

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 054 324**

21 Número de solicitud: 202430590

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.07.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.02.2026

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100,00%)

Avenida Cervantes, 2

29071 Málaga (Málaga) ES

72 Inventor/es:

FLORES BURGESS, Antonio;

MILLÓN PEÑUELA, Carmelo;

CANTERO GARCÍA, Noelia;

PINEDA GÓMEZ, Juan Pedro;

FLORES GÓMEZ, Marta y

DÍAZ CABIALE, Zaida

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54 Título: **Galanina (1-15) y Fluoxetina en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento**

57 Resumen:

Galanina (1-15) y Fluoxetina en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento.

GAL(1-15) en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina, preferentemente fluoxetina, para su uso en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento y composición que los comprende.

ES 3 054 324 A1

DESCRIPCIÓN

Galanina (1-15) y Fluoxetina en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se encuadra dentro del sector farmacéutico y va destinada al área del
5 tratamiento de trastornos psiquiátricos. Concretamente, se centra en el uso combinado de Galanina (1-15) e inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, como la Fluoxetina en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento (TRD).

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El trastorno depresivo mayor (TDM) es el trastorno psiquiátrico más prevalente y la principal
10 causa de suicidio en todo el mundo y según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, en 2030 se convertirá en la principal causa de incapacidad. Además, tras la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) se han estimado en unos 53,2 millones los casos adicionales de TDM a nivel mundial.

El TDM se caracteriza por desesperanza, anhedonia, culpa exacerbada y síntomas físicos
15 dolorosos, que a menudo conducen a tendencias suicidas. Los medicamentos para el TDM ajustan principalmente la neurotransmisión de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) y norepinefrina. La elección inicial más común son los antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de la 5-HT (ISRS) debido a su gran eficacia, tolerabilidad y adherencia al tratamiento. Sin embargo, el 50% de los pacientes no responden a dos o más fármacos o
20 tratamientos psicoterapéuticos, lo que se conoce como depresión resistente al tratamiento o depresión refractaria al tratamiento (TRD). Así pues, es imperativo encontrar soluciones innovadoras para proporcionar un alivio eficaz, más rápido y prolongado de los síntomas depresivos en los pacientes con TRD.

En este contexto, ciertos miembros de la familia de neuropéptidos de la galanina (GAL)
25 están implicados en el desarrollo de la depresión, lo que ofrece una prometedora oportunidad de mejorar la eficacia de los antidepresivos combinándolos con estos neuropéptidos. GAL interviene en diversos procesos fisiológicos y enfermedades en modelos animales, entre ellos la regulación del estado de ánimo y la depresión, a través de sus tres receptores GAL (GALR). La activación de GALR1 y GALR3 está relacionada con
30 comportamientos depresivos, mientras que la estimulación de GALR2 tiene efectos antidepresivos. El uso crónico del ISRS Fluoxetina (FLX) y el tratamiento electroconvulsivo

aumentan los niveles de ARNm GAL en el rafe dorsal (RD) de ratas. El RD es la principal fuente de inervación serotoninérgica del cerebro anterior y está relacionado con la modulación de la red neuronal implicada en la ansiedad. Este aumento va acompañado de un aumento de los sitios de unión de los receptores GALR2 en este núcleo monoaminérgico, mientras
5 que los sitios de unión de los receptores GALR1 no se ven afectados.

El fragmento N-terminal GAL(1-15) presenta una actividad biológica diferencial respecto del péptido completo modulando el estado de ánimo en modelos animales; GAL(1-15) actuando a través de complejos heterorreceptores GALR1-GALR2, especialmente en el hipocampo dorsal y RD induce efectos prodepresivo y ansiogénicos en modelos animales.
10 Curiosamente, GAL(1-15) potenció los efectos antidepresivos inducidos por el agonista de 5-HT_{1A}R (5-hidroxitriptamina, 5-HT un subtipo de receptor 5-HT que se une a los neurotransmisores de serotonina endógenos), la 8-OH-DPAT ($\pm$ -8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina), en la prueba de natación forzada (FST) [1], efecto que fue significativamente mayor que el inducido por GAL. El mecanismo de esta acción implicaba
15 alteraciones en las características de unión y en los niveles de ARNm del 5-HT_{1A}R en el hipocampo dorsal y en el RD.

En estudios posteriores con ratas, se observó como GAL(1-15) potencia los efectos antidepresivos e invierte el deterioro de la memoria inducido por FLX [2] estando implicado el 5-HT_{1A}R en el hipocampo y el córtex prefrontal (PFC), respectivamente

20 En base a estos hallazgos se ha propuesto el uso de GAL(1-15) como tratamiento combinado con ISRS contra TDM, entre otros trastornos relacionados con los niveles de serotonina extracelular [ES2659092]. Se observaron modificaciones en el comportamiento de ratas a las que se les administró GAL(1-15) y FLX respecto a aquellas a las que únicamente se les había administrado el ISRS FLX.

25 La interacción entre GAL(1-15) y FLX se ha investigado también en un modelo de depresión utilizando ratas con bulbectomía olfatoria (OBX) [3]. GAL(1-15) refuerza el impacto antidepresivo de FLX en las pruebas de desesperación y anhedonia. Este proceso depende del 5-HT_{1A}R en el hipocampo a nivel de la membrana plasmática y transcripcional. GAL(1-15) también potencia el impacto de Escitalopram en las pruebas de comportamiento
30 depresivo en ratas OBX, lo que implica la activación de 5-HT_{1A}R. Este efecto se inhibe cuando se induce la regulación a la baja del 5-HT_{1A}R utilizando siARN (ARN de silenciamiento) [4]. Dos redes están implicadas en el efecto de GAL(1-15) en la actividad del Escitalopram: una involucra la habénula lateral (LHb) y medial (mHb), el rafe dorsal (RD) y el

área tegmental ventral (ATV), y la otra incluye el giro dentado (GD) y el córtex prefrontal (PFC).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención estudia los efectos de la coadministración de GAL(1-15) y FLX en el
5 tratamiento de la TRD. Para ello, se ha seleccionado el modelo de rata Wistar-Kyoto (WKY), que es genéticamente similar a la depresión endógena [5]. Esta cepa cumple los criterios de modelo de depresión y refleja las irregularidades de los sistemas de monoaminas, glutamato y GABA, así como la desregulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) observada en pacientes con TDM. Los antidepresivos estándar, especialmente los ISRS, no provocan
10 respuestas en estas ratas WKY, lo que las convierte en un modelo de TRD.

Para evaluar el impacto de la administración combinada de GAL(1-15) y FLX en el comportamiento de ratas WKY, se llevaron a cabo pruebas que miden la desesperación (FST y TST). La efectividad del tratamiento con GAL(1-15) + FLX se revela particularmente en estas pruebas de comportamiento de desesperación.

15 También se exploró la implicación de GALR2 utilizando el antagonista M871 (un antagonista peptídico que reconoce selectivamente el receptor de galanina de tipo 2) y un modelo *in vivo* con siARN 5-HT1A *knockdown*. Los resultados indican la posible implicación de GALR2, como demuestra el hecho de que M871 bloquea las acciones de GAL(1-15) en el FST, y destacan el papel de 5HT1AR en la interacción entre GAL(1-15) y FLX, como demuestra la
20 regulación a la baja de 5-HT1AR, inducida por siARN, que bloqueó la potenciación de los efectos antidepresivos de GAL(1-15) + FLX observados en ratas WKY

Se exploró si los efectos de GAL(1-15) sobre FLX estaban relacionados con 5-HT1AR, analizando la unión de 5-HT1AR en regiones cerebrales (RD, GD, área CA1 del hipocampo, hipocampo ventral y córtex prefrontal medio - CPFm) de ratas WKY tratadas con GAL(1-
25 15)+FLX.

Utilizando el Análisis de Componentes Principales (ACP), se evaluó la relación entre los resultados del test FST (inmovilidad, natación) y los datos Kd/Bmax obtenidos de las autorradiografías con el radioligando agonista de 5-HT1AR, [³H]-8-OHDPAT.

Se midieron los niveles de expresión de ARNm de los receptores de glucocorticoides (GR) y
30 mineralocorticoides (MR), 5-HT1AR, GALR1 y GALR2, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y Receptor de tropomiosina quinasa B TrkB) en las ratas WKY tratadas con GAL(1-15)+FLX en diferentes regiones cerebrales de interés.

Los datos obtenidos revelan que GAL(1-15) potencia los efectos antidepresivos de FLX en animales WKY, ofreciendo un tratamiento efectivo para TRD. Los resultados indican un potente efecto de la combinación GAL(1-15) con ISRS en la reversión de la resistencia de la cepa WKY depresiva a los antidepresivos convencionales. Estos resultados
5 respaldan el uso de GAL(1-15) en combinación con ISRS como una estrategia novedosa para el tratamiento del TRD.

Por tanto, un **primer aspecto de la invención** describe el compuesto GAL(1-15), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con al menos un inhibidor de la recaptación de serotonina para su uso en el tratamiento de la depresión resistente al
10 tratamiento o depresión refractaria al tratamiento (TRD).

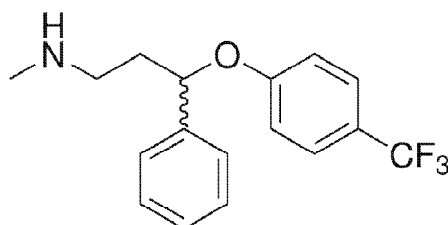
En la presente memoria se define GAL(1-15) como el compuesto con la fórmula general **(SEQ ID NO: 1):** Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala o GWTLNSAGYLLGPHA.

Para su uso en terapia, el GAL(1-15) o sus sales, pueden estar en una forma
15 sustancialmente pura o farmacéuticamente aceptable, es decir, con un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable y excluyendo los aditivos farmacéuticos habituales, como diluyentes y vehículos, y sin incluir materiales considerados tóxicos a los niveles de dosificación habituales. Los niveles de pureza del principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y aún más preferiblemente
20 superiores al 90%. En una realización preferida, los niveles son superiores al 95% en GAL(1-15) o sus sales.

El término "inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina" (ISRS) significa un inhibidor de los transportadores de monoamina que tiene un efecto inhibitor más fuerte en el transportador de serotonina que los transportadores de dopamina y noradrenalina. Se han
25 descrito en la literatura muchos antidepresivos con efecto inhibitor de la recaptación de serotonina. La presente invención describe la combinación de el GAL(1-15) o sus sales con al menos un inhibidor de la recaptación de serotonina, pudiendo haber 1, 2, 3 o más un inhibidores de la recaptación de serotonina involucrados. Cualquier compuesto farmacológicamente activo que principalmente o parcialmente ejerza su efecto terapéutico a
30 través de la inhibición de la recaptación de serotonina en el sistema nervioso central (SNC), puede beneficiarse del efecto combinado con GAL (1-15). Inhibidores de la recaptación de serotonina que pueden beneficiarse de la potenciación con GAL (1-15) serían: FLX, R-FLX, citalopram, escitalopram, sertralina, paroxetina, fluvoxamina, venlafaxina, duloxetina,

dapoxetina, nefazodona, imipramina, imipramina N-óxido, desipramina, pirandamina, dazepinil, nefopam, befuralina, fezolamina, femoxetina, clomipramina, cianoimipramina, litoxetina, Cericlamina, seproxetina, WY 27587, WY 27866, imeldina, ifoxetina, tiflucarbina, 5 viqualina, milnacipran, bazinaprina, YM 922, S 33005, F 98214-TA, OPC 14523, alaproclato, 5 cianodotepina, trimipramina, quinupramina, dotiequina, amoxapina, nitroxazepina, McN 5652, McN 5707, O1 77, Org 6582, Org 6997, Org 6906, amitriptilina, amitriptilina N-óxido, nortriptilina, CL 255.663, pirlindole, indatralina, LY 113.821, LY 214.281, CGP 6085 A, RU 25.591, napamezol, diclofensina, trazodona, EMD 68.843, BMY 42.569, NS 2389, sercloremina, nitroquipazina, ademetonina, sibutramina y clovoxamina. Los compuestos 10 mencionados anteriormente se pueden usar en forma básica o de una sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable de la misma. La lista anterior de inhibidores de la recaptación de serotonina y otros compuestos, que causan un aumento en el nivel extracelular de serotonina, no puede ser interpretada como limitante.

El inhibidor de la recaptación de serotonina particularmente preferido de acuerdo con la 15 presente invención es la fluoxetina. (FLX), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En la presente memoria se define fluoxetina o FLX como el compuesto de denominación IUPAC (RS)-N-Metil-3-fenil-3-(4-trifluorometilfenoxi)propilamina, con número CAS 54910-89-3 y con la siguiente fórmula general:



20

Formula I

Preferiblemente, la FLX se encuentra en forma de clorhidrato de fluoxetina.

GAL(1-15), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, así como los inhibidores de la recaptación de serotonina, especialmente FLX, preferiblemente en forma de clorhidrato de fluoxetina, son también denominados como "compuestos activos" o "ingredientes activos" de 25 la invención. Tal como se utiliza en esta invención, el término "compuestos activo" significa cualquier componente que proporcione potencialmente un efecto farmacológico u otro tipo de efecto en el diagnóstico, cura, paliación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo humano o del cuerpo de otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la fabricación

del medicamento y están presentes en él en una forma modificada y prevista para proporcionar una actividad o efecto específico.

Se entiende por "uso combinado" la administración de los ingredientes activos de forma asociada entre sí pero no necesariamente de forma simultánea. GAL (1-15) o sus sales farmacéuticamente aceptables y el inhibidor de la recaptación de serotonina, en concreto FLX, pueden administrarse simultáneamente como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los ingredientes activos pueden ser administrados secuencialmente, por ejemplo en dos formas de dosificación unitaria individuales. GAL (1-15) o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser administrada antes, durante o después de la administración del inhibidor de la recaptación de serotonina, preferiblemente después de la administración del inhibidor de la recaptación de serotonina, siempre que el tiempo entre la administración de GAL (1-15) o sus sales farmacéuticamente aceptables y la administración del inhibidor de la recaptación de serotonina es tal que se permite que los ingredientes actúen sinérgicamente en el SNC.

El término "tratamiento", tal como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad de las moléculas de la invención en su uso combinado o de la composición farmacéutica de la invención, para evitar, disminuir o eliminar por completo los efectos en el comportamiento del paciente causados por o derivados de la TRD.

Tal y como se ha definido previamente, depresión resistente al tratamiento, depresión refractaria al tratamiento o TRD, es aquella en la que el paciente no responde a dos o más fármacos o tratamientos psicoterapéuticos.

Un **segundo aspecto** de la invención refiere a una composición que comprende GAL(1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con al menos un inhibidor de la recaptación de serotonina para su uso en el tratamiento de la TRD.

Preferiblemente, el inhibidor de la recaptación de serotonina es la fluoxetina. (FLX), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y más preferiblemente, se encuentra en forma de clorhidrato de fluoxetina. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición comprende 2, 3 o más un inhibidores de la recaptación de serotonina de forma simultánea. Preferiblemente, al menos uno de ellos es FLX.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición de la invención es una composición farmacéutica. Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "composición farmacéutica" se refiere a cualquier sustancia utilizada para el diagnóstico,

prevención, alivio, tratamiento o curación de una enfermedad en un ser humano o en animales. La composición farmacéutica puede incluir una composición única o composiciones separadas. La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas, preferiblemente, que
5 comprenda otro compuesto útil en el tratamiento de la TRD, en cuyo caso, también puede incluir una composición única o composiciones separadas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que ayuda a
10 la absorción de la composición farmacéutica que comprende la composición de la invención, estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda en la fabricación de la misma en el sentido de darle consistencia, forma, sabor o cualquier otra característica funcional específica. Así, los excipientes podrían tener la función de mantener unidos los ingredientes, como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función
15 colorante, una función protectora, como por ejemplo aislarla del aire y/o de la humedad, una función de relleno para un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de formulación, como por ejemplo fosfato cálcico dibásico, una función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

20 Un "soporte farmacéuticamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") se refiere a cualquier sustancia, o combinación de sustancias, conocida en el sector farmacéutico, utilizada en la fabricación de formas farmacéuticas de administración e incluye, entre otros, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El portador puede ser una sustancia inerte o tener una acción similar a cualquiera de los compuestos de la presente invención, teniendo
25 la función de facilitar la incorporación del fármaco, así como de otros compuestos, permitiendo una mejor dosificación y administración o proporcionando consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma farmacéutica es líquida, el portador es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere al hecho de que el compuesto al que se refiere está permitido y evaluado para que no cause daño a los
30 organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse a través de cualquier vía de administración, y como tal, dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Así, la composición farmacéutica de la

invención puede administrarse por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal, intravenosa o intraperitoneal. Preferiblemente, se administra por vía oral.

La composición de la invención puede incluir una cantidad eficaz de GAL(1-15) y FLX. El término "cantidad eficaz" utilizado en el presente documento se refiere a una cantidad
5 suficiente para tratar de forma efectiva la TRD. La cantidad eficaz puede seleccionarse adecuadamente por un experto en la materia en función del individuo seleccionado y pueden intervenir factores como la edad, las condiciones de salud, la duración de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y otros, incluido el uso de un fármaco en combinación con la composición farmacéutica o al mismo tiempo que ésta, y otros factores
10 conocidos en el campo de la medicina. La terapia se considera "personalizada" cuando el compuesto que se administra al individuo para tratar una enfermedad está especialmente adaptado a las características tanto genotípicas como fenotípicas del individuo que va a ser tratado, evitando así la pérdida de tiempo con terapias no efectivas.

Un **último aspecto** de la invención, refiere a un kit que comprende GAL(1-15) o una sal
15 farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con al menos un inhibidor de la recaptación de serotonina, preferiblemente FLX, o las composiciones según se han descrito en la presente memoria para su uso en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento. Preferiblemente, el kit está adaptado para la administración simultánea o secuencial de los compuestos activos.

20 El término "paciente", "individuo" o "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores como ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden
30 excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o podrán conocerse mediante la práctica de la invención. Los

siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Esquema del programa experimental. Tras la canulación cerebral, todos los animales tuvieron un periodo de recuperación antes de realizar las pruebas conductuales. **A)** Se evaluaron los efectos de diferentes tratamientos farmacológicos en la prueba de natación forzada (FST) en diferentes grupos de ratas WKY. Una semana después de las pruebas conductuales, se realizaron los experimentos de autorradiografía. También se utilizaron animales WKY *knockdown* 5-HT1AR para evaluar los tratamientos farmacológicos en el FST. **B)** En otros grupos de animales, se evaluaron los efectos de diferentes tratamientos farmacológicos en la prueba de suspensión de la cola (TST). Una hora después del TST, se recogieron muestras de sangre y cerebro de los animales para realizar los experimentos qPCR-rt y determinar los niveles de corticosterona en sangre.

Figura 2: Efectos conductuales de la coadministración de FLX(10mg/kg) solo o en combinación con GAL(1-15)(1nmol) o GAL(1-15)+M871 (3nmol) en el test FST **A)** tiempo de inmovilidad y **B)** tiempo de natación en el FST. Se administró FLX 23, 5 y 1h antes de las pruebas, y se inyectó GAL(1-15) o GAL(1-15)+M871 15 min antes de las pruebas. Las barras verticales representan la media $\pm$ DS (n=11-6). *p< 0,05 frente al resto de los grupos, # p< 0,05 frente a los grupos Control y FLX(10mg/kg)+GAL(1-15)(1nmol)+M871(3nmol); a p<0,05 frente a los grupos FLX(10mg/kg) y FLX(10mg/kg)+GAL(1-15)(1nmol) **C)** Efectos conductuales de la coadministración de FLX(10mg/kg) solo o en combinación con GAL(1-15)(1nmol) en el tiempo de inmovilidad en el TST. & p<0,01 frente al grupo FLX(10mg/kg) según ANOVA unidireccional seguido de la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher.

Figura 3: **A)** Inmunorreactividad de 5-HT1AR en el rafe dorsal de ratas WKY inyectadas ICV14 días después con una dosis única de si5HT1A (rojo) o vehiculizada. Las barras verticales representan la media $\pm$ DS. *** p< 0,05 frente al grupo WKY según la prueba t de student. **B)** Microfotografías representativas de inmunofluorescencia 5HT1AR en secciones de tejido del rafe dorsal. Barra de escala 100 μ m.

Figura 4: **(A)** Análisis de componentes principales de los parámetros FST y del Kd del experimento autorradiográfico. **(B)** Puntuación factorial de los sujetos en el componente 1: ANOVA de 1 vía, $F_{2,15} = 6,532$, $P = 0,0091$. **(C)** Puntuación factorial de los sujetos en el componente 2: ANOVA de 1 vía, $F_{2,15} = 11,85$, $P = 0,0008$. **(D)** Puntuación factorial de los

sujetos en el componente 3: ANOVA de 1 vía, $F_{2,15} = 3,411$, $P = 0,061$. Los datos representan la media de la puntuación factorial de los sujetos en cada uno de los componentes $\pm$ DS en los grupos Control, FLX(10mg/Kg) y FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) ($n=6$). $*p<0,05$ frente a todos los demás grupos según el ANOVA unidireccional
5 seguido de la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.

Figura 5: Dimensiones generales extraídas de los parámetros FST y el Bmax del experimento autorradiográfico. **(A)** El PCA reveló dos componentes independientes indicativos de los valores Bmax en el PFC, el rafe dorsal (RD), el hipocampo ventral (vHip), y el giro dentado (GD) y CA1 del hipocampo dorsal (C4, varianza explicada $\sim 44,4\%$) y el
10 rendimiento FST (C5, varianza explicada $\sim 25,6\%$). **(B, C)** Los datos representan la media de la puntuación factorial de los sujetos en cada uno de los componentes $\pm$ DS en los grupos Control, FLX(10mg/Kg) y FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol) ($n=6$). $***p<0,001$ frente al grupo de control, $\#p<0,05$ frente al grupo FLX(10mg/Kg) según ANOVA unidireccional seguido de la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher.

15 **Figuras 6:** Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/ml) tras la administración de FLX(10mg/Kg) solo o en combinación con GAL(1-15)(1nmol) en ratas WKY. Se administró FLX sc 23, 5 y 1h antes de realizar el TST, y se inyectó aCSF o GAL(1-15) ICV 15 min antes. La extracción de sangre se realizó 1 h después de la prueba. Las barras verticales representan la media $\pm$ DS ($n=7-6$ ratas por grupo). $*p<0,05$ frente al resto de grupos según
20 ANOVA unidireccional seguido de la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Animales

Ratas macho Wistar Kyoto (WKY) y Wistar (CRIFFA, Barcelona, España) fueron alojadas individualmente bajo condiciones estándar de laboratorio (ciclo de 12h oscuridad/luz,
25 humedad 55%-60% y temperatura $22\pm 2^\circ\text{C}$) con libre acceso a comida y agua. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética Animal de la Universidad de Málaga, España.

Cirugía estereotáxica

Los animales fueron implantados con una cánula fija mediante cirugía estereotáxica antes
30 de realizar los procedimientos experimentales.

Siguiendo el protocolo descrito previamente [6], las ratas fueron anestesiadas con Isoflurano 5% (ISOFLOR® ZOETIS ABOTT Anestésico gaseoso líquido, 100% Isoflurano) en una cámara de inducción y se mantuvieron con una máscara de 1,5-2,5% de Isoflurano colocadas en un instrumento estereotáxico. En todos los animales se implantó una cánula guía de acero inoxidable en el ventrículo cerebral lateral derecho (+1,4 mm lateral, -1 mm posterior al bregma y 3,6 mm por debajo de la superficie del cráneo). Tras la cirugía, los animales fueron alojados individualmente y tuvieron un periodo de recuperación de 7 días, tras el cual fueron asignados aleatoriamente a diferentes grupos experimentales para las pruebas conductuales. El tamaño de la muestra se estimó en base a trabajos previos [1, 4].

10 Para el *knockdown* de 5-HT_{1A}R en ratas WKY inmediatamente después de implantar la cánula guía en la cirugía estereotáxica, las ratas recibieron una inyección intracerebroventricular (ICV) de 5µg (0,35 nmol) del siARN Accell Smart pool siARN 5HT1A (Dharmacon) o cinco µl de vehículo (Accell siARN Delivery Media). En este experimento, los animales tuvieron un periodo de recuperación tras la canulación cerebral de 14 días antes

15 de la prueba conductual, el tiempo necesario para reducir los niveles del receptor 5HT_{1A}, tal y como se ha descrito previamente [7].

Administración de GAL(1-15) y FLX

La administración ICV de GAL(1-15)(1nmol) solo o en combinación con el antagonista de GALR2 M871(3nmol) (TOCRIS, Bristol, Reino Unido) se inyectó 15 minutos antes del inicio

20 de las pruebas conductuales. Ambas preparaciones utilizaron líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF). La inyección ICV se realizó según se ha descrito previamente [6] utilizando la cánula de inyección fijada conectada a una jeringa Hamilton mediante un tubo PE-10; inyectando 5µl durante 1 minuto con especial cuidado, con fluidez y sin desbordamiento. Se supuso que todas las ratas que recibieron las inyecciones ICV tenían una colocación

25 adecuada de la cánula, y no se excluyó ninguna.

Se inyectó clorhidrato de fluoxetina (FLX) (Sigma-Aldrich, San Luis, EEUU) o vehículo tres veces por vía subcutánea (SC) a dosis de 10mg/kg. La solución de FLX se preparó utilizando agua destilada para mejorar la solubilidad en un volumen de 2 ml/kg. Las inyecciones se realizaron 23, 5 y 1 hora antes del comienzo de las pruebas conductuales.

30 Esta pauta de inyección produjo efectos clínicos similares al tratamiento crónico en humanos [8].

Se realizaron dos conjuntos de experimentos resumidos en la **Figura 1**.

Experimento 1 (Fig. 1 A)

En animales WKY, se evaluaron los efectos de la administración de FLX (10mg/kg) solo o en combinación con GAL(1-15) (1nmol) en el test FST. Se inyectó FLX o vehículo en una pauta de administración subcrónica 23, 5 y 1 hora subcutánea (SC) antes del inicio de las pruebas 5 y GAL(1-15) 15 min antes mediante inyección intracerebroventricular (ICV) basada en trabajos previos [4, 9].

Prueba de natación forzada (FST): Los animales se colocaron individualmente en un cilindro vertical de vidrio (50 cm de altura, 20 cm de diámetro) que contenía agua (25°C) hasta una altura de 30 cm. La inmovilidad se definió como flotar pasivamente en posición vertical en el 10 agua con sólo pequeños movimientos necesarios para mantener la cabeza por encima de la superficie del agua. Todas las pruebas se realizaron entre las 13:00 y las 16:00h durante el ciclo de luz [7]. Se registró la duración total del comportamiento de inmovilidad, escalada y natación durante los segundos 5min. La administración de fármacos se realizó entre dos sesiones, una de 15min previa a la prueba seguida 24h después por una prueba de 5min.

15 Prueba de suspensión de la cola (TST): La rata fue colgada boca abajo utilizando cinta adhesiva para fijar su cola a una cuerda a través de un cáncamo a 60 cm. Se consideró que el animal estaba inmóvil cuando no realizaba movimientos o forcejeos, intentos de agarrar la cinta adhesiva, torsiones corporales o sacudidas [7]. Se registró la duración total de la inmovilidad durante los 6 min de prueba.

20 Autorradiografía cuantitativa: Una semana después de la evaluación conductual, se administró a las ratas FLX (10mg/kg) o GAL(1-15) (1nmol) solo o en combinación, y se recogieron sus cerebros 30min después para realizar el experimento autorradiográfico, tal y como se ha descrito previamente [9].

25 Las ratas fueron eutanasiadas por decapitación, y los cerebros fueron rápidamente extraídos y congelados en isopentano a -40°C. Se cortaron secciones coronales (14 µm de grosor) en un criostato a niveles de bregma (hipocampo dorsal: 3,14 mm -3,8 mm), se descongelaron y montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento posterior.

30 Los experimentos de saturación se realizaron utilizando [³H]-8-OH-DPAT (actividad específica: 142 Ci/mmol, Perkin Elmer) en concentraciones que oscilaban entre 0,24 y 10,8 nM, tal y como se ha descrito previamente [3]. En cada experimento de saturación, se prepararon dos grupos de diez secciones para la unión total y la unión inespecífica. La unión

inespecífica se definió como la unión de [3 H]-8-OH-DPAT en presencia de 10^{-5} M de 5-HT (Sigma Aldrich, St. Louis, CA). Las secciones cerebrales se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón Tris-HCl 50mM (pH 7,6), que contenía 4mM CaCl_2 , 0,01% de ácido ascórbico y 10mM de pargilina. A continuación, las secciones se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con [3 H]-8-OH-DPAT en la misma solución anterior. A continuación, las secciones se lavaron dos veces durante 5 minutos en tampón helado y se enjuagaron brevemente en agua destilada helada antes de secarlas bajo una corriente de aire frío. Las secciones secas se expusieron a [3 H]-Kodak Biomax-MR (Sigma Aldrich) durante 6 semanas junto con tiras de plástico de estándares radiomarcados con [3 H]- (Amersham, Reino Unido).

Por otro lado, también se estudió la implicación de **GALR2 y 5HT1AR** en los efectos conductuales de la combinación GAL(1-15)+FLX en el FST en ratas WKY.

Para analizar el papel de **GALR2** se utilizó el M871, en combinación con GAL(1-15) vía ICV para bloquear el efecto de GAL(1-15) sobre la acción mediada por FLX, tal y como se había descrito previamente [3, 4, 9].

Para analizar el papel de **5HT1AR**, se generaron ratas WKY *knockdown* 5HT1AR como se describió previamente [4, 7, 10]. En estos animales *knockdown*, también se probaron los efectos de FLX (10mg/kg) y GAL(1-15) (1nmol) solos o en combinación.

Inmunofluorescencia 5-HT1A: Noventa minutos después de la administración del fármaco, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (Mebumal; 100 mg/kg de peso corporal, i.p.) y se perfundieron intracardialmente con 200ml de solución salina isotónica fría con hielo tamponada con fosfato (PBS) seguida de 200 ml de líquido de fijación con paraformaldehído al 4% (p/v) en tampón PBS 0,1M, (pH 7,4). Se extrajeron los cerebros, se postfijaron en el mismo fijador durante 12 horas y se crioprotegieron en sacarosa al 30% a 4°C. Por último, se obtuvieron secciones del rafe dorsal de 30 μm en un criostato (-20°C). Los procedimientos se llevaron a cabo tal y como se ha descrito previamente [7]. Los anticuerpos primarios dirigidos al anticuerpo policlonal anti-5HT1AR (conejo, AB15350, Sigma-Aldrich, 1/500) se incubaron durante 12h a 4°C y se detectaron con el anticuerpo secundario rojo anti-conejo de cabra DyLight 649 (Jackson immunoResearch Laboratories, 1/100). Las secciones se montaron en portaobjetos con un medio de montaje fluorescente (Dako) y se visualizaron con un microscopio confocal Leica SP8. La inmunofluorescencia se realizó en secciones de rafe dorsal WKY con siARN 5-HT1A (*knockdown*) y ratas sin siARN 5-HT1A (control) sin tratamiento.

Experimento 2 (Fig. 1B)

En el segundo conjunto experimental, se analizaron los efectos conductuales de la combinación GAL(1-15)+FLX en la **prueba TST**. Se inyectaron FLX y GAL(1-15) con el mismo patrón y dosis de administración descritos en el experimento 1. Una hora después
 5 del ensayo, se eutanasió a los animales. Se recogieron sangre del tronco y cerebros para el posterior análisis de los **niveles de corticosterona circulante en sangre**, y los cerebros se procesaron para realizar **un estudio RT-qPCR**.

Ensayo de corticosterona: Las muestras de sangre obtenidas de animales eutanasiados por decapitación una hora después de realizar la TST se recogieron rápidamente en tubos que
 10 contenían EDTA, se enfriaron en hielo y se sometieron a centrifugación en una centrifugadora refrigerada (4°C, 3000rpm, 15 minutos). Posteriormente, se aisló el plasma y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. La medición de los niveles de corticosterona en el plasma se realizó utilizando el kit ELISA Corticosterona (ArborAssay, Ann Arbor, MI) siguiendo las directrices proporcionadas por el fabricante.

RT-qPCR: Las ratas fueron eutanasiadas por decapitación una hora después de realizar la prueba TST. Los cerebros se extrajeron rápidamente del cráneo y se congelaron en isopentano a -40°C. Las disecciones de los núcleos se realizaron como se describe brevemente a continuación. Los cerebros se rebanaron sobre la matriz cerebral (1mm) y se mantuvieron a -20°C hasta que cada región de interés entró en el plano de corte. Los tejidos
 20 de interés se diseccionaron utilizando un dispositivo de perforación con un diámetro interno de 2 mm y se recogieron en tubos Eppendorf. Se aisló el ARN total del hipotálamo, hipocampo dorsal y cortex prefrontal de ratas Wistar y WKY utilizando RNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La pureza del ARN aislado se evaluó midiendo relaciones de absorbancia a 260/230 nm y 260/280 nm utilizando un nanodrop (Thermo Scientific,
 25 Waltham, EEUU). Para eliminar los restos de ADN residual, las muestras se trataron con un kit de DNasa (Takara Inc, Shiga, Japón), y el ADNc se obtuvo utilizando un kit Reverse Transcriptase Core (Eurogentec, Seraing, Bélgica). Estos tres pasos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los análisis se realizaron por triplicado utilizando LightCycler® Multiplex Masters en
 30 un PCR Light Cycler 96 (Roche®), y la expresión génica relativa se determinó utilizando el método de doble delta Ct y se normalizó con respecto a las medidas de ARNm de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los cebadores utilizados en este estudio se adquirieron prediseñados en Sygma-Aldrich® y se utilizaron previamente. La GAPDH se

utilizó como referencia. La eficiencia de los cebadores utilizados se verificó en experimentos previos [3] y se comprobó que todos estaban en el rango entre 1,9 y 2,1.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media $\pm$ DS y el número de muestras (n) se indica en las 5 leyendas de las figuras. Todos los datos se analizaron con GraphPad PRISM 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Para comparar dos condiciones experimentales, se realizaron pruebas t de Student no apareadas de 2 colas. Para comparar más de dos grupos, se realizó un ANOVA de una vía. Se realizó la prueba posterior de comparación de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher cuando el cociente F en el ANOVA de 10 vía era estadísticamente significativo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0,05$ (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

En los experimentos de saturación, los valores de la constante de disociación (K_d) y del número máximo de sitios de unión (B_{max}) se determinaron ajustando los datos a la ecuación $Y = B_{max} * X / (X + K_d)$ mediante regresión no lineal utilizando el programa Prism, 15 versión 8 (GraphPad Software).

También se realizó un **análisis de componentes principales (ACP)** con rotación varimax para extraer las dimensiones independientes (es decir, los componentes) de los datos de FST y autorradiográficos. Se eligió un valor propio > 1 como criterio para la extracción de componentes, y se calculó una puntuación de PC (es decir, un valor estandarizado que 20 indica la posición relativa de cada animal en cada componente) mediante el método de regresión (SPSS Statistics 20, (IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.). Se eligieron cargas superiores a 0,6 (en valor absoluto) como criterio para incluir variables en un componente determinado.

Efectos sobre el comportamiento de la coadministración de GAL(1-15) y FLX

25 La coadministración de GAL(1-15) y FLX induce un efecto antidepresivo en ratas WKY en pruebas de comportamiento.

Antes de examinar los efectos conductuales de la combinación FLX+GAL(1-15) en los animales WKY, se estableció el perfil conductual depresivo de estos animales para las pruebas empleadas y se compararon con las ratas Wistar, utilizadas a modo de control.

30 En el **FST**, los animales WKY mostraron un aumento estadístico significativo en el tiempo de inmovilidad ($t_{18} = 3,004$, $p = 0,0076$) y una disminución en la escalada ($t_{18} = 4,927$, $p < 0,001$) en

comparación con los animales Wistar (**Tabla 1**). En el **TST**, los animales WKY mostraron un mayor tiempo de inmovilidad ($t_{10} = 2,864$, $p=0,0168$) en comparación con las ratas Wistar (**Tabla 1**). Los resultados del test FST fueron coherentes con los resultados del TST, una evaluación ampliamente utilizada del comportamiento de desesperación de los roedores.

5 **Tabla 1:** Comparación conductual entre ratas de las cepas Wistar y WKY en los parámetros de inmovilidad, natación y tiempo de escalada en el FSTy el tiempo de inmovilidad en el TST.

		WISTAR	WKY
FST	Inmovilidad	98,99 ± 13	135,7±6**
	Natación	89,9±11	114±6
	Escalada	76,6±11	18,9±3***
TST	Inmovilidad	101,9±12	144,9±9*

Los datos se representan como la media ± DS (n=10-6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente al grupo Wistar-salina según la prueba t de Student.

Tanto en el **FST como en el TST**, los animales WKY mostraron un aumento del tiempo de inmovilidad y una disminución de la escalada en comparación con los animales de la cepa Wistar. Estos hallazgos refuerzan la inclinación de la cepa WKY hacia el comportamiento de desesperación.

15 Posteriormente se analizó el efecto de la coadministración de GAL(1-15) y FLX en ratas WKY.

En el **FST**, sólo el grupo de animales WKY administrado con GAL(1-15)-FLX mostró un efecto antidepresivo con una disminución estadística significativa del tiempo de inmovilidad ($F_{3,33} = 5,800$, $P=0.0027$; LSD de Fisher post hoc: $P < 0,05$) (**Figura 2A**) y un aumento del tiempo de natación ($F_{3,33} = 5,159$, $P=0,0049$; LSD de Fisher post hoc: $P < 0,05$) (**Figura 2B**) en comparación con el grupo control WKY. La dosis y la pauta de administración de FLX utilizadas en este estudio no mostraron efecto antidepresivo en el FST. Además, las dosis de FLX y la pauta de administración utilizadas en este estudio, no indujeron efectos similares a los antidepresivos en ninguna de las pruebas, lo que subraya la resistencia de la cepa WKY a los antidepresivos convencionales.

El impacto de la combinación GAL(1-15)-FLX en el comportamiento de los animales WKY se corroboró en el **TST**, donde la coadministración de GAL(1-15) con FLX condujo a una

reducción del tiempo de inmovilidad en comparación con FLX solo ($F_{2,20} = 4,475$, $P = 0,0248$; LSD de Fisher post hoc: $P < 0,01$) (**Figura 2C**).

Por tanto, en las ratas WKY, sólo la combinación GAL(1-15)+FLX alivia eficazmente la desesperación conductual.

5 **Papel de GALR2 y 5HT1AR en los efectos antidepresivos inducidos por la combinación GAL(1-15)-FLX**

Se comprobó el papel de **GALR2** en los efectos antidepresivos inducidos por la combinación GAL(1-15)-FLX utilizando el antagonista M871. M871 (3nmol) bloqueó la reducción del tiempo de inmovilidad (LSD de Fisher post hoc: $P < 0,05$) (**Figura 2A**) y el aumento del tiempo de natación (LSD de Fisher post hoc: $P < 0,05$) (**Figura 2B**) encontrados tras la coadministración de GAL(1-15) y FLX en el FST.

GAL(1-15)(1nmol) y M871(3nmol) administrados solos carecieron de efecto en el FST en animales WKY (**Tabla 2**).

Tabla 2: Efectos de GAL(1-15)(1nmol) o M871(3nmol) administrados solos 15 min antes del FST en ratas WKY. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de inmovilidad o de natación.

	Control	GAL(1-15) (1nmol)	M871 (3nmol)
Inmovilidad (s)	140,60±7,9	133,2±25,9	161,9±17,8
Natación (s)	109,5±8,8	122,6±18,6	103,6±10,8

Los resultados sugieren la participación de GALR2 en los efectos mediados por GAL(1-15), ya que el antagonista de GALR2 M871 bloqueó en ratas WKY la potenciación por GAL(1-15) de los efectos antidepresivos de FLX.

También se estudió el papel del **5HT1AR** en esta interacción empleando animales WKY *knockdown* con siARN 5HT1AR.

Las ratas WKY inyectadas ICV con una dosis única de siARN 5HT1A redujeron la inmunoreactividad de 5-HT1AR en el RD ($t_{14} = 4,665$, $p < 0,001$) 14 días después de la inyección (**Figura 3**) tal y como se describió previamente tanto en animales *naïve* como OBX [4]. La reducción del siARN 5HT1AR en ratas WKY valida la implicación del 5-HT1AR en los efectos inducidos por GAL(1-15).

La disminución de 5-HT_{1A}R fue suficiente para bloquear la potenciación por GAL(1-15) de los efectos antidepresivos mediados por FLX en el FST (**Tabla 3**). Así pues, la coadministración de GAL(1-15)+FLX careció de efecto sobre la inmovilidad y el tiempo de natación en el FST.

5 **Tabla 3:** Efectos conductuales de la coadministración de FLX(10mg/kg) solo o en combinación con GAL(1-15)(1nmol) en ratas WKY *Knock-down* 5HT_{1A} en FST.

	Control	GAL(1-15) (1nmol)	FLX (10mg/kg)	FLX (10mg/kg) + GAL(1-15) (1nmol)
Inmovilidad(s)	155±27,9	134,2±20,7	179±26	126,7±10,2
Natación (s)	77,7±21	91,3±14,6	59,1±21,8	94,6±7,5

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la inmovilidad o el tiempo de nado en este modelo animal.

Por tanto, el **papel fundamental del 5-HT_{1A}R** en los efectos inducidos por GAL(1-15) también se confirmó a nivel conductual y neuroquímico. Así, la reducción de los niveles de 5-HT_{1A}R, mediante el *knockdown* con siARN 5-HT_{1A}R en ratas WKY, bloqueó la potenciación por GAL(1-15) de los efectos antidepresivos mediados por FLX, en consonancia con hallazgos previos.

Autorradiografía con [³ H]-8-OHDPAT, radioligando agonista de 5-HT_{1A}R

15 En este estudio, se analizaron los efectos neuroquímicos sobre las características de unión de [³ H]-8-OH-DPAT en el corteza prefrontal (CPFm), RD, GD y CA1 del hipocampo dorsal e hipocampo ventral de ratas WKY tratadas con la combinación GAL(1-15)+FLX. Se administró FLX 23, 5 y 1,25 horas antes de la eutanasia de las ratas. aCSF o GAL(1-15) se inyectó ICV 30 minutos antes de la eutanasia de las ratas. Se realizaron experimentos de saturación con 10 concentraciones de [³ H]-8-OHDPAT (0,26-10 nM) en diferentes secciones de cada región cerebral. La unión no específica se definió como la unión en presencia de 10 mM de serotonina. En la **Tabla 4** se describen los efectos de los distintos tratamientos en los parámetros K_d o B_{max} en todas las áreas analizadas.

Tabla 4: Efectos de la administración de FLX(10mg/kg) solo o en combinación con GAL(1-15)(1nmol) sobre las características de unión del agonista 5-HT_{1A}R [³ H]-8-OHDPAT en la corteza prefrontal medial (CPF), rafe dorsal (RD), CA1 y giro dentado (GD) del hipocampo dorsal e hipocampo ventral (v-Hyp) de ratas WKY.

		Kd (nM)	Bmax (fmol/mg prot)
CPF	Control	0,24±0,03	1752±48
	FLX(10mg/kg)	0,17±0,01*	2641±54,5#
	FLX(10mg/kg) + GAL(1-15)(1nmol)	0,14±0,01**	2252±31&
RD	Control	0,53±0,03	2737±96
	FLX(10mg/kg)	0,71±0,12	4100±331**
	FLX(10mg/kg) + GAL(1-15)(1nmol)	0,61±0,08	3990±266**
CA1	Control	0,6±0,03	2842±108
	FLX(10mg/kg)	0,51±0,04	2494±25**
	FLX(10mg/kg) + GAL(1-15)(1nmol)	0,5±0,02	2613±21*
GD	Control	0,56±0,04	2880±74
	FLX(10mg/kg)	0,15±0,01#	2746±32
	FLX(10mg/kg) + GAL(1-15)(1nmol)	0,48±0,02	2673±24**
v-Hyp	Control	0,78±0,02	2755±96
	FLX(10mg/kg)	0,39±0,02***	2393±93**
	FLX(10mg/kg) + GAL(1-15)(1nmol)	0,42±0,36***	2350±36**

Los datos se representan como media $\pm$ DS (n=6) de los valores Kd y Bmax. *p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001 en comparación con los grupos de control, # p<0,001 en comparación con el grupo de control y FLX(10 mg)+GAL(1-15)(1 nmol), & p<0,001 en comparación con el grupo de control y FLX(10 mg) según el ANOVA unidireccional seguido de la prueba de 5 diferencias mínimas significativas de Fisher.

En la **CPF**, se observó una disminución del valor de Kd como resultado de la administración de FLX o GAL(1-15)+FLX ($F_{2,15} = 5,736$, $P < 0,0141$). Además, se produjo una elevación de la Bmax en esta región ($F_{2,15} = 95,49$, $P < 0,001$). Sin embargo, el grupo tratado con GAL(1-15)+FLX mostró un aumento menor en comparación con los animales WKY tratados con 10 FLX (LSD de Fisher post hoc: $P < 0,01$).

En **RD**, se observó un aumento de la Bmax inducido por la administración de FLX o GAL(1-15)+FLX ($F_{2,15} = 9,045$, $P = 0,0026$; LSD de Fisher post hoc: $P < 0,01$) sin que se observaran cambios en el valor de Kd.

Por el contrario, en la región **CA1** del hipocampo dorsal, tanto FLX como la combinación de 15 GAL(1-15)+FLX provocaron una disminución de Bmax ($F_{2,15} = 7,409$, $P = 0,0058$), sin que se observaran cambios en el valor Kd.

En el **GD**, sólo la combinación GAL(1-15)+FLX produjo una disminución de la Bmax ($F_{2,15} = 4,725$, $P=0,0256$). En cuanto al valor Kd, la reducción fue inducida únicamente por el grupo FLX ($F_{2,15} = 59,68$, $P<0,001$).

En el hipocampo ventral (**v-Hyp**), tanto FLX como la combinación de GAL(1-15)+FLX provocaron una reducción de la Bmax ($F_{2,15} = 7,741$, $P=0,0049$), junto con una disminución significativa de la Kd ($F_{2,15} = 115,3$, $P<0,001$).

Experimentos previos de autorradiografía en animales naïve y OBX revelaron que la combinación de GAL(1-15) y FLX modificaba la Kd y Bmax del 5-HT_{1A}R en la CPFm, una región crítica implicada en la interacción entre el procesamiento emocional y la cognición o en las regiones CA1 y GD del hipocampo dorsal. Los datos aquí obtenidos también muestran modificaciones en el Bmax y Kd en todas las regiones analizadas. Sin embargo, en el CPFm y en la región GD del hipocampo dorsal, la administración de GAL(1-15)+FLX induce diferencias con respecto a otros grupos experimentales.

Por tanto, respecto al impacto del tratamiento con GAL(1-15)+FLX sobre las características de unión de [³H]-8-OH-DPAT en la CPFm, RD, GD, CA1 del hipocampo dorsal e hipocampo ventral de ratas WKY, se validó el papel del 5-HT_{1A}R en los efectos mediados por GAL(1-15).

Análisis de componentes principales (ACP)

Se realizaron dos ACP para analizar la interrelación entre los datos de FST (inmovilidad y tiempo de natación) y los parámetros autorradiográficos Kd/Bmax.

El primer ACP incluyó como variables las medidas FST y los parámetros autorradiográficos Kd. Las pruebas de adecuación de la muestra revelaron que los datos eran adecuados para el ACP (Kaiser-Meyer-Olkin, KMO=0,584; prueba de esfericidad de Bartlett: $X^2(21)=43,165$, $P=0,003$). Se extrajeron tres componentes independientes que explicaban el 78,8% de la varianza total (**Tabla 5**).

Tabla 5: Análisis de componentes principales de los parámetros FST y del Kd del experimento autorradiográfico.

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
FST inmovilidad	0,938	0,037	-0,101
FST natación	-0,815	0,38	-0,175

Kd CPF	0,685	0,541	0,012
Kd GD	-0,203	-0,721	0,483
Kd vHyp	0,403	-0,655	0,516
Kd RD	0,043	0,688	0,081
Kd CA1	0,003	0,015	0,945
Eigenvector	2,495	1,995	1,031
Varianza explicada	35,6%	28,5%	14,7%

El componente 1 (varianza explicada ~35,6%) era representativo del rendimiento del FST y de los valores de Kd en el PFC, con puntuaciones de PC bajas que indicaban menos inmovilidad y más natación durante la tarea de FST y valores de Kd más bajos en el PFC. El componente 2 (varianza explicada ~28,5%) incluía el Kd del RD, hipocampo ventral y GD 5 del hipocampo dorsal, con puntuaciones de PC bajas que indicaban altos niveles de Kd en las regiones del hipocampo y bajos valores de Kd en el RD. El componente 3 (varianza explicada ~14,7%) incluía el Kd de CA1 (**Figura 4A**).

Para determinar si los grupos experimentales diferían en las puntuaciones de PC extraídas en el análisis se realizó un ANOVA unidireccional en cada uno de los componentes. En 10 cuanto al Componente 1, se observó que había una reducción significativa en las puntuaciones de PC en el grupo de animales tratados con GAL(1-15)+FLX ($F_{2,15} = 6,532$, $P=0,0091$) (**Figura 4B**), lo que indica que los animales de este grupo mostraban un menor comportamiento de desesperación junto con valores más bajos de Kd en PFC.

En el Componente 2, se encontró una reducción en la puntuación de PC en los animales 15 tratados con FLX ($F_{2,15} = 11,85$, $P=0,008$), lo que indica que las ratas de este grupo mostraron valores más altos de Kd en las regiones del hipocampo junto con valores más bajos de Kd en RD (**Figura 4C**).

En el Componente 3, no se observaron diferencias significativas entre grupos en las puntuaciones de PC entre grupos (**Figura 4D**).

20 Se realizó un segundo ACP, incluyendo las medidas FST y los parámetros autorradiográficos Bmax.

Tabla 6: Análisis de componentes principales de los parámetros FST y del Bmax del experimento autorradiográfico.

	Componente 1	Componente 2
FST inmovilidad	0,114	0,936
FST natación	0,045	-0,889
Bmax CPF	-0,901	0,105
Bmax GD	0,624	0,261
Bmax vHyp	0,883	0,19
Bmax RD	0,779	0,122
Bmax CA1	-0,704	0,074
Eigenvector	3,11	1,79
Varianza explicada	44,4%	25,6%

Una vez más, las pruebas de adecuación de la muestra revelaron que los datos eran adecuados para el ACP (KMO=0,544; prueba de esfericidad de Bartlett: X^2 (21)=60,154, $P<0,001$). El análisis reveló dos componentes independientes que explicaban el 70% de la varianza total (**Figura 5A**). El componente 1 (varianza explicada ~44,4%) era representativo de los valores de Bmax en todas las áreas cerebrales analizadas, con altas puntuaciones de PC que indicaban altos niveles de Bmax en las regiones del hipocampo y bajos valores de Bmax en el RD y el CPF. El componente 2 (varianza explicada ~25,6%) era representativo del rendimiento del FST, con puntuaciones de PC bajas que indicaban menos inmovilidad y más natación durante la tarea.

- 10 El análisis ANOVA unidireccional de las puntuaciones PC obtenidas en el segundo PCA reveló que, en el Componente 1, los grupos tratados con FLX y GAL(1-15)+FLX mostraron puntuaciones PC significativamente más bajas que el grupo control ($F_{2,15} = 42,97$, $P<0.001$) (**Figura 5B**), mientras que en el Componente 2, los animales tratados con GAL(1-15)+FLX mostraron puntuaciones PC significativamente inferiores en comparación con el resto de los grupos ($F_{2,15} = 5,034$, $P=0,0212$) (**Figura 5C**).

Los resultados del análisis ACP indican que sólo la disminución de Kd en el CPF coincide con los efectos inducidos por la combinación GAL(1-15)-FLX en el FST, que implican una reducción de la inmovilidad y un aumento del tiempo de natación. Además, la administración de FLX provocó alteraciones en el Kd en el RD, el hipocampo ventral GD y modificaciones en el parámetro Bmax en todas las regiones examinadas.

Por tanto, la corteza prefrontal (CPF) fue la única región asociada con el rendimiento del FST. Los valores de Kd más bajos en el CPFm, indicados por puntuaciones de PC bajas, se

correspondían con una menor inmovilidad y una mayor natación durante la tarea FST. Se detectó una disminución significativa de las puntuaciones de PC en el grupo de animales tratados con GAL(1-15)+FLX, lo que sugiere que este grupo presentaba un comportamiento de desesperación disminuido y valores de Kd más bajos en el CPFm.

5 **Efectos hormonales**

Se examinaron los **niveles de corticosterona** en los animales WKY una hora después de realizar la TST. Se han detectado niveles anormalmente elevados de corticosterona en ratas control WKY analizadas una hora después del TST. La administración de FLX no afectó significativamente a los niveles de corticosterona en ratas WKY en condiciones ordinarias o de estrés. Sólo la coadministración de GAL(1-15) y FLX indujo una reducción estadística significativa de los niveles de corticosterona ($F_{2,16} = 4,141$, $P = 0,0355$; LSD de Fisher post hoc: $P < 0,001$), aproximadamente un 30% en comparación con el grupo control y el grupo WKY tratado con FLX (**Figura 6**).

Esto sugiere posibles mecanismos subyacentes que implican la regulación del eje HPA.

15 **Efectos en los niveles de expresión de GALR1 y GALR2 glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) BDNF, TrkB, 5HT1A**

Estudios PCR

Se describió el impacto en la expresión de ARNm de proteínas asociadas al mecanismo de interacción de GAL(1-15) con FLX en el hipotálamo, el hipocampo ventral y dorsal y la corteza prefrontal (CPF). La **Tabla 7** recopila los datos sobre los niveles de expresión de ARNm de las ratas WKY tratadas con FLX o GAL(1-15)+FLX. El análisis incluye no sólo un grupo de ratas WKY salinas, sino también un grupo de animales Wistar en todas las regiones cerebrales de interés.

Tabla 7: Efecto de la administración de FLX(10mg/Kg) sola o en combinación con GAL(1-15)(1nmol) sobre la expresión relativa de ARNm del receptor de glucocorticoides (GR), receptor de mineralocorticoides (MR), GalR1, GalR2, 5ht1a, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Receptor de tropomiosina quinasa B (TrkB), p11 y Homer1a (ambas proteínas que conforman receptor metabotrópico de glutamato 5 o mGluR5), en el hipotálamo (HPT), el hipocampo ventral (vHyp) y dorsal (dHyp) y el córtex prefrontal (PFC) de ratas WKY en comparación con ratas Wistar sin tratamiento. Se administró FLX 23, 5 y 1h antes de realizar el TST, y se inyectó aCSF o GAL(1-15) ICV 15 min antes. Se extrajeron

los cerebros y se diseccionaron adecuadamente para los experimentos de PCR 1h después de la prueba.

		Wistar	Control WKY	FLX(10mg/Kg)	FLX(10mg/Kg)+ GAL(1-15)(1nmol)
HPT	GR	0,57 ± 0,06	0,8 ± 0,063 #	0,79 ± 0,06 #	0,7 ± 0,03
	MR	0,84 ± 0,16	1,09 ± 0,14	0,95 ± 0,12	1,07 ± 0,12
	GalR1	0,69 ± 0,06	0,99 ± 0,12 *	0,97 ± 0,07 *	0,64 ± 0,08
	GalR2	1,01 ± 0,25	0,79 ± 0,07	0,86 ± 0,08	0,82 ± 0,06
	5ht1a	1,01 ± 0,25	0,79 ± 0,07	0,86 ± 0,08	0,82 ± 0,06
vHyp	GR	1,24 ± 0,25	0,81 ± 0,19	0,85 ± 0,2	1,02 ± 0,37
	MR	0,83 ± 0,08	0,69 ± 0,14	1,03 ± 0,12	0,81 ± 0,08
	GalR1	0,47 ± 0,21	1,18 ± 0,24	0,65 ± 0,17	0,52 ± 0,28
	GalR2	3,53 ± 0,52	1,57 ± 0,23 #	1,93 ± 0,44 #	0,53 ± 0,32 &
	5ht1a	1,24 ± 0,25	0,81 ± 0,19	0,85 ± 0,2	1,02 ± 0,37
	BDNF	2,32 ± 0,5	1,22 ± 0,3	1,34 ± 0,3	0,99 ± 0,16
	P11	0,59 ± 0,11	0,56 ± 0,13	1,24 ± 0,35	1,1 ± 0,5
dHyp	GR	0,82 ± 0,46	0,94 ± 0,08	0,84 ± 0,35	0,87 ± 0,43
	MR	0,96 ± 0,15	1,22 ± 0,11	1,17 ± 0,2	1,21 ± 0,34
	GalR1	1,47 ± 0,45	1,67 ± 0,9	0,86 ± 0,42	1,8 ± 1,4
	GalR2	1,25 ± 0,27	1,31 ± 0,46	1,46 ± 0,7	1,98 ± 1
	5ht1a	1,01 ± 0,25	0,78 ± 0,11	0,61 ± 0,23	0,58 ± 0,16
	BDNF	1,66 ± 0,35	0,72 ± 0,1 #	0,89 ± 0,31 #	0,39 ± 0,04 #
	TrkB	0,96 ± 0,16	1,88 ± 0,27	1,77 ± 0,44	1,92 ± 0,61
PFC	GR	0,83 ± 0,11	0,75 ± 0,25	0,83 ± 0,3	0,71 ± 0,15

GalR1	0,82 ± 0,2	0,64 ± 0,22	0,67 ± 0,23	0,83 ± 0,22
GalR2	1,6 ± 0,28	1,23 ± 0,22	1,4 ± 0,22	1,28 ± 0,31
5ht1a	0,8 ± 0,08	0,59 ± 0,11	0,56 ± 0,05	0,61 ± 0,1
BDNF	1,5 ± 0,15	1,73 ± 0,39	1,35 ± 0,33	1,09 ± 0,1
Homer1a	0,69 ± 0,04	0,73 ± 0,06	0,59 ± 0,06	0,71 ± 0,04

Los datos se representan como la media ± DS (n=6-4 ratas por grupo) de la expresión relativa de los genes y se expresan como unidades arbitrarias. *p<0,05 frente a Wistar y FLX(10mg/Kg)+GAL(1-15)(1nmol). # p<0,05 frente al grupo Wistar, & p<0,05 frente al grupo 5 Wistar y FLX(10mg/Kg) según ANOVA unidireccional seguido de la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher.

Los niveles de expresión de **GALR1 y GALR2** en animales de la cepa WKY, contrastándolos con los de las ratas de la cepa Wistar reveló alteraciones en la expresión dentro de dos regiones específicas: el hipotálamo y el hipocampo ventral. En particular, 10 GALR1 mostró una elevada expresión de ARNm en el hipotálamo de las ratas WKY en comparación con los animales Wistar ($F_{3,17} = 3,87$, $P=0,028$). Por el contrario, en el hipocampo ventral, se produjo una reducción significativa de la expresión de GALR2 en los animales WKY en relación con la cepa Wistar ($F_{3,14} = 8,763$, $P=0,0016$).

Es interesante destacar que los niveles elevados de GALR1 en el hipotálamo de la WKY 15 volvieron a los valores basales tras la coadministración de GAL(1-15)+FLX (LSD de Fisher post hoc: $P<0,05$), mientras que FLX sola no produjo ningún efecto. En el hipocampo ventral, la coadministración de GAL(1-15)+FLX redujo los niveles de GALR2 en comparación con FLX sola (LSD de Fisher post hoc: $P<0,05$). En las demás áreas cerebrales analizadas, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm de GALR1 o 20 GALR2 inducidos por ninguno de los tratamientos.

Estos resultados ponen de manifiesto el papel de GALR1 y GALR2 en los efectos mediados por GAL(1-15).

Todos estos datos refuerzan hipótesis de la existencia de un complejo heterorreceptor GALR1-GALR2-5-HT1AR trimérico [que podría ser un punto clave para comprender los 25 efectos de la interacción GAL(1-15)-SSRI en la WKY. En dicho complejo, las interacciones

alostéricas alteradas receptor-receptor pueden desarrollarse con la capacidad del componente GALR1-GALR2 para potenciar la señalización del protómero 5-HT1AR.

El análisis también incluyó un examen de los niveles de ARNm de los receptores de **glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR)**. En particular, se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles de GR en el hipotálamo de los grupos de control WKY y tratados con FLX en comparación con la cepa Wistar ($F_{3,16} = 4,781$, $P = 0,0145$). Este aumento se reduce con la coadministración de GAL(1-15)+FLX en los animales WKY.

Los resultados descritos en la presente memoria muestran elevados niveles de expresión de ARNm de los receptores de glucocorticoides (GR) en ratas WKY en comparación con ratas de la cepa Wistar.

También se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de **BDNF y TrkB**. En el hipocampo dorsal, se produjo una reducción notable y estadísticamente significativa de los niveles de BDNF en todos los grupos WKY en comparación con los animales Wistar, en consonancia con hallazgos anteriores ($F_{3,18} = 4,654$, $P = 0,014$). Esta disminución se observó de forma similar en el hipocampo ventral.

No se detectaron alteraciones en la expresión de ARNm de **5HT1A** en ninguna de las regiones analizadas.

Referencias

1. Millón C, Flores-Burgess A, Narváez M, Borroto-Escuela DO, Santín L, Gago B, Narváez JA, Fuxe K, Díaz-Cabiale Z. Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system. *Brain Struct Funct.* **2016** Dec;221(9):4491-4504. doi: 10.1007/s00429-015-1180-y. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26792005.
2. Flores-Burgess A, Millón C, Gago B, García-Durán L, Cantero-García N, Coveñas R, Narváez JA, Fuxe K, Santín L, Díaz-Cabiale Z. Galanin (1–15)-fluoxetine interaction in the novel object recognition test. Involvement of 5-HT1A receptors in the prefrontal cortex of the rats. *Neuropharmacology*, Volume 155, **2019**, Pages 104-112, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.023>.
3. Flores-Burgess A, Millón C, Gago B, García-Durán L, Cantero-García N, Puigcerver A, Narváez JA, Fuxe K, Santín L, Díaz-Cabiale Z. Galanin (1-15) Enhances the Behavioral Effects of Fluoxetine in the Olfactory Bulbectomy Rat, Suggesting a New Augmentation

Strategy in Depression, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, Volume 25, Issue 4, April **2022**, Pages 307–318, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyab089>

4. García-Durán L, Flores-Burgess A, Cantero-García N, Puigcerver A, Narváez JÁ, Fuxe K, Santín L, Millón C, Díaz-Cabiale Z. Galanin(1-15) Potentiates the Antidepressant-like Effects Induced by Escitalopram in a Rat Model of Depression. *Int J Mol Sci.* **2021** Oct 7;22(19):10848. doi: 10.3390/ijms221910848. PMID: 34639188; PMCID: PMC8509384.
5. Aleksandrova LR, Wang YT, Phillips AG. Evaluation of the Wistar-Kyoto rat model of depression and the role of synaptic plasticity in depression and antidepressant response. *Neurosci Biobehav Rev.* **2019** Oct;105:1-23. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.07.007.
- 10 6. Díaz-Cabiale Z, Parrado C, Narváez M, Puigcerver A, Millón C, Santín L, Fuxe K, Narváez JA. Galanin receptor/Neuropeptide Y receptor interactions in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology.* **2011** Jul-Aug;61(1-2):80-6. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.03.002.
- 15 7. Millón C, Flores-Burgess A, Narváez M, Borroto-Escuela DO, Santín L, Parrado C, Narváez JA, Fuxe K, Díaz-Cabiale Z, A Role for Galanin N-Terminal Fragment (1–15) in Anxiety- and Depression-Related Behaviors in Rats, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, Volume 18, Issue 3, February **2015**, pyu064, <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu064>
- 20 8. Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol.* **1997** May;5(2):107-12. doi: 10.1037//1064-1297.5.2.107. PMID: 9234045.
- 25 9. Flores-Burgess A, Millón C, Gago B, Narváez M, Borroto-Escuela DO, Mengod G, Narváez JA, Fuxe K, Santín L, Díaz-Cabiale Z. Galanin (1-15) enhancement of the behavioral effects of Fluoxetine in the forced swimming test gives a new therapeutic strategy against depression. *Neuropharmacology.* **2017** May 15;118:233-241. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.010. Epub 2017 Mar 11. PMID: 28288814.
- 30 10. Flores-Burgess A, Millón C, Gago B, Narváez JA, Fuxe K, Díaz-Cabiale Z Small interference RNA knockdown rats in behavioral functions: GALR1/GALR2 heteroreceptor in anxiety and depression-like behavior. In: *Receptor-receptor interactions in the central nervous system* Fuxe K, Borroto-Escuela D, eds , **2018** pp. 133–148. New York: Humana Press.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto GAL(1-15) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con al menos un inhibidor de la recaptación de serotonina para su uso en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento.
- 5 2. Compuesto GAL(1-15) en combinación con un inhibidor de la recaptación de serotonina para su uso según la reivindicación anterior, caracterizada por que el inhibidor de la recaptación de serotonina es la fluoxetina.
3. Composición que comprende los compuestos según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento.
- 10 4. Composición para su uso según la reivindicación anterior caracterizada por que el inhibidor de la recaptación de serotonina es la fluoxetina.
5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 caracterizada por que es una composición farmacéutica.
6. Kit que comprende los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o de
15 las composiciones según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 para su uso en el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento.
7. Kit para su uso según la reivindicación anterior caracterizado por que está adaptado para la administración simultánea o secuencial de los compuestos activos.

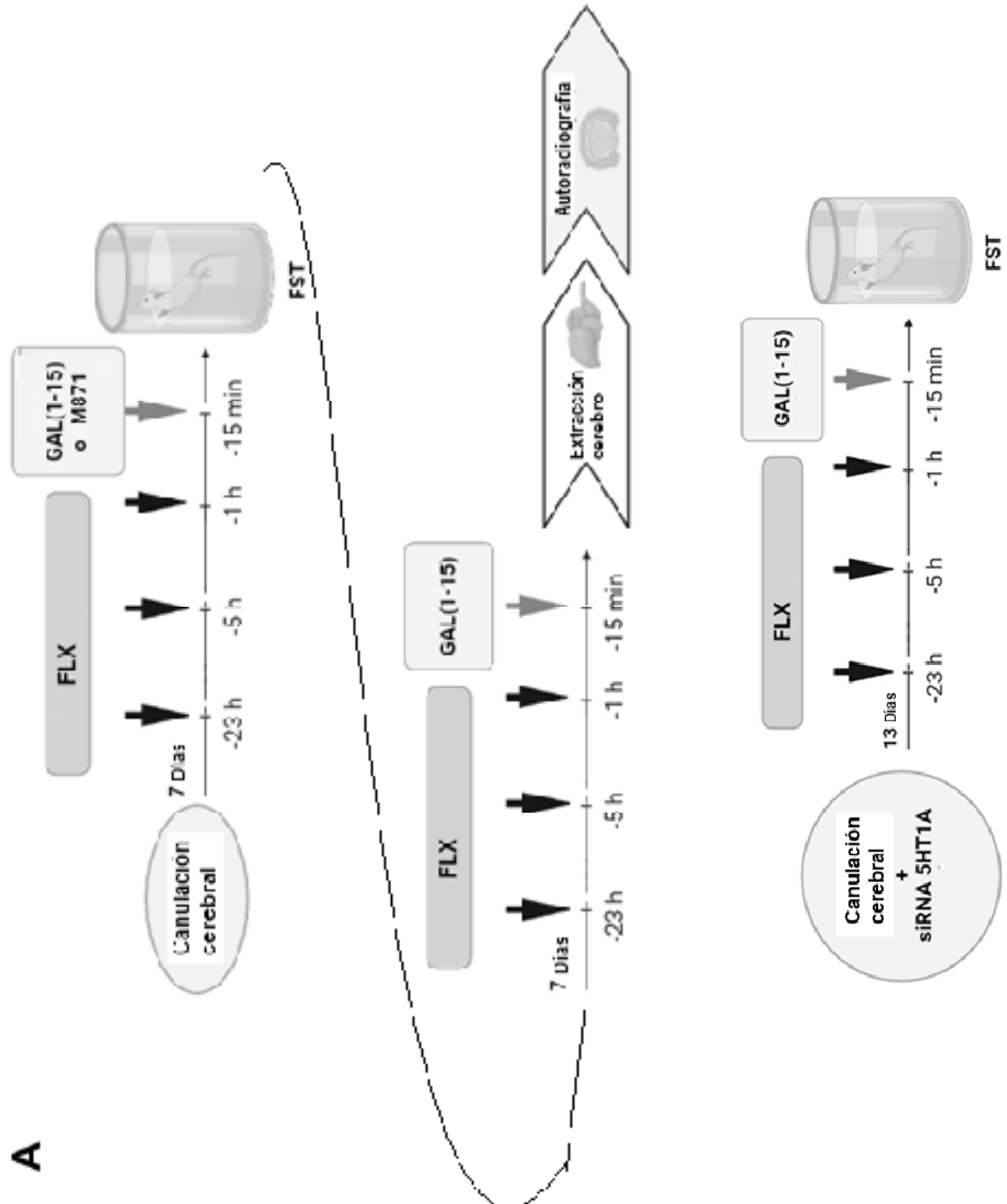


FIG. 1

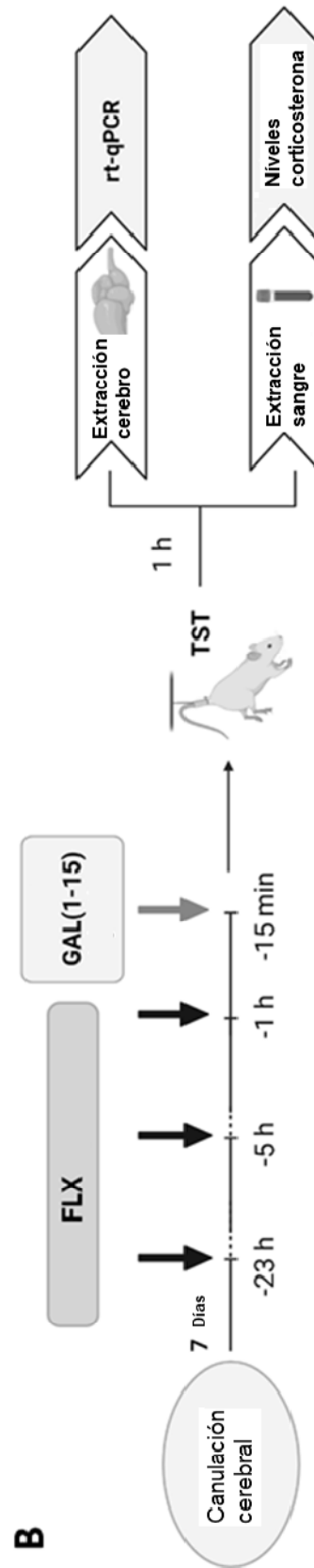


FIG. 1

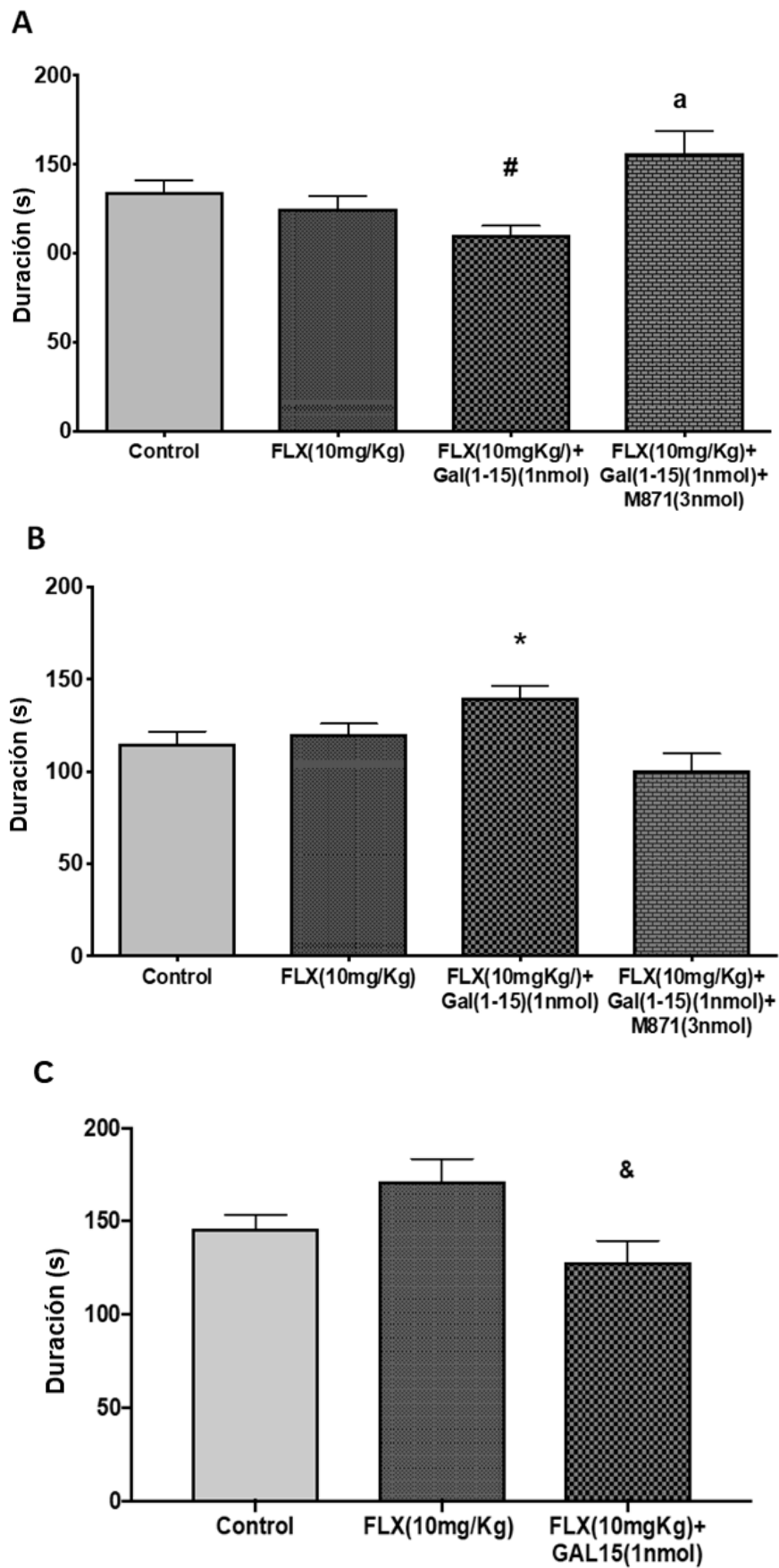


FIG. 2

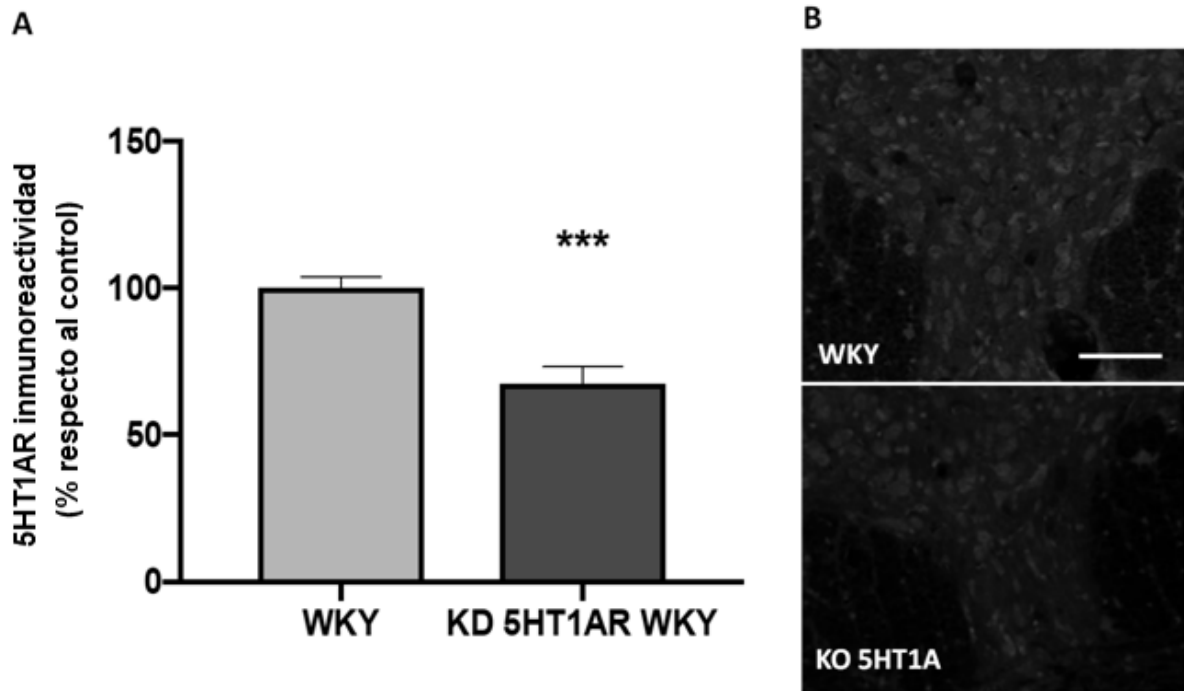


FIG. 3

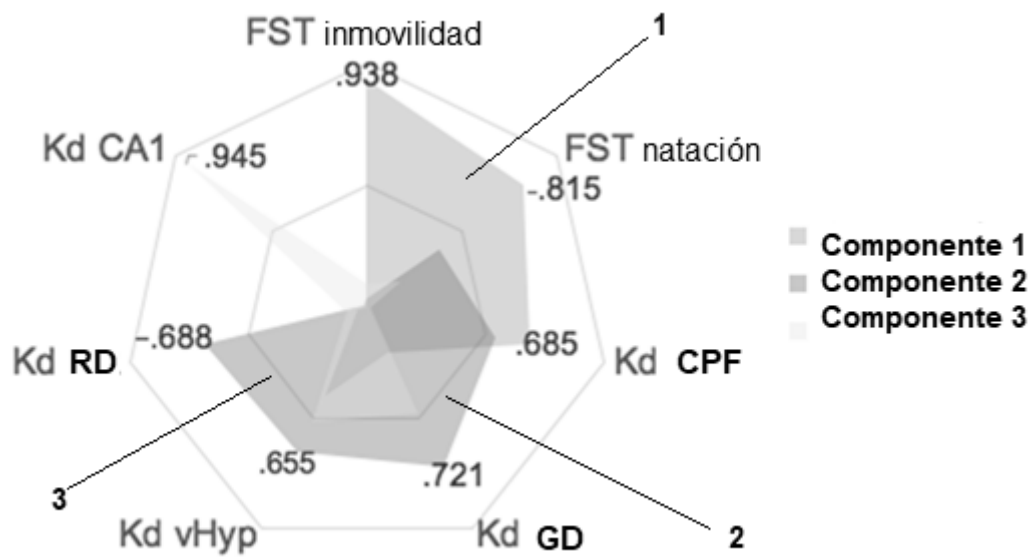


FIG. 4

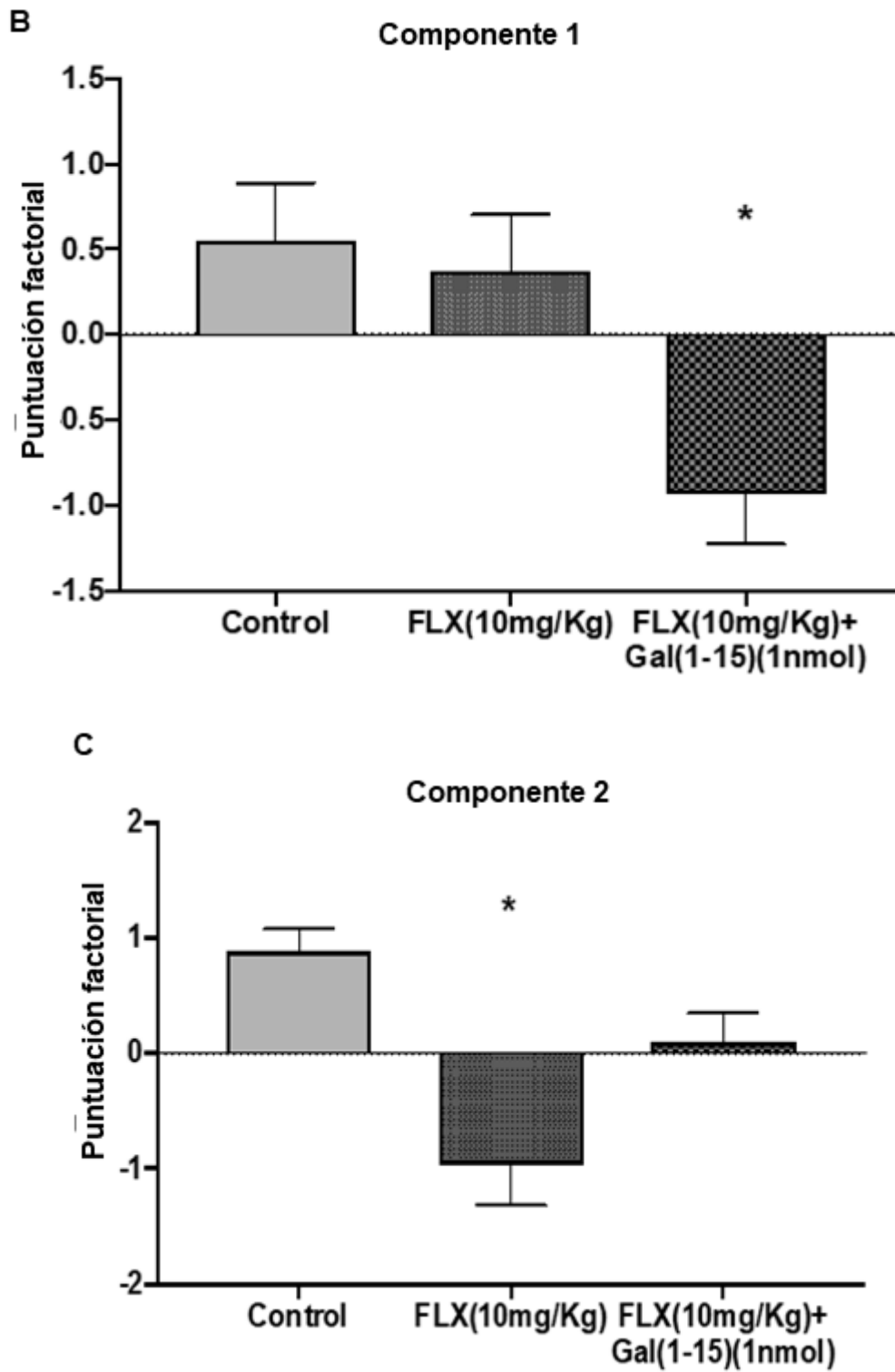


FIG. 4

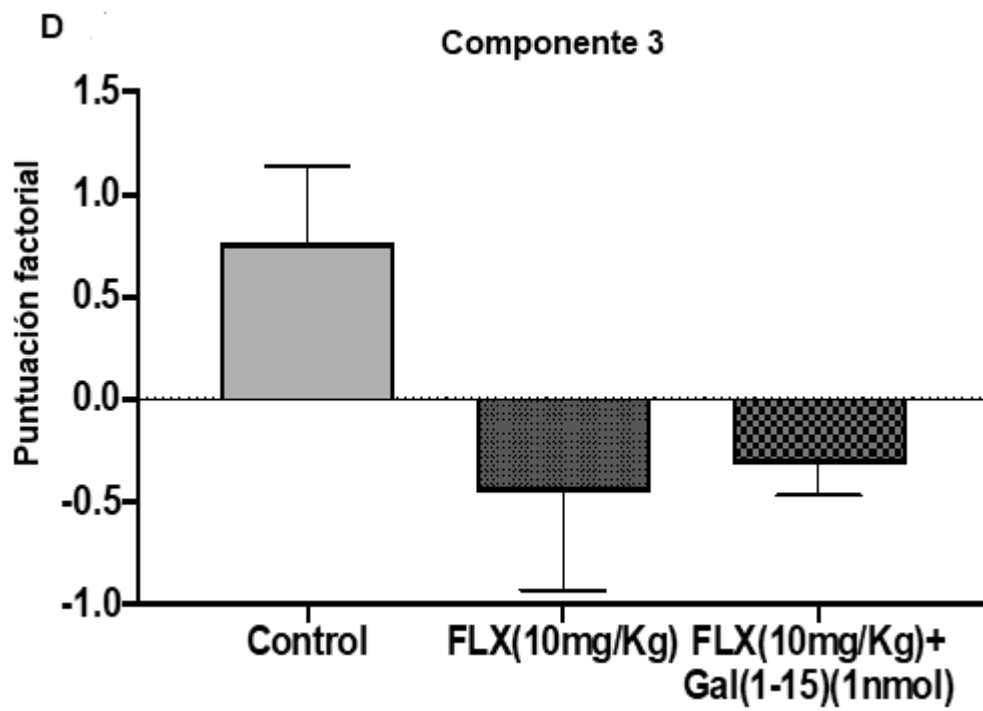


FIG. 4

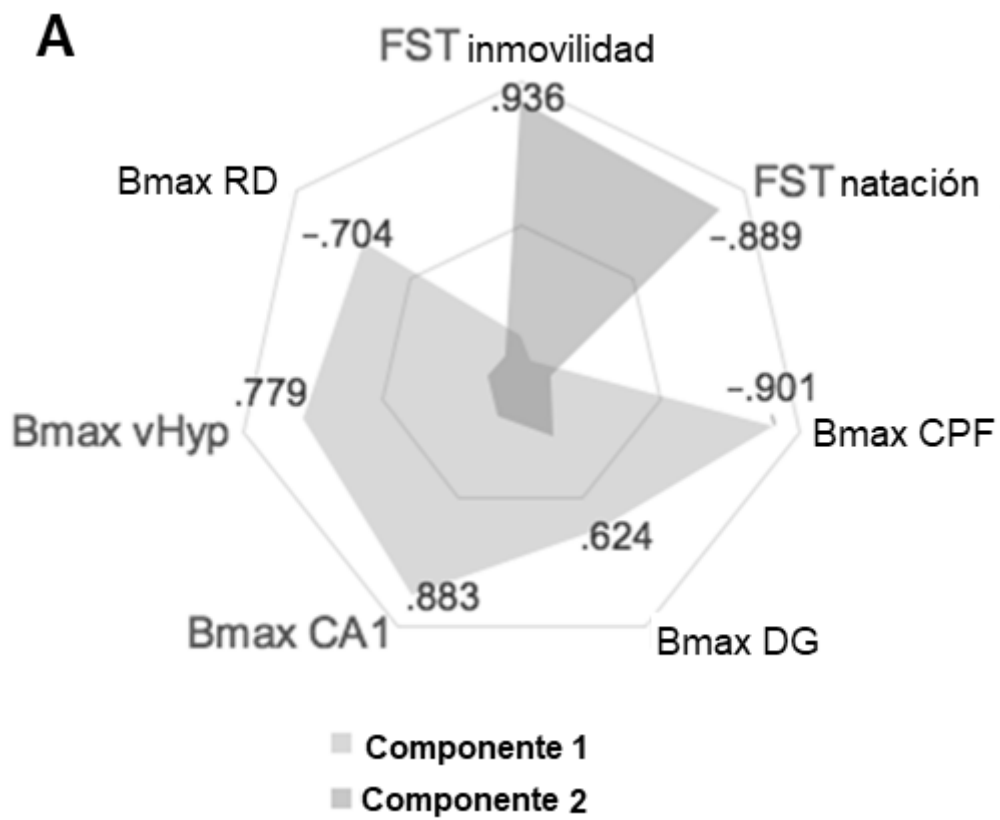


FIG. 5

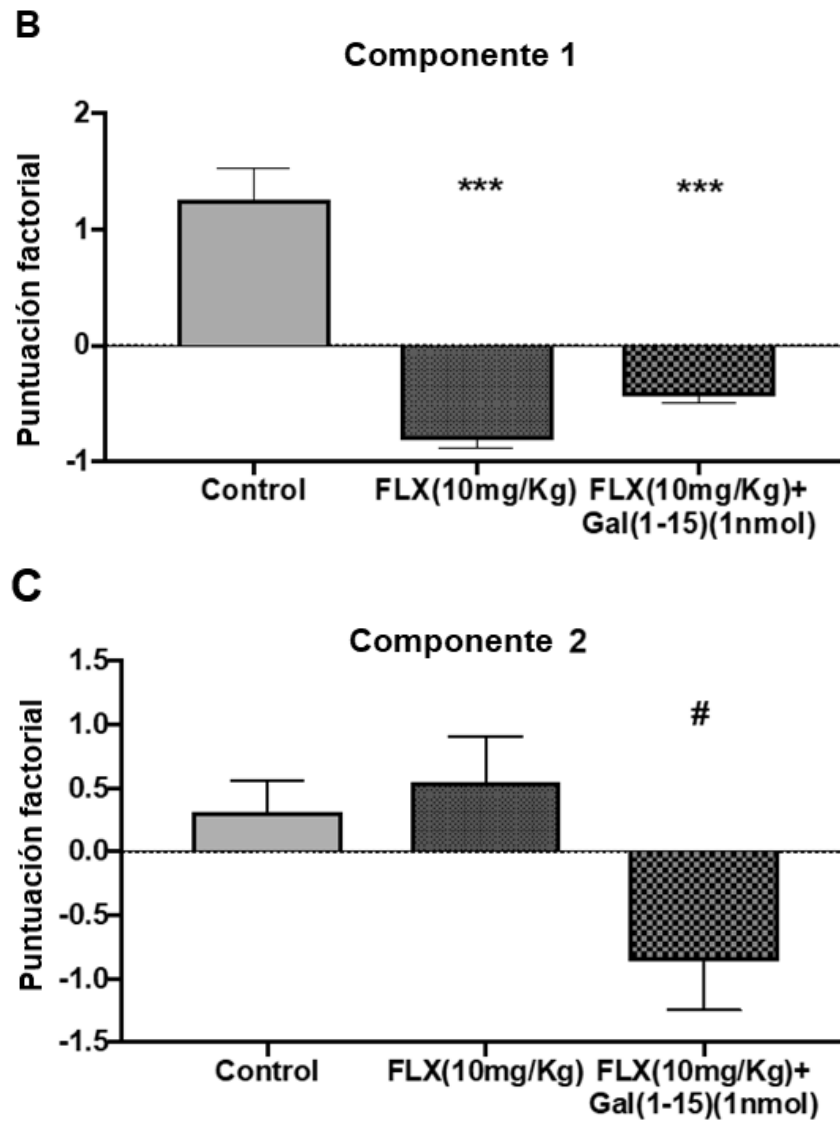


FIG. 5

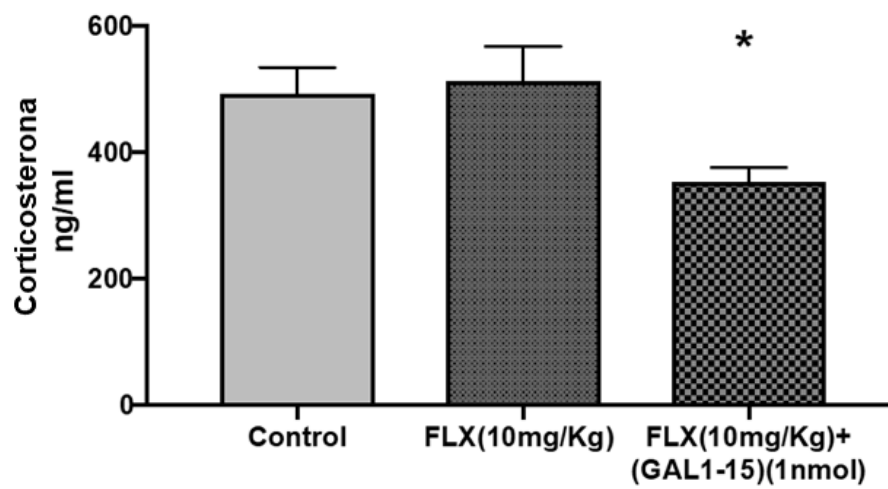


FIG. 6



- ②1 N.º solicitud: 202430590
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 12.07.2024
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2659092 A1 (UNIV MALAGA) 13/03/2018, todo el documento	1-7
X	FLORES-BURGESS ANTONIO <i>et al.</i> ; Galanin (1-15) enhancement of the behavioral effects of Fluoxetine in the forced swimming test gives a new therapeutic strategy against depression. Neuropharmacology. ELSEVIER. Illes Peter, Verkhatsky Alexei, Burnstock Geoffrey, Sperlagh Beata, 2017, Vol. 118, Páginas 233-241, ISSN 0028-3908, <DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.03.010>	1-7
X	FLORES-BURGESS ANTONIO <i>et al.</i> ; Galanin (1-15) Enhances the Behavioral Effects of Fluoxetine in the Olfactory Bulbectomy Rat, Suggesting a New Augmentation Strategy in Depression. International Journal of Neuropsychopharmacology, 19/04/2022, Vol. 25, Nº 4, Páginas 307-318, ISSN 1461-1457, ISSN 1469-5111 (electronic), <DOI: 10.1093/ijnp/pyab089>	1-7
X	GARCÍA-DURÁN LAURA <i>et al.</i> ; Galanin(1-15) Potentiates the Antidepressant-like Effects Induced by Escitalopram in a Rat Model of Depression.. International journal of molecular sciences. 07 Oct 2021, 07/10/2021, Vol. 22, Nº 19, ISSN 1422-0067 (electronic), <DOI: 10.3390/ijms221910848>	1-7
A	EP 0958824 A2 (LILLY CO ELI) 24/11/1999; párrafos [0054], [0055], [0060], [0071], [0072]; Formulaciones 1, 2, 5.	1-7
A	WO 0041684 A1 (WARNER LAMBERT CO <i>et al.</i>) 20/07/2000; ejemplo; reivindicación 6.	1-7
A	MILLÓN CARMELO <i>et al.</i> ; Galanin (1-15) enhances the antidepressant effects of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT: involvement of the raphe-hippocampal 5-HT neuron system. Brain Structure and Function. Springer Berlin Heidelberg. Radtke-Schuller Susanne, Schuller Gerd, 20/01/2016, Vol. 221, Nº 9, Páginas 4491-4504, ISSN 1863-2653, ISSN 1863-2661 (electronic), <DOI: 10.1007/s00429-015-1180-y>	1-7
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 03.06.2025	Examinador N. Vera Gutierrez	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/10 (2006.01)
A61K31/138 (2006.01)
A61P25/24 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, INVENES/LATIPAT