the MnR neurons participate in the MCHergic control of affective-related behavioral responses. However, the behavioral patterns induced by MCH in the MnR and DR were different. This could be explained by anatomical and physiological differences between both nuclei.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Melanin-concentrating hormone (MCH) is a 19 amino acid cyclic peptide produced by neurons located in the lateral hypothalamus and the incerto-hypothalamic area of mammals [3]. Morphological studies in rats have shown that MCH receptor 1 (MCHR-1) mRNA and protein as well as MCH-containing fibers are distributed in the dorsal and median raphe nuclei (DR, MnR, respectively) [9,16], whose serotonergic neurons are implicated in the physiopathology of major depression (MD) [1]. An important body of preclinical studies have proposed that MCH, in addition to its well documented role in the regulation of feeding and energy homeostasis, is involved in the regulation of emotional states [4,7,17]. For example, the administration of MCH into the DR induced a pro-depressive state in rats [11]. Besides, it has been reported that microinjections of MCH into the DR promote REM sleep [10]; increased REM sleep duration is considered a biological marker of depression [13]. However, there are no data regarding the specific role of MCH in

the MnR. In order to further understand the role of MCH in the raphe nuclei, the present study was designed to identify MCHergic fibers reaching the MnR by immunohistochemistry, and, to study the behavioral effects induced by MCH intra-MnR using the forced swimming test (FST).

2. Materials and methods

Thirty three male Wistar rats (250–280 g) obtained from the IIBCE animal facilities were used. Animals were kept under controlled light and temperature conditions with food and water ad libitum. All procedures were carried out in accordance to the IIBCE Bioethics Committee's requirements and the National Law on animal experimentation (No. 18.611).

Immunohistochemical procedures were performed in two animals, as previously reported [11]. Briefly, free-floating brain sections were incubated with a rabbit anti-MCH antibody (1:5000; Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) followed by an incubation with a secondary antibody anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor-488 (1:1500; Jackson ImmunoResearch, USA). Photomicrographs and analysis of the images were performed by a confocal laser-scanning microscope (Olympus FV300) and the Fluoview 5 (Olympus) software.

* Corresponding author at: Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, ZP11600 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 2487 1616x115; fax: +598 2487 5548.

E-mail address: scorzacecilia@gmail.com (M.C. Scorza).

The behavioral effect of MCH was performed using an implanted group of animals. By means of stereotaxic surgery, a stainless steel guide cannula (25 G, 20 mm in length) was inserted at a 20° angle and left 2 mm above the MnR (DV 6.3 mm, from dura mater, AP –7.5 to –7.9 mm, L +2.6 mm) [15]. Animals were left in their home cages 5–6 days after guide cannula implants in order to recover from the surgery [11]. The day of the experiment, an administration cannula (27 G, 22 mm in length) was slowly introduced through the guide cannula toward the final position in the MnR (DV 8.3 mm) in order to microinject MCH.

MCH (Phoenix Pharmaceuticals Inc., #070-47) was perfused at two doses, 50 and 100 ng (0.5 and 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively) using an infusion pump (Harvard Apparatus, Instech, USA) set at a flow rate of 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ during 15 s plus 10 additional seconds to allow drug diffusion (final volume of 0.1 μl). The location of the microinjection sites was confirmed by histological procedures that were described in previous reports [10,11].

For the FST, the experimental procedure was essentially similar to that previously described [8]. Briefly, rats were placed individually into a Plexiglas cylinder (diameter: 30 cm, height: 50 cm) containing 23–24°C water with a depth of 30 cm preventing the rats from supporting themselves touching the bottom with their paws. Two swimming sessions were conducted; an initial 15 min pre-test and a 5 min test 24 h later [6]. Immobility, swimming and climbing times were recorded during the test session (5 min) 30 min after the MCH/saline microinjections into MnR.

The effect of MCH on motor activity was tested in other group of implanted animals. Distance moved in meters was automatically recorded by Ethovision XT 7.0 software (Noldus, the Netherlands) in an open field test (15 min, periods of 5 min each).

All data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA followed by Newman–Keuls test and Student *t*-test were used. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

According to the schematic representation of the MnR (Fig. 1A) a large density of fibers containing MCH immunoreactivity in the MnR was observed (Fig. 1B). Microinjections were localized within the MnR in 29 out of 31 rats; only data from these animals were used. A photomicrograph of a coronal brain section of a representative animal microinjected with MCH into the MnR is exhibited in Fig. 1C. MCH induced a significant dose-dependent effect on immobility and swimming times without affecting the climbing behavior. One-way ANOVA revealed a significant effect treatment [$F_{(2,18)} = 12.18, P < 0.001$]. Post hoc Newman–Keuls test revealed that 50 ng of MCH did not induced a significant change in any of the parameters evaluated in the FST (Fig. 2A). In contrast, 100 ng of MCH elicited a significant increase in the immobility time ($P < 0.001$) with a concomitant reduction in the swimming behavior ($P < 0.01$; Fig. 2B). A significant difference between MCH doses (Fig. 2A and B) was evidenced in both parameters ($P < 0.001$ for immobility time and $P < 0.01$ for swimming time) indicating a depressive-like effect induced by the high dose of MCH. Despite the reduction in the climbing behavior, no significant differences were observed between both doses of MCH and control group. OFT revealed that intra-MnR MCH administration at the high dose evoked a significant increase in the distance moved recorded during the first 5 min compared to the control group ($P < 0.05$), although the total locomotor activity was not affected (Fig. 2D). This observation discards non-specific effects evaluated in the FST.

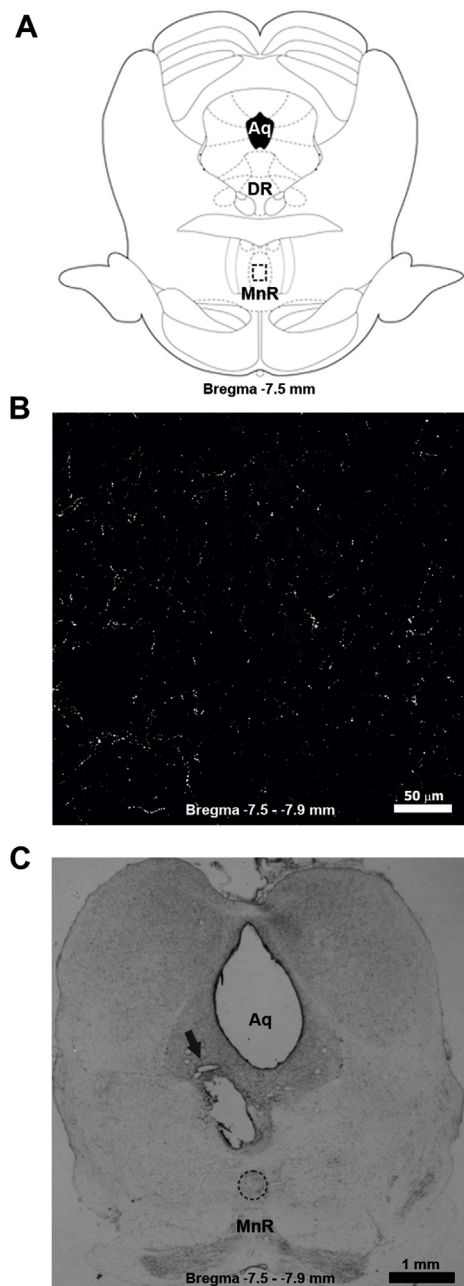


Fig. 1. (A) Scheme indicating the median raphe nucleus (MnR) location; diagram was taken from Ref. [15]. (B) A photomicrograph exhibiting the MCH immunoreactivity in the middle area of the MnR (indicated by a dotted square in A) at approximately from Bregma –7.5 to –7.9 mm. Calibration bar 50 μm . (C) Coronal section stained with Nissl's method that includes the MnR. The arrow indicates the track of guide cannula while the administration area is indicated with a dotted circle. The coronal section is from Bregma –7.5 to –7.9 mm. Bar size: 1 mm. Aq, cerebral aqueduct; DR, dorsal raphe; MnR, median raphe nucleus.

4. Discussion

In the present study we confirmed the presence of MCH-containing fibers within the MnR in rats. We also demonstrated that the microinjection of MCH into the MnR produced a dose-dependent and specific depressive-like behavior, providing additional preclinical evidence that the MCHergic system might be involved in the pathophysiology of MD [4,5,11]. The pro-depressive effect observed in the present paper and also the one described after the microinjection into the DR [11], can be attributed to a specific action of MCH into the raphe nuclei; however other sites, such

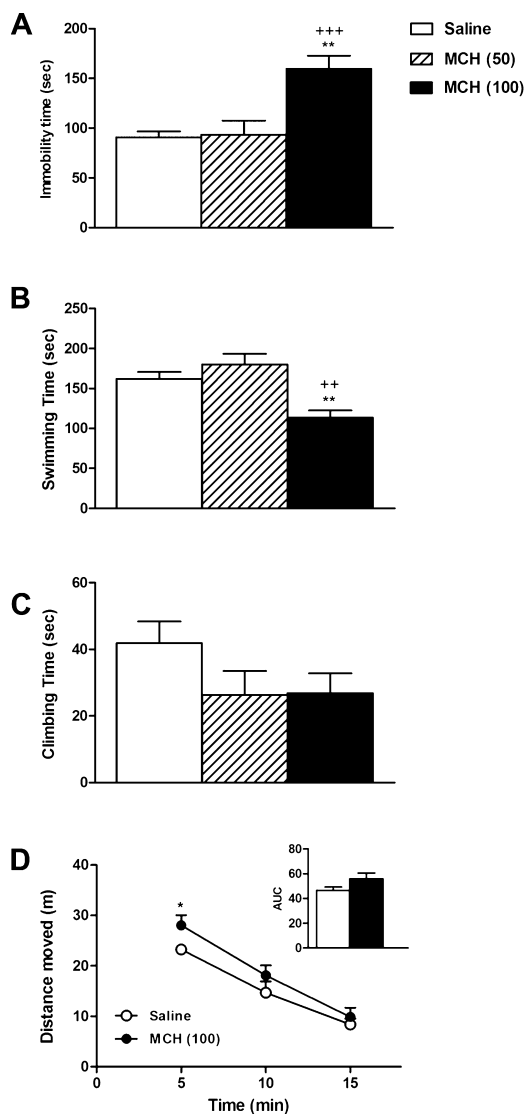


Fig. 2. Behavioral effects induced by MCH microinjections into the MnR evaluated in the FST and OFT. MCH 50 and 100 ng or saline was microinjected into the MnR and 30 min later tested in the FST. Bars represent means \pm SEM of immobility time (A), swimming time (B) and climbing time (C). MCH 100 ng or saline was microinjected into the MnR and 30 min later evaluated in the OFT (D). The inset graph represents the area under the curve (AUC) of the rat locomotor activity ($N=5$ per group). One-way ANOVA followed by Newman–Keuls test was applied to analyze the FST results. *Vs. control; ^{vs.} MCH. **, ^{***} $P<0.01$, ⁺⁺⁺ $P<0.001$. $N=6-7$ per group. Student t -test was applied to analyze the OFT results. *Vs. control, ^{*} $P<0.05$. $N=6-7$ per group.

as nucleus accumbens, were additionally involved in emotional-related behaviors induced by MCH [8]. In this regard, it is important to note that the MCHergic system (higher preproMCH expression and consequently receptor down-regulation) has been proposed as a biomarker for the severity of depressive behaviors [4,7].

Previous results of our group suggested that MCH modulates the serotonergic neuronal activity both in the DR and the MnR [14,18]. However, interesting behavioral differences were observed when MCH was applied in the MnR in comparison to the DR [11]. Firstly, the efficacy of the response was greater in the DR than in the MnR. While a pro-depressive effect is induced by 50 ng of MCH in the DR, 100 ng were needed to induce the same effect in the MnR. Secondly, MCH injection showed two different behavioral patterns. Whereas a significant decrease in climbing behavior was observed after 50 ng of MCH microinjected into DR, no significant effect in this parameter was observed when MCH (50 or 100 ng) was applied into the MnR. On the other hand, while MCH did not affect the swimming

behavior in the DR, 100 ng of MCH injected into the MnR decreased the swimming time. Considering that swimming is sensitive to serotonergic compounds and climbing to noradrenergic ones [6], it may be possible that MCH acts differently on the activity of MnR and DR neurons altering the 5-HT/noradrenaline balance in both regions. Besides, it is likely that the density and location of MCHergic receptors are not the same in both nuclei. Lastly, anatomical (neurons, projections and ultrastructure) and electrophysiological differences that have been described between the MnR and DR, could also explain the specific effect of MCH observed in each nuclei [1,2,12,19,20].

In conclusion, the MCHergic system may play a role in the emotion-related behaviors through the regulation of the neuronal activity in the MnR. Further experiments are needed to clarify the specific mechanisms involved. Our data are in agreement with previous reports showing that the antagonism of the MCHergic system might be a novel therapeutic strategy for depression.

Acknowledgements

This study was partially supported by “Proyecto de Iniciación CSIC 2887” and “FCE.1.2011.1.5997-ANII” grants and by PEDECIBA (Uruguay). We are grateful to Dr. Giselle Prunell for her help in language revision.

References

- Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 2002;39:154–80.
- Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* 2004;91(2):994–1005.
- Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* 2011;172:185–97.
- Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Heurich R, et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med* 2002;8:825–30.
- Chaki S, Funakoshi T, Hirota-Okuno S, Nishiguchi M, Shimazaki T, Iijima M, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like profile of ATC0065 and ATC0175: nonpeptidic and orally active melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:831–9.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:66–72.
- García-Fuster MJ, Parks GS, Clinton SM, Watson SJ, Akil H, Civelli O. The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011;22(8):607–13.
- Georgescu D, Sears RM, Hommel JD, Barrot M, Bolanos CA, Marsh DJ, et al. The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci* 2005;25:2933–40.
- Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, et al. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 2000;12:1194–216.
- Lagos P, Torterolo P, Jantos H, Chase MH, Monti JM. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 2009;1265:103–10.
- Lagos P, Urbanavicius J, Scorza C, Miraballes R, Torterolo P. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav Brain Res* 2011;218:259–66.
- Lemos JC, Pan YZ, Ma X, Lamy C, Akanwa AC, Beck SG. Selective 5-HT_{1B} receptor inhibition of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the rat dorsal and median raphe. *Eur J Neurosci* 2006;24(12):3415–30.
- Palagini L, Baglioni C, Ciapparelli A, Gemignani A, Riemann D. REM sleep dysfunction in depression: state of the art. *Sleep Med Rev* 2013;17(5):377–90.
- Pascovich C, Devera A, Lagos P, Costa A, Falconi A, Torterolo P. Melanin-Concentrating Hormone (MCH) decreases presumed serotonergic neuronal activity in the dorsal and median raphe nucleus. In: Congreso de la Sociedad Argentina de Neurociencias. 2011.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain*. New York: Academic Press; 2005.
- Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001;435:26–40.

- [17] Shimazaki T, Yoshimizu T, Chaki S. Melanin-concentrating hormone MCH(1) receptor antagonists: a potential new approach to the treatment of depression and anxiety disorders. *CNS Drugs* 2006;20:801–11.
- [18] Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Scorza C. Role of melanin concentrating hormone (MCH) on the dorsal raphe nucleus (DRN): its relevance for depression. *J Neurochem* 2013;125:265.
- [19] Vertes RPA. PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1991;313(4):643–68.
- [20] Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1999;407(4):555–82.

**MCHergic projections to the dorsal raphe nucleus: an immunohistochemical
and microdialysis study**

Jessika Urbanavicius^{1,4}, Patricia Lagos², Pablo Torterolo³ and Cecilia Scorza^{4*}

¹Laboratorio de Biología Celular, IIBCE. ²Laboratorio de Neurotransmisión Peptídica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. ³Laboratorio de Neurobiología del Sueño, Facultad de Medicina, Universidad de la República. ⁴Departamento de Neurofarmacología Experimental, IIBCE, Montevideo, Uruguay

*Corresponding author: María Cecilia Scorza, PhD.

⁴Departamento Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Avenida Italia 3318. ZP11600. Montevideo, Uruguay.

Telephone Number: (+) 598 2487 1616 ext: 115.

Fax Number: (+) 598 2487 5548.

E-mail: scorzacecilia@gmail.com / cscorza@iibce.edu.uy

Abstract

Neurons that utilize melanin-concentrating hormone (MCH) as a neuromodulator are located in the lateral hypothalamus and incerto-hypothalamic area, and project diffusely throughout the central nervous system. The MCHergic system has been implicated in the regulation of emotional states. In this regards, an increase of MCH synaptic availability in the dorsal raphe nucleus (DRN) promotes a depressive-like state, suggesting that a dysfunctional MCHergic projection to the DRN is involved in depression.

The present study was designed to analyze the MCHergic projection to different subregions of the DRN and upon the DRN 5-HT- and GABA-containing neurons. Additionally, a functional study was carried out in order to evaluate the local effect on 5-HT extracellular levels induced by MCH perfusion into the DRN.

Immunolabeling showed that MCHergic fibers were distributed throughout the rostro-caudal DRN extension. In addition, MCH fibers in close apposition to 5-HT and GABA-containing neurons were observed. While MCH 30 μ M perfusion produced a significant long-lasting (up to 120 min) decrease on extracellular 5-HT levels, 100 μ M induced a short (20 min) increase in 5-HT release.

Our results strongly suggest that both 5-HT- and GABA-containing neurons are modulated by MCH. A different sensitivity of these neurons to MCH concentration may explain the dose-response effect on 5-HT release. The decrease in extracellular 5-HT levels may explain the depressive-like effect induced by MCH.

Keywords: microdialysis in vivo, 5-HT, GABA, immunofluorescence, depression

1. Introduction

Several studies have involved the melanin-concentrating hormone (MCH) in the central regulation of energy homeostasis and sleep [19, 20, 23, 25, 30]. In recent years, it has been frequently reported that the MCHergic system is also involved in the regulation of affective states [6, 11, 26]. This statement is strengthened by the fact that brain areas related with the control of affective behaviors, receive dense MCHergic projections from the lateral hypothalamus and the incerto-hypothalamic area [4, 5]. Specifically, it has already been reported that MCHergic fibers reach the dorsal raphe nucleus (DRN) in rats [5, 16, 33], a brain region highly related with markers of human depression [2, 3, 21]. Based on this evidence we have demonstrated that acute intra-DRN MCH injection induced a depressive-like behavior in the rat forced-swimming test (FST) which was sensitive to fluoxetine (a 5-HTergic antidepressant) and nortriptyline (a noradrenergic antidepressant) pre-treatment, as well as blocked by a specific MCH-1 receptor (MCH-R1) antagonist [16, 31]. We have proposed that MCHergic system plays a main role in the emotion-related behaviors through the regulation of the neuronal activity in the DRN [16]. Two recent evidences have added relevant information about this. It was reported that MCHR-1 is expressed in serotonergic neurons of the DRN in rodents [9, 27]. Moreover, the intracerebroventricular and juxtacellular administration of MCH decreased the firing rate of presumed serotonergic DRN neurons [9]. Although both results may support the hypothesis that MCH regulates the DRN neuronal activity, precise data about the MCHergic projection towards the

DRN is still lacking. Moreover, the identification of the MCH cellular targets on DRN neurons is an important step to understand the mechanisms underlying MCH actions in this region.

The present work was designed to describe the specific distribution of the MCHergic afferents arriving to different DRN sections and to identify direct synaptic appositions between MCH fibers and 5-HT- and GABA-containing neurons, the most abundant cell subtypes within this nucleus [7, 14, 29]. Additionally, 5-HT response to MCH infusion into the DRN was evaluated.

2. Materials and Methods

Animals

Nineteen male adult Wistar rats (260-300 g) bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo, Uruguay), were used in this study. Animals were kept under controlled light and temperature conditions (temperature $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 h light-dark cycle, lights on at 07:00 h) with food and water *ad libitum*. All procedures were in strict accordance with the National Law on Animal Experimentation No. 18.611 and approved by the IIBCE Bioethics Committee. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Immunohistochemistry

The distribution of MCH-immunopositive (MCH+) fibers was analyzed at four different DRN rostro-caudal levels relative to bregma [22] and according to Gardner et al. [12] and Spiaci et al. [28] studies: rostral (6.84 to 7.08 mm), mid-rostral (7.20 to 7.80 mm), mid-caudal (7.92 to 8.28 mm) and caudal (8.52 to 9.00 mm). At each rostro-caudal coordinate, dorsal and ventral sections of the DRN were analyzed. Mid-rostral and caudal levels in lateral wings section were also analyzed.

Three animals were used for double labeling of 5-HT cells and MCH fibers experiments. Animals were anaesthetized with urethane and transcardially perfused with 0.9 % saline followed by cold 4 % paraformaldehyde (PFA) in a 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. Double labeling of GABA cells and MCH fibers were also performed, two rats were stereotaxically injected i.c.v. (coordinates: AP: -0.9; L: 1.6; DV: -3.4 according to bregma) with colchicine (60 μ g) in order to concentrate the glutamic acid decarboxylase (GAD, GABA-synthesizing enzyme) within the soma. Twenty four h later animals were perfused with a fixative solution consisted in a mixture of 4 % PFA - 0.5 % glutaraldehyde.

Brains were immediately dissected and fixed by immersion in a 4 % PFA - 20 % sucrose solution for 2 h at 4 °C and after that cryoprotected in a 20 % sucrose solution during 48 h. Brains were frozen on dry ice and cut in a cryostat. Coronal sections (30 μ m thick) at the level of the DRN were collected and stored in an anti-freeze solution until immunostaining procedures. Free-floating brain sections were incubated in 0.5 % sodium borohydride followed by phosphate buffer (PB) with glycine 50nM and 0.1% BSA. Section were then incubated in PB

containing 0.1 % Triton X-100, 0.1 % lysine and 0.1 % normal donkey serum for 1 h and immediately incubated simultaneously with a polyclonal rabbit anti-MCH (1:5000; Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) and a polyclonal goat anti-5-HT antibody (1:500; ImmunoStar, USA) during 48 h at 4 °C. After that, sections were washed in PB and simultaneously incubated with the secondary antibodies: anti-rabbit IgG conjugated to Cy3 and anti-goat conjugated to Alexa Fluor-488 (1:1500; Jackson ImmunoResearch, USA) for 1.5 h at room temperature, washed and mounted on glass slides in anti-fade mounting medium (Citifluor, UK) resulting in green-labeled MCH fibers and red-labeled 5-HT cells. A polyclonal rabbit anti-MCH antibody (1:5000) in combination with a monoclonal mouse anti-GAD-67 antibody were also used; secondary anti-rabbit IgG antibodies conjugated to Cy3 and anti-mouse conjugated to Alexa Fluor-488 (1:1500) revealed red-labeled MCH fibers and green-labeled GAD-67 immunoreactive cells.

Cross reaction of the two sets of immunoreagents used for double immunofluorescence was controlled by using primary antiserum raised in different species followed by two species-selective and affinity-purified secondary antisera; each conjugated to a different fluorescent label, which bound specifically to the species in which the primary antiserum was raised. Immunostaining of structures in the DRN with double labeling was consistent with single-label immunostaining. Negative controls without the primary antibodies were also performed. Photomicrographs were obtained by a Olympus BX61-FV300 or a Leica TCS-SP5-DMI 6000 confocal laser-scanning microscopes. The analysis of the images were performed using the Fluoview 5 (Olympus, Japan) or LAS AF 2.6.0.7266 (Leica

Microsystems, Germany) software. Images were exported to Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) for contrast and brightness adjustment.

In vivo microdialysis procedure

Fourteen rats were anesthetized with a combination of ketamine (90 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p., Konsol Köning S.A Laboratory) and stereotaxically implanted with a guide cannula (BAS, MD-2250) in the DRN at the following coordinates (in mm): AP -7.8, L +3.2, DV -5 with a lateral angle of 30° relative to bregma and dura mater according to Paxinos and Watson atlas [22]. After surgery, animals were housed individually into test cages and allowed to recover. Microdialysis experiments in freely moving rats were conducted > 20 h after surgery. On the experimental day, a probe (BAS MD-2200, 2 mm membrane length) was implanted and perfused at a flow rate 1.5 µl/min with artificial cerebrospinal fluid (aCSF; 125 mM NaCl; 1.26 mM CaCl₂; 2.5 mM KCl; 1.18 mM MgCl₂) containing citalopram (1 µM). After 100 min stabilization period, four fractions were collected to obtain basal values before local administration of MCH by reverse dialysis. MCH (Phoenix Pharmaceuticals Inc., #070-47) solution was prepared in aCSF-citalopram at a final concentration of 30 or 100 µM and perfused during 40 min. Successive 20-min dialysate samples (30 µl) were collected. 5-HT concentration in dialysate samples was immediately determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Waters 2465) equipped with an electrochemical detector Epsilon e5P at +0.65 V (glassy carbon working electrode

versus an Ag/AgCl reference electrode). Column (C18, 3 μ m particle size) was kept at 37 °C. The mobile phase consisted of citric acid (0.15 M), sodium octylsulphate (0.6 mM), 4 % acetonitrile and 5 % tetrahydrofuran at pH= 3.0; with a flow rate of 0.3 ml/min. At the end of the experiments, brains were processed for histological procedures for confirmation of probe localization [16, 31].

Statistical analysis.

Content of 5-HT are expressed as the percentage of baseline levels. Data are expressed as Mean \pm SEM values. Two-way repeated analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

Distribution of MCHergic fibers in different DRN sections

Figures 1-3 show the presence of MCH-immunopositive (MCH+) varicosities and fibers at rostro-caudal axis of the dorsal, ventral and lateral wings sections of the DRN (Fig. 1 to 3, respectively) based on the distribution of the 5-HT-immunopositive (5-HT+) neurons, the most abundant cellular subtype in DRN. In each DRN section, MCH+ fibers were observed in the antero-posterior extension of the DRN from rostral (A1), mid-rostral (B1), mid-caudal (C1) to caudal (D1) levels. MCH+ fibers display a homogeneous distribution in dorsal and ventral sections of

DRN (Fig. 1 and 2 A-D). It could be seen that MCH+ fibers are intermingled and in close proximity with 5-HT+ neurons-labeled soma and dendrites.

GABA neurons are the second abundant cellular subtype found in DRN [1, 7, 17]. This subtype is specifically concentrated in the lateral wings section of DRN [7, 29]. Thus, the distribution of MCHergic fibers was studied in colchicine pre-treated animals based on the GAD-67-immunopositive neurons (GAD-67+) in this region at two different levels, mid-rostral and mid-caudal DRN (Fig. 4 A and B). As expected, colchicine reduced MCH immunolabeling. In spite of this fact, MCH+ fibers could be observed at both levels and appeared intermingled with GAD-67+ neurons. All these data suggest that MCH+ fibers similarly innervate both cell populations within the DRN.

Putative synaptic contacts between MCHergic fibers and 5-HT and GABA-containing neurons

Figures 5 and 6 show how MCH+ fibers approach to the 5-HTergic soma (Fig. 5 A-C) at the mid-rostral and caudal DRN and to the GABAergic neurons in the lateral wings (Fig. 6 A-C). Moreover, through orthogonal views it could be seen the appositions between MCH+ fibers and 5-HTergic (Fig. 5 D) and GABAergic soma (Fig. 6 D). These images strongly suggest synaptic contacts between MCH+ fibers and 5-HTergic and GABAergic neurons.

5-HT response to MCH infusion into DRN

aCSF perfusion along the entire experimental period did not alter dialysate 5-HT concentrations (Fig. 7 A and B) and basal level of 5-HT in dialysates from DRN was 107.0 ± 55.6 fmol/fraction. Extracellular 5-HT levels varied in a dose-dependent way after the local application of MCH in DRN. Two-way ANOVA revealed a significant effect of time [$F_{(1-10)} = 5.08$, $p < 0.001$], treatment [$F_{(1-10)} = 49.63$, $p < 0.001$] and of the time x treatment interaction [$F_{(1-10)} = 3.41$, $p < 0.001$]. Post-hoc analysis showed that MCH, at a low concentration ($30 \mu\text{M}$), induced a significant decrease on the 5-HT output ($p < 0.001$ and $p < 0.05$). The effect was evidenced after the perfusion of MCH (40 min) and lasted 120 min (five fractions; Fig. 7 A). In contrast, MCH at a high concentration ($100 \mu\text{M}$) elicited a smaller but significant increase on 5-HT levels. Two-way ANOVA did not evidence significant differences of time [$F_{(1-10)} = 1.76$, $p = 0.08$], treatment [$F_{(1-10)} = 4.05$, $p = 0.08$] and time x treatment interaction [$F_{(1-10)} = 2.00$, $p < 0.05$]. Post-hoc analysis showed that 5-HT output was significantly increased compared with control group ($p < 0.01$); the effect was evidenced after the perfusion of MCH (40 min) lasting only 20 min (one fraction; Fig. 7 B). Figure 8 shows the correct location of a representative cannula track in the DRN.

4. Discussion

Precise anatomical connections and functional effects produced by the MCH neurons on the DRN have been scarcely investigated. In the present work we observed MCHergic fibers displaying a similar distribution pattern along the DRN rostro-caudal axis, and we demonstrated close appositions between MCH fibers and 5-HTergic and GABAergic neurons. Moreover, perfusion of a low dose of MCH into DRN induced a long-lasting decrease on extracellular 5-HT, while high dose produced a limited increase in 5-HT neurotransmission.

It has been reported that axons of hypothalamic MCH-containing neurons project diffusely to multiple sites in the central nervous system and the MCH receptors are widely distributed throughout the brain [4, 8], suggesting multiple functions for MCH, such as food intake, energy homeostasis, balance of the sleep-wake cycle and regulation of mood-related behaviors [10, 16, 19, 24, 25, 30].

It was reported that several hypothalamic signaling molecules are of particular interest given their relationship to human neuropsychiatric disorders. Actually, the importance to understand the anatomical organization of the hypothalamic projections to several brain areas is highlighted by the dysregulation of one or more of these neuroactive substances in neuropsychiatric disorders such as depression, and MCH is one of these neuroactive substances [15]. Understanding how MCHergic neurons projects toward DRN requires a description at the circuit and cellular level. In accordance to previous reports [8, 33], in the present study we provide additional information about the organization of the MCH

system in the DRN, a special region implicated in the pathophysiology of depression [21]. Although the pathophysiology of depression has been dominated by the monoamine hypothesis, which postulates that depression is caused by a deficiency or imbalance in monoamine neurotransmission, especially 5-HTergic; it was proposed that other factors beyond the monoamine impairment are implicated in the development of major depression [18]. The present and previous results of our group [16, 31] suggest that MCH has a relevant role in the pathophysiology of depression involving failures in the hypothalamic modulation of the serotonergic neurotransmission in the DRN.

MCH is primarily considered as an inhibitory neuropeptide [9, 32] and it has been considered that MCH is able to directly alter DRN neuronal activity. This presumption has anatomical basis since our results revealed putative synaptic contacts between MCH fibers and 5-HTergic and GABAergic neurons. 5-HTergic neurons of the DRN receive a prominent GABAergic input from multiple distant sources, although a small number of GABAergic interneurons are present in the DRN [1, 13]. Interestingly, we found that MCH is able to modify 5-HT output in an opposite manner. This response suggests the involvement of 5-HTergic and GABAergic neurons. One hypothetical model is shown in Figure 9. MCH (at a low dose) would directly inhibit 5-HT neurons activity. On the other hand, at a high concentration, MCH could recruit and inhibit GABAergic neurons, removing the inhibitory influence on 5-HT neurons [1, 13] and indirectly increasing the 5-HT neurotransmission. It could be speculated that there would be a more sensitive response of MCH on 5-HTergic neurons than GABAergic neurons because a

different expression of MCH-R1, or because the GABAergic neurons are located in the DRN lateral periphery, and more distant from the cannula. Considering that MCH elicited a stronger effect on 5-HTergic neurons it is possible to think that MCH may mediate depressive-like behavior by decreasing 5-HT output in the DRN. However, future experiments should be performed to clarify this issue.

This report highlights the clinical importance of understanding the pattern of innervations of MCH system and lead to a better understanding the features involved in the anatomical and functioning connectivity of hypothalamic MCHergic system and DRN.

Acknowledgements

This study was supported by Grant Fondo Clemente Estable FCE-1-2011-1-5997 and by PEDECIBA (Uruguay). Jessika Urbanavicius has a postgraduate fellowship from ANII and CAP (UdelaR). We are grateful to Juan Andrés Abin-Carriquiry and Marcela Martínez by technical support.

Statement of conflict of interest: None

References

[1] Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev* 2002; 39:154-180.

[2] Arango V, Underwood MD, Mann JJ. Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide. *Prog Brain Res* 2002;136: 443-453.

[3] Bach-Mizrachi H, Underwood M D, Kassir S A, Bakalian M J, Sibille E, Tamir H, Mann JJ, Arango V. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacol* 2006; 31: 814-24.

[4] Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172 (2):185-97.

[5] Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 1992; 319: 218-245.

[6] Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KÆ, Lapierre JL, Siegel JM. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun* 2013; 4:1547-1555.

[7] Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA, Beck SG. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacol* 2011; 61:524-43.

[8] Chometton S, Cvetkovic-Lopes V, Houdayer C, Franchi G, Mariot A, Poncet F, Fellmann D, Risold PY. Anatomical organization of MCH connections with the pallidum and dorsal striatum in the rat. *Front Syst Neurosci* 2014; 8:185-.

[9] Devera A, Pascovich C, Lagos P, Falconi A, Sampogna S, Chase MH, Torterolo P. Melanin-concentrating hormone modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res.* 2014.

[10] Forray C. The MCH receptor family: feeding brain disorders? *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3 (1): 85-99.

[11] Garcia-Fuster MJ, Parks GS, Clinton SM, Watson SJ, Akil H and Civelli O. The melanin-concentrating hormone (MCH) system in an animal model of depression-like behavior. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012; 22 (8): 607-13.

[12] Gardner KL, Thiruvikraman KV, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA. Early life experience alter behavior during social defeat: focus on serotonergic system. *Neurosc* 2005; 136: 181-191.

[13] Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 2000; 20(11):4217-25.

[14] Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72: 165-229.

[15] Krolewski DM, Medina A, Kerman IA, Bernard R, Burke S, et al. Expression Patterns of Corticotropin-Releasing Factor, Arginine Vasopressin, Histidine Decarboxylase, Melanin-Concentrating Hormone, and Orexin Genes in the Human Hypothalamus. *J Comp Neurol* 2010; 518(22): 4591-4611.

[16] Lagos P, Urbanavicius J, Scorza C, Miraballes R and Torterolo P. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav Brain Res* 2011; 218: 259-266.

[17] Lowry CA, Evans AK, Gasser PJ, Hale MW, Staub DR, Shekhar A. Topographical organization and chemoarchitecture of the dorsal raphe nucleus and

the medial raphe nucleus. In Monti JM et al. (Eds), Serotonin and Sleep: molecular, functional and clinical aspects. Birkhauser Verlag, Switzerland. 25-68, 2008.

[18] Massart R, Mongeau R, Lanfumey L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; 367(1601): 2485-94.

[19] Monti JM, Torterolo P, Lagos P. Melanin-concentrating hormone control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev.* 2013; 17(4):293-8.

[20] Nahon JL. The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C R Biol* 2006; 329 (8): 623-38..

[21] Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002; 34: 13-25.

[22] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed. Academic Press, Sydney, (2005).

[23] Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pellemounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-

concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996; 380 (6571): 243-7.

[24] Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 435(1):26-40.

[25] Saito Y, Nagasaki H. The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. *Results Probl Cell Differ* 2008; 46:159-79.

[26] Shimazaki T, Yoshimizu T, Chaki S. Melanin-concentrating hormone MCH1 receptor antagonists: a potential new approach to the treatment of depression and anxiety disorders. *CNS Drugs* 2006; 20 (10): 801-11.

[27] Spaethling JM, Piel D, Dueck H, Buckley PT, Morris JF, Fisher SA, Lee J, Sul J, Kim J, Bartfai T, Beck SG, Eberwine JH. Serotonergic neuron regulation informed by in vivo single-cell transcriptomics. *FASEB Journal*. 28: 771-780. 2014.

[28] Spiacci A Jr., Coimbra NC, Zangrossi H Jr. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors. *Neurosc* 2012; 227: 350-360.

[29] Stamp JA, Semba K. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Res* 1995; 677:39-49.

[30] Torterolo P, Lagos P, Monti JM. Melanin-concentrating hormone: a new sleep factor? *Frontiers in Neurology* 2011; 2 (14): 1-12.

[31] Urbanavicius J, Lagos P, Torterolo P, Scorza C. Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors, and reversion by nortriptyline. *Behav Pharmacol* 2014; 25(4):316-24.

[32] van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron* 2004; 42(4):635-52.

[33] Yoon YS, Lee HS. Projections from melanin-concentrating hormone (MCH) neurons to the dorsal raphe or the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* 2013; 1490: 72-82.

Figure 1

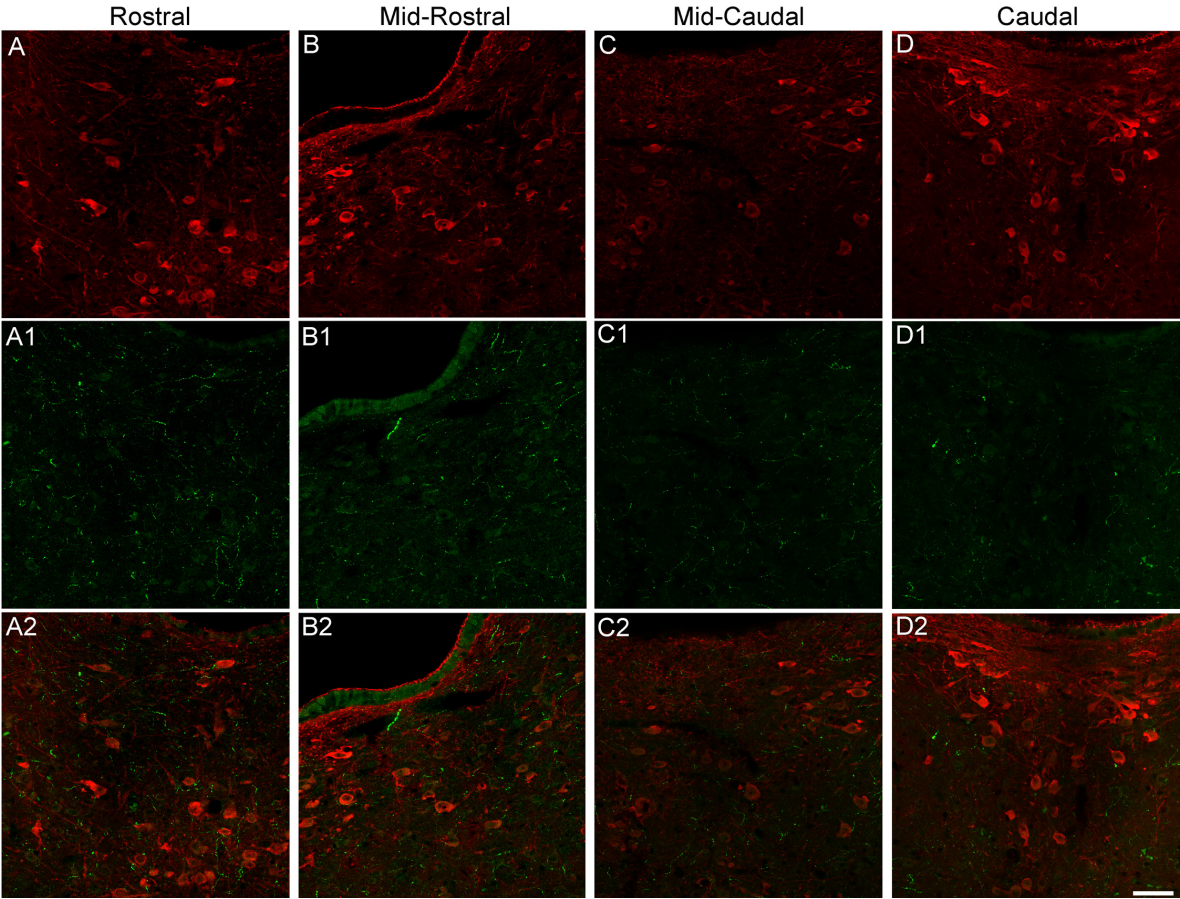


Figure 2

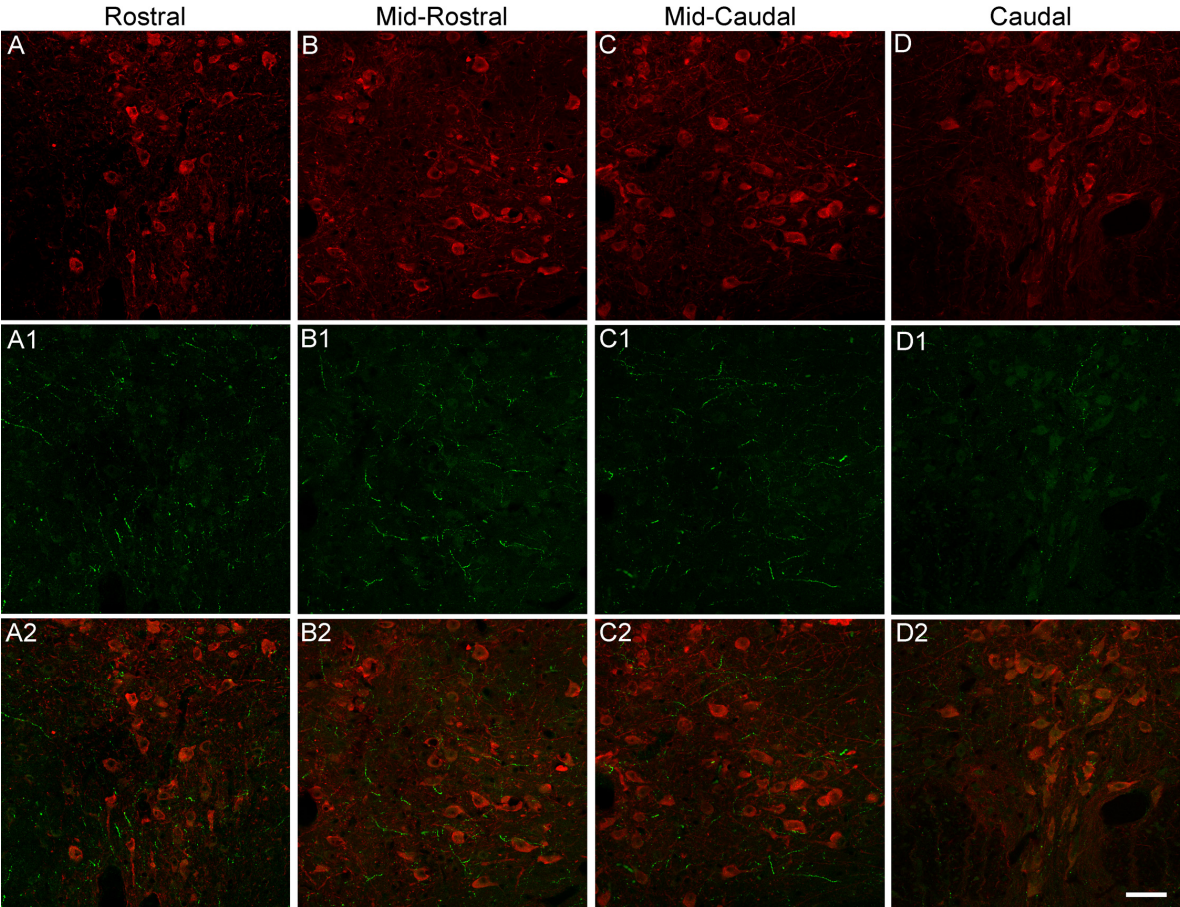


Figure 3

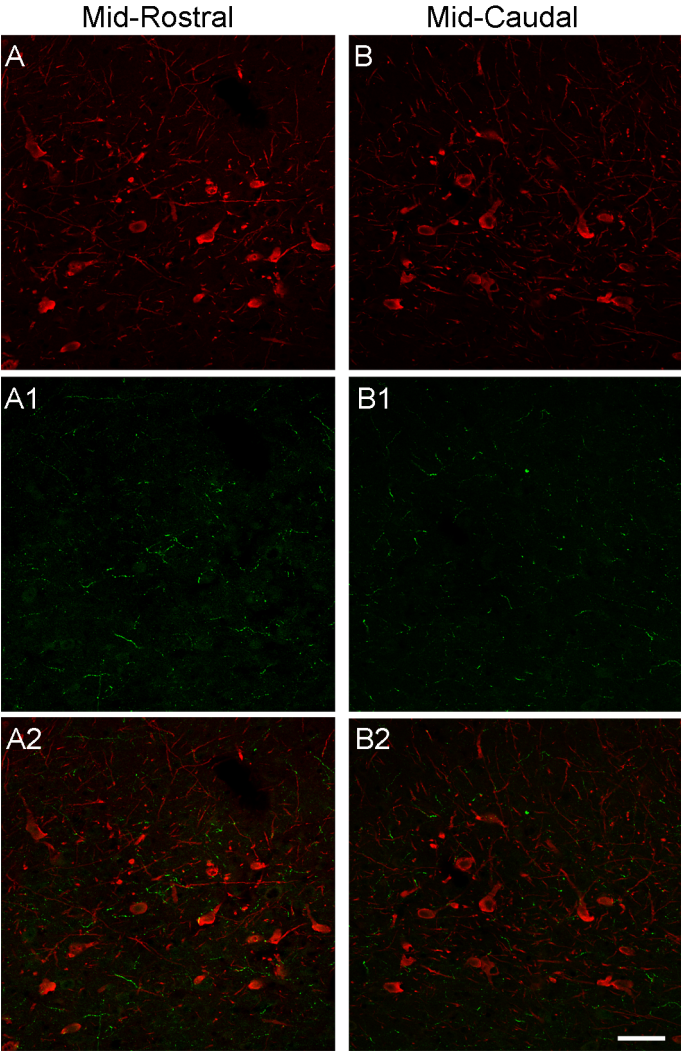


Figura 4

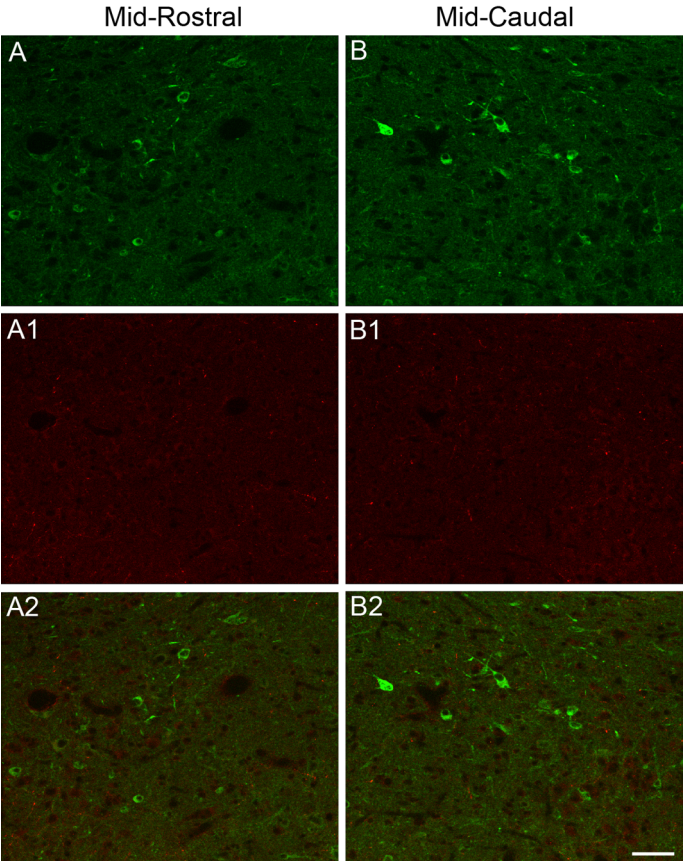


Figure 5

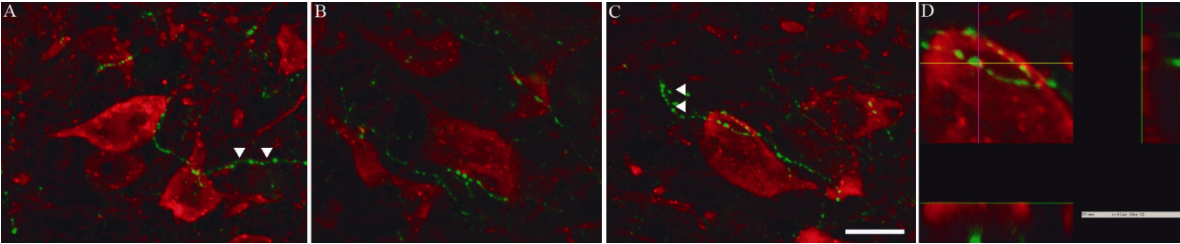


Figure 6

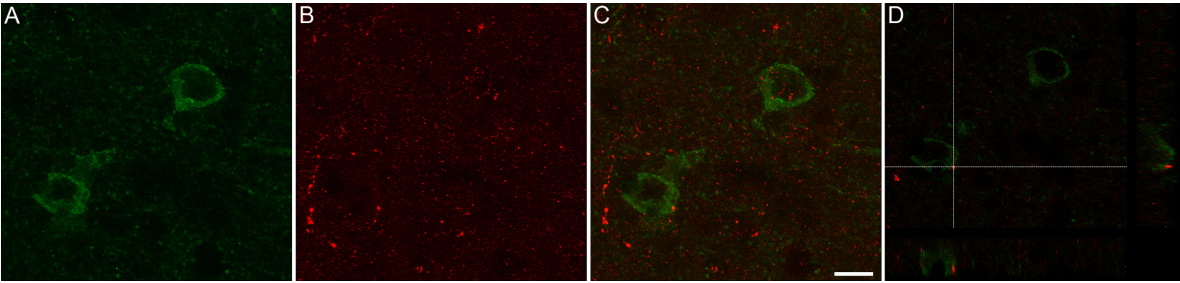


Figure 7

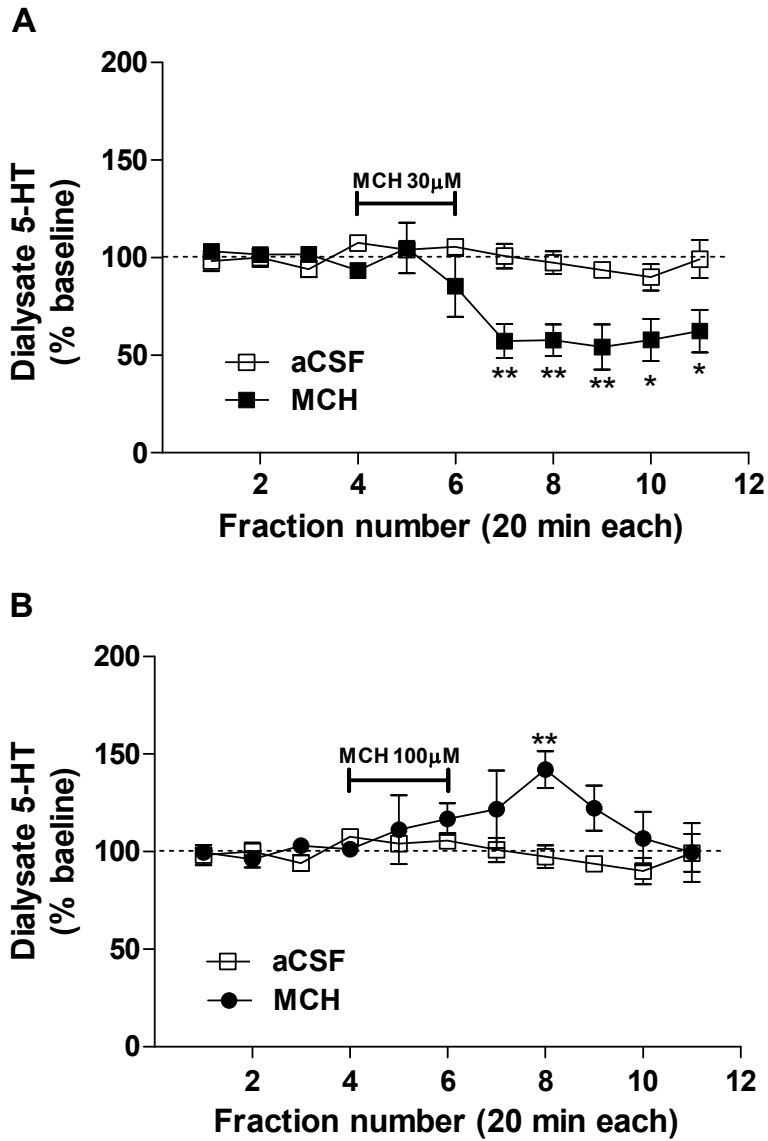


Figure 8

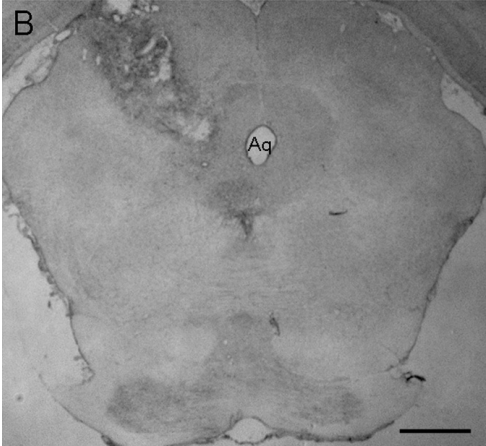
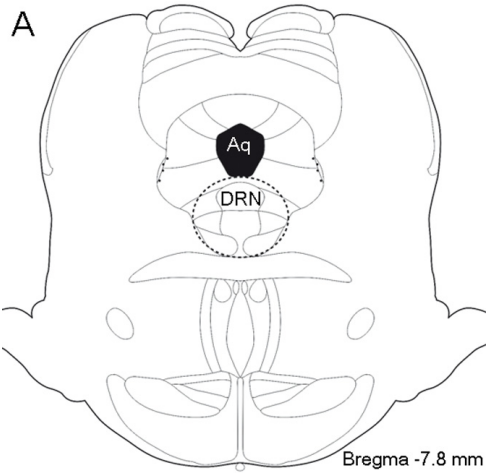


Figure legends

Figure 1. Images of dual-immunostaining for 5-HT and MCH in the dorsal section of the DRN. Coronal sections (30 μm thick) were double labeled to visualize 5-HT- (red) and MCH-immunoreactivity (green). Sections are shown at four different levels in the rostro-caudal axis of the DRN (left to right) based on the distribution of the 5-HT+ neurons: (A) rostral, (B) mid-rostral, (C) mid-caudal and (D) caudal and according to Paxinos and Watson atlas (2005). MCH+ fibers were distributed throughout the DRN (A1-D1) and appeared intermingled with 5-HT+ neurons (A2-D2). Scale bars = 50 μm .

Figure 2. Images of dual-immunostaining for 5-HT and MCH in the ventral section of the DRN. Coronal sections (30 μm thick) were double labeled to visualize 5-HT- (red) and MCH-immunoreactivity (green). Sections are shown at four different levels in the rostro-caudal axis of the DRN (left to right) based on 5-HT+ neurons distribution: (A) rostral, (B) mid-rostral, (C) mid-caudal and (D) caudal DRN and according to Paxinos and Watson atlas (2005). MCH+ fibers were distributed throughout the DRN (A1-D1) and intermingled with 5-HT+ neurons (A2-D2). Scale bars = 50 μm .

Figure 3. Images of dual-immunostaining for 5-HT and MCH in the lateral wings section of the DRN. Coronal sections (30 μm thick) were double labeled to visualize 5-HT- (red) and MCH-immunoreactivity (green). 5-HT+ neurons are

shown in the lateral wings section at two different levels (A) mid-rostral and (B) mid-caudal according to Paxinos and Watson atlas (2005). MCH+ fibers could be observed at both levels (A1 and B1) and intermingled with 5-HT+ neurons (A2 and B2). Scale bars = 50 μm .

Figure 4. Images of dual-immunostaining for GAD-67 and MCH in the lateral wings section of the DRN. Coronal sections (30 μm thick) were double labeled to visualize GAD-67- (green) and MCH-immunoreactivity (red) in pre-treated animals with an i.c.v. microinjection of colchicine. GAD-67+ neurons (i.e. GABA+ neurons) are shown in the lateral wings section at two different levels (A) mid-rostral and (B) mid-caudal DRN according to Paxinos and Watson atlas (2005). MCH+ fibers could be observed at both levels (A1 and B1) and intermingled with GABA+ neurons (A2 and B2). Scale bars = 50 μm .

Figure 5. Images of dual-immunostaining for 5-HT and MCH at the mid-rostral and caudal DRN. At higher magnification (60X), MCH+ fibers (green) could be observed as small beaded processes (arrows head) around the 5-HT+ neurons (red) approaching the soma and dendrites of 5-HT+ neurons. Orthogonal views (xz and yz) show apposition between MCH+ fibers and 5-HTergic soma (D). Images are comprised of 16 optical sections of 0.5 μm thickness. Scale bars = 10 μm .

Figure 6. Images of dual-immunostaining for GAD-67 and MCH in the lateral wings section of the DRN. Coronal sections (30 μm thick) were double labeled to

visualize GAD-67- (green, A) and MCH- immunoreactivity (red, B). GAD-67+ neurons (i.e. GABA+ neurons) are shown in the lateral wings section at the mid-rostral level according to Paxinos and Watson atlas (2005). At higher magnifications, MCH+ fibers could be observed around the GAD-67+ neurons (C). Orthogonal views (xz and yz) show apposition between MCH+ fibers and GAD-67+ neurons (D). Images are comprised of 20 optical sections of 0.5 μm thickness. Scale bars = 10 μm .

Figure 7. Effect of MCH on the 5-HT extracellular levels in the DRN. MCH was perfused by reverse dialysis into the DRN at 30 μM (closed squares, A) and 100 μM (closed circles, B) during 40 min (horizontal bars in A and B). The control group (open squares, A and B) was perfused with aCSF-citalopram 1 μm . MCH induced an opposite effect on the 5-HT extracellular levels. Mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni test. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ vs aCSF. N= 4-5 per group. aCSF= artificial cerebrospinal fluid; MCH= melanin-concentrating hormone; 5-HT=serotonin.

Figure 8. Localization of microdialysis cannula into the DRN. (A) Diagram taken from Paxinos and Watson atlas (2005) indicating the DRN location (dotted circle). (B) Photomicrograph exhibiting cannula placement in the DRN at approximately Bregma -7.8 mm. The coronal sections were stained with Nissl's method. Scale bar = 1 mm. Aq= cerebral aqueduct; DRN= dorsal raphe nucleus.