



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

TESIS

**EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA FUNCIÓN DE LOS
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G 35 Y 55 EN LA
MODULACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA ANSIEDAD**

PRESENTA

CARLOS HUMBERTO LÓPEZ LARIZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA DE LA TOXICOLOGÍA

TUTOR:

DR. BRUNO ANTONIO MARICHAL CANCINO

COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Ventura Juárez y Dra. Raquel Guerrero Alba

Aguascalientes, Ags., a 30 de mayo de 2023

AUTORIZACIONES

Carta autorización de El Decano



CCBASICAS/ 064/2023

CARLOS HUMBERTO LÓPEZ LARIZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA
EN CIENCIAS AREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA
P R E S E N T E.

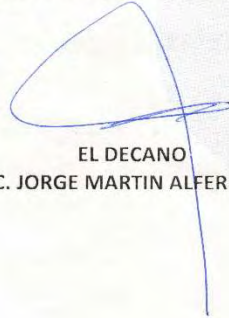
Estimado Alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: "EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G 35 Y 55 EN LA MODULACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA ANSIEDAD", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags., 29 de mayo del 2023



EL DECANO
M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ

Carta de votos aprobatorios del comité tutorial



CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **CARLOS HUMBERTO LÓPEZ LARIZ** con ID 203480 quien realizó la tesis titulado: **EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G 35 Y 55 EN LA MODULACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA ANSIEDAD**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 22 de mayo de 2023.

Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino
Tutor de tesis/trabajo práctico

Dr. Javier Ventura Juárez
Asesor de tesis/trabajo práctico

Dra. Raquel Guerrero Alba
Asesor de tesis/trabajo práctico

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Dictamen de liberación académica



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 30/05/2023

NOMBRE: López Lariz Carlos Humberto **ID** 203480

PROGRAMA: Maestría en Ciencias: Área de la biotecnología vegetal o toxicología **LGAC (del posgrado):**

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G 35 Y 55 EN LA MODULACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA ANSIEDAD

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Generación de conocimiento sobre herramientas farmacológicas en el área de la salud que contribuye con el primer objetivo PRONACES-CONACYT y el tercero de la ONU referente a buena salud y bienestar para todos.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
N.A.				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Si No

FIRMAS

Elaboró:
 * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Dra. Elsa Marcela Ramírez López
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dra. Raquel Guierrez Alba
 * En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAR de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano
Revisó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dr. Juan Jauregui Rincón
Autorizó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. En C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.
 Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.
 Código: DD SEE FO-15
 Actualización: 01
 Emisión: 28/04/20



Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al CVU 1092765, parte del programa de la Maestría en Ciencias: Área de Toxicología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.



AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos van dirigidos a la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes por acogerme una vez más como su alumno y proporcionarme todas las herramientas y amenidades para la conclusión de mis estudios de posgrado. Al Consejo Nacional de Ciencia y de Tecnología (CONACyT) por el financiamiento a mi proyecto y manutención, que sin tal apoyo hubiera sido muchísimo más difícil sacar a flote mi investigación.

El invaluable apoyo y consideración por parte de mi mentor: el Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino es algo con lo que jamás terminaré de estar tan enormemente agradecido. Pocos tutores como él son capaces de forjar una personalidad crítica en sus estudiantes y el amor por el conocimiento, excelente investigador y catedrático, pero sobre todo persona; le deseo lo mejor en su vida. A mi comité tutorial, a la Dra. Raquel Guerrero Alba por su apoyo en mi proyecto y como guía en todos los procedimientos administrativos, pero sobre todo con su ayuda, comprensión y empatía en mis momentos “bajos” durante mi trayecto en este programa. Al Dr. Javier Ventura Juárez por el apoyo de Histología, le admiro por su incesante ímpetu por el conocimiento, por una actitud positiva y por todas esas risas en el laboratorio, gracias *doc* por inculcarme el valor de la resiliencia, le admiro y le respeto. Al Doctor César Cardona Félix por forjarme el “cayo” de la investigación y a la M. en C. María Zulema Juárez Cortes por siempre ser mi compañía y mentora cuando daba mis primeros pasos en la investigación dura, un saludo hasta el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN.

Agradecer enteramente a mi madre, que gracias a ella sé lo que es trabajar y esforzarse por mantener las cosas a flote, a siempre tenerle una sonrisa a la vida y a ver en cada ser humano a un ente increíble digno de ser valorado por lo que es y por todo su amor y apoyo desde casa. A mi padre que, a pesar de su forma característica y dura de ser, me enseñó a lidiar con los ratos duros de la vida, a resistir y avanzar, porque el mundo no se detiene, aunque se esté cayendo. A mi novia Michelle que siempre estuvo desde el comienzo de este viaje y sigue en las buenas y en las malas.

Quiero agradecer a mis mejores amigos por siempre acompañarme, aunque los vea poco. Erandeni y Juani son dos seres de luz increíbles que sin ellas mi vida sería algo completamente solitario y diferente. A Javi y a Sosa, que siempre están cuando se les necesita y a mi amiga Estefi que también es un ser de luz y su compañía siempre fue tranquilizadora. A mi amiga Estrella por motivarme desde que estaba en la Licenciatura para que hiciera mi posgrado y a todos mis compañeros de maestría que son seres humanos increíbles y muy nobles, a todos les mando un abrazo enorme.

DEDICATORIA

*A mi madre y a Michelle,
A mis cerros y montañas,
Al silencio y a la nada.*

Carlos Humberto López



Índice General

RESUMEN7

ABSTRACT.....7

INTRODUCCIÓN.....8

1 MARCO TEÓRICO.....13

 1.1 ANTECEDENTES 13

 1.1.1 Marco histórico: Investigación de la memoria..... 13

 1.1.2 Marco histórico: Investigaciones en la ansiedad 14

 1.1.3 Marco histórico; GPR35 Y GPR55 16

 1.2 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs)..... 18

 1.2.1 Farmacología y Fisiología del receptor GPR35..... 19

 1.2.2 Farmacología y Fisiología del receptor GPR55..... 26

 1.3 LAS BASES NEUROFISIOLÓGICAS DEL APRENDIZAJE Y DE LA MEMORIA 30

 1.3.1 Potenciación a largo plazo (LTP) 30

 1.3.2 Vía CREB: expresión génica para el fortalecimiento de la sinapsis y formación de la memoria 32

 1.3.3 Memoria declarativa y no declarativa 34

 1.4 LAS BASES NEUROFISIOLÓGICAS DE LA ANSIEDAD..... 35

 1.4.1 La Neuroanatomía Funcional de la Ansiedad..... 36

 1.4.2 El componente neuroendocrino de respuesta al estrés..... 37

 1.4.3 Afectaciones comunes del estado de estrés..... 38

 1.5 LA RELACIÓN ENTRE LA ANSIEDAD CON EL APRENDIAZAJE Y LA MEMORIA..... 39

 1.6 PARADIGMAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA EN LA RATA..... 42

 1.6.1 El paradigma de laberinto de Barnes para la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial 42

 1.6.2 El paradigma de Campo abierto para la evaluación de la respuesta ansiosa etológica de la rata 44

 1.6.3 El paradigma de Laberinto suspendido en cruz para la evaluación de la respuesta de ansiedad etológica de la rata 45

 1.6.4 El Paradigma de enterramiento defensivo para la evaluación de la respuesta ansiosa por confrontación activa..... 46

2 JUSTIFICACIÓN47

3 HIPÓTESIS.....48

3.1	Hipótesis de la función del GPR35 hipocampal	48
3.2	Hipótesis de la función del GPR55 en PAG.....	48
4	OBJETIVO GENERAL.....	49
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
5	MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1	Cirugía estereotáctica y administración i.c.v.	49
5.2	Paradigma para la evaluación de la memoria y navegación espacial: laberinto de Barnes 51	
5.3	Paradigmas para evaluación de la ansiedad	53
5.3.1	Evaluación de la respuesta ansiosa etológica	54
5.3.2	Evaluación de la respuesta ansiosa por evitación activa	55
5.4	Eutanasia y análisis histológico	56
5.5	Tracking de los videos experimentales y análisis estadístico.....	57
6	RESULTADOS	58
6.1	Evaluación de la memoria espacial por la manipulación farmacológica del GPR35 hipocampal en el laberinto de Barnes	58
6.1.1	Análisis de la latencia y de la distancia de escape al túnel en el laberinto de Barnes 58	
6.1.2	Análisis de estrategias para la resolución del laberinto de Barnes.....	65
6.2	Evaluación de la respuesta ansiosa por la manipulación farmacológica del GPR55 del área gris periacueductal (PAG).....	70
6.2.1	Análisis de la respuesta ansiosa por evitación activa en el paradigma de enterramiento defensivo.	70
6.2.2	Análisis de la respuesta ansiosa etológica en el paradigma de laberinto elevado en cruz y campo abierto.....	74
7	DISCUSIÓN.....	79
7.1	Efectos en la memoria por la manipulación farmacológica del GPR35	79
7.2	Efectos en la respuesta ansiosa por la manipulación del GPR55 del área gris periacueductal dorsal (PAG)	82
8	CONCLUSIONES	85
9	REFERENCIAS.....	85
10	ANEXO	99
10.1	Fórmula para el coeficiente de enterramiento.....	99

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Lista de acrónimos.....6
 Cuadro 2. Parámetros tomados en cuenta para la prueba de campo abierto (Gould et al., 2009). .45

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema integrador sobre los xenobióticos que pueden actuar en el sistema nervioso vía receptores cannabinoides clásicos, pero también con los receptores GPR35 y GPR55.....10
Figura 2. Manipulación farmacológica de GPR35 en cultivos celulares hipocampales. Nótese que la administración de antagonista ML145 (1µM) incrementa la actividad de las neuronas por el aumento por de cuentas por minuto de calcio. Caso contrario cuando el receptor es activado. Tomado de (Alkondon et al., 2015).17
Figura 3. Vías de señalización de GPR35 $G\alpha_{i/o}$ y $G\alpha_{13}$ (Mackenzie & Milligan, 2017).21
Figura 4. Vías de señalización que sigue GPR55 una vez es activado por algún agonista como el LPI y cuyo paso final es la expresión de diferentes genes involucrados con migración, proliferación y diferenciación celular (Falasca & Ferro, 2016a).....27
Figura 5. (A) Secuencia para el fortalecimiento de una sinapsis, una sinapsis fuerte en una neurona despolarizada genera una espiga dendrítica que se expande a las otras dendritas y aquellas sinapsis débiles activas en las que haya presencia de glutamato, se fortalecerán. (B) Esquema del espacio sináptico con el mecanismo bioquímico para el fortalecimiento de la sinapsis, nótese el mecanismo propuesto para la síntesis presináptica del glutamato (Carlson, 2005).32
Figura 6. Vía CREB para la consolidación de la memoria, las tres vías de activación por (i) GPRCR, (ii) RTK y (iv) NMDA y/o VDCC (Kaldun & Sprecher, 2019).34
Figura 7. Clasificación de la memoria declarativa, nótese la importante participación del hipocampo en la formación de este tipo de memoria (Sharma et al., 2010).35
Figura 8. Disposición anatómica de los núcleos del sistema límbico involucrados en la respuesta ansiosa y la vía neuroendocrina de respuesta al estrés HPA.....38
Figura 9. Efecto del receptor GPR35 sobre los canales de calcio $Ca_{v2.2}$ o de tipo-N (J. Guo et al., 2008; Kang et al., 2006a).....42
Figura 10. Disposición del paradigma de laberinto en Barnes (Pitts, 2018)43
Figura 11. Disposición del campo abierto (Gould et al., 2009).....45
Figura 12. Configuración de un laberinto elevado en cruz convencional (Kraeuter et al., 2019).46
Figura 13. Disposición del paradigma de enterramiento defensivo (Fucich & Morilak, 2018).47
Figura 14. Objetivos PRONACES-CONACyT y objetivo tercero de la ONU, esta investigación contribuye con la generación de conocimiento en el área de la salud.48
Figura 15. Pasos preparativos al inicio de la cirugía estereotáctica.50
Figura 16. Secuencia de los pasos a seguir durante la cirugía estereotáctica.50

Figura 17. Diseño experimental de los tratamientos para GPR35 y GPR55, se empleó una n=10 para cada grupo experimental.51

Figura 18. Fases del laberinto en Barnes para la evaluación de la memoria espacial, la habituación y el primer entrenamiento ocurrieron el primer día, pero la disposición del túnel de escape cambia y permanece constante en los subsecuentes entrenamientos, en el quinto día se hizo el “test” en donde se remueve el túnel de escape y se analiza la interacción de la rata con la posición de escape.
53

Figura 19. Simplificación de las tres etapas fundamentales para la evaluación de la respuesta ansiosa etológica de la rata en el paradigma de campo abierto y laberinto elevado en cruz.55

Figura 20. Etapas para la medición de la respuesta ansiosa por evitación activa en el paradigma de enterramiento defensivo.56

Figura 21. Análisis histológico para la validación de la cirugía estereotáxica partiendo de la (1) craneotomía para la extracción de cerebro, (2) el corte histológico en frío, (3) tinción con violeta de cresilo y metodología para el análisis de datos partiendo del (1) Tracking de los videos con Fiji(ImajeJ), (2) Obtención de las medidas de los parámetros evaluados, (3) Análisis estadístico.58

Figura 22. Latencia de escape al túnel en el paradigma de laberinto de Barnes para la evaluación de la memoria espacial. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. **, p < 0.05; β, p < 0.05 vs. ML194 (4.92 nmol); δ, p < 0.05 vs. ML194 + GPR35C10, σ, p < 0.05 vs. DMSO 10%.59

Figura 23. Distancia de entrada al túnel en el paradigma de laberinto de Barnes para la evaluación de la memoria espacial. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. **, p < 0.05; α, p < 0.05 vs. GPR35C10 (1.79 nmol); σ, p < 0.05 vs. DMSO 10%.60

Figura 24. Cambio en la latencia de entrada al túnel de escape por sesiones y tratamientos. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante RM-ANOVA de dos vías. *, p < 0.05; α, p < 0.05 vs. el resto de los grupos.....61

Figura 25. Cambio en la distancia de entrada al túnel de escape por sesiones y tratamientos. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante RM-ANOVA de dos vías. *, p < 0.05; α, p < 0.05 vs. el resto de los grupos.....62

Figura 26. Permanencia de las ratas en el cuadrante nativo del túnel de escape y cuadrantes no nativos del túnel de escape. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante comparaciones no pareadas t-Student. *, p < 0.05.....63

Figura 27. Distancia recorrida por las ratas de estudio en el cuadrante nativo del túnel de escape y cuadrantes no nativos del túnel de escape. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante comparaciones no pareadas t-Student. *, p < 0.05.....64

Figura 28. Recorrido en el área de visita del túnel de escape, por tratamientos. Los datos están expresados como media ± SEM y fueron analizados mediante análisis ANOVA de una vía. *, p < 0.05.
65

Figura 29. Descripción gráfica de las trayectorias características de cada estrategia.....65

Figura 30. Porcentaje de estrategia serial, aleatoria y espacial para la resolución del laberinto de Barnes. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$66

Figura 31. Cambio en el porcentaje de estrategias serial y aleatorio por tratamiento y sesiones. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante análisis RM-ANOVA de doble vía. *, $p < 0.05$67

Figura 32. Cambio en el porcentaje de estrategia espacial por tratamiento y sesiones. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante RM-ANOVA de dos vías. *, $p < 0.05$; β , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.....68

Figura 33. Esquematización de las estrategias empleadas por una rata representativa de cada grupo.
69

Figura 34. Análisis histológico de los grupos vehículo (DMSO 10%), agonista (1.79 nmol) y ML194 (4.92 nmol) en el hipocampo.....70

Figura 35. Conducta de enterramiento en función de la altura de la pila y el tiempo de enterramiento. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.71

Figura 36. Gráfico del coeficiente de enterramiento en el paradigma de enterramiento defensivo. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante una ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.72

Figura 37. Conducta motora en enterramiento defensivo. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; σ , $p < 0.05$ vs. DMSO 10%, β , $p < 0.05$ vs CID16020046 (1.16 nmol)73

Figura 38. Conducta defensiva y de escape en el paradigma de enterramiento defensivo. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$.
74

Figura 39. Tiempo en brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; δ , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.....75

Figura 40. Navegación en brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; δ , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.....76

Figura 41. Tiempo en los cuadrantes externos y cuadrantes internos del paradigma en campo abierto. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$77

Figura 42. Navegación en los cuadrantes internos y externos del paradigma de campo abierto. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; δ , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.....78

Figura 43. Frecuencia de la conducta exploratoria en el paradigma de campo abierto. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; σ , $p < 0.05$ vs. DMSO 10%, α , $p < 0.05$, vs. ML184 (4.92 nmol).78

Figura 44. Análisis histológico de los grupos vehículo (DMSO 10%), agonista ML184 (0.425 nmol) y CID16020046 (1.16 nmol) en PAG.79

ACRÓNIMOS

Cuadro 1. Lista de acrónimos.

Lista de acrónimos			
Acrónimo		Acrónimo	
2-AG	2-Araquinodoil glicerol	LC	Locus Cerúleo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica	LPA	Ácido lisofosfatídico
CaM-KII	Calcio calmodulina cinasa tipo II	LPI	α -lisofosfatidilinositol
CB₁	Receptor a cannabinoides 1	LTP	Potenciación a largo plazo
CB₂	Receptor a cannabinoides 2	NA	Noradrenalina
CeA	Núcleo central de la amígdala	NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
CREB	Vía molecular de la proteína de Respuesta de unión al elemento de cAMP	NT	Neurotransmisor
CRF	Factor liberador de corticotropina	OMS	Organización Mundial de la Salud
DG	Giro dentado	PAG	Área gris periacueductal
D-PAG	Área gris periacueductal dorsal	PEP	Potenciales de acción excitatorios postsinápticos
GAD	Desorden de ansiedad generalizado	PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
GAS	Síndrome de adaptación general	RTK	Receptores de tirosina-quinasa
GC	Glucocorticoides	SNA	Sistema Nervioso Autónomo
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G	SNC	Sistema nervioso central
GPR35	Receptor acoplado a proteína G 35	VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55	Δ^9-THC	Tetrahidrocannabinol
HPA	Eje Hipotálamo Pituitaria Adrenal		

RESUMEN

Los receptores GPR35 y GPR55 se expresan en sistema nervioso central, pero sus funciones fisiológicas, farmacológicas y toxicológicas se han documentado escasamente. El GPR35 se expresa abundantemente en neuronas piramidales del hipocampo; mientras GPR55 lo hace en el área gris periacueductal (PAG). GPR35 se acopla a proteínas $G\alpha_{i/o}$ pudiendo tener un efecto deletéreo en la actividad neuronal hipocampal y GPR55 se acopla a proteínas $G\alpha_{12/13}$ y $G\alpha_q$, con posible efecto modulador de la respuesta ansiosa, cuando son manipulados farmacológicamente. La administración i.c.v., del agonista GPR35C10 y del antagonista ML194 (CID2745687), selectivos para GPR35 permitieron evaluar el efecto de este sobre la función hipocampal mediante el laberinto de Barnes. La función de GPR55 en PAG se evaluó en función de la administración i.c.v., del agonista ML184 (CID244043) y el antagonista CID16020046 y mediante los paradigmas de enterramiento defensivo, laberinto en cruz y campo abierto para la medición de la respuesta ansiosa. El bloqueo de GPR35 redujo el tiempo ($p<0.001$) y la distancia ($p<0.01$) de resolución del laberinto de Barnes y contrariamente, un incremento en el tiempo y distancia que le tomó a la rata cuando este fue activado. La activación de GPR35 provocó una disminución en el porcentaje de estrategia espacial ($p<0.05$) y un incremento en el porcentaje de estrategia aleatoria ($p=0.016$). El GPR55 activado en enterramiento defensivo provocó una disminución en la respuesta de confrontación activa (lucha) ($p=0.028$) reflejado en una menor altura de la pila de aserrín ($p<0.05$) y un mayor tiempo inmóvil ($p<0.002$). El tratamiento conjugado antagonista/agonista mostró efectos ansiolíticos en laberinto en cruz y campo abierto con un mayor tiempo en los brazos abiertos ($p=0.025$) y frecuencia de exploración ($P=0.024$). Nuestros hallazgos sugieren la función inhibitoria de GPR35 en la función hipocampal y la modulación de la respuesta activa de confrontación en PAG por GPR55.

ABSTRACT

GPR35 and GPR55 are both expressed in the central nervous system, but their physiological, pharmacological, and toxicological effects remain barely characterized. GPR35 is majority expressed in pyramidal hippocampal neurons, whereas GPR55 is in the periaqueductal gray (PAG). GPR35 follows a $G\alpha_{i/o}$ signaling pathway and might be responsible for an inhibitory effect in hippocampal activity while GPR55 follows $G\alpha_{12/13}$ and $G\alpha_q$ signaling pathways with

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a possible effect on anxiety behavior. Both GPR35 agonist (GPR35C10) and antagonist ML194 (CID2745687) administered i.c.v., allowed analyze the effect on the hippocampal function by the Barnes maze paradigm. GPR55 function in PAG was tested by the i.c.v. administration of agonist ML184 (CID244043) and the antagonist CID16020046 using the burying test, plus maze and open field paradigms to measure the anxiety behavioral response. GPR35 blockade reduced the time ($p < 0.001$) and the distance ($p < 0.01$) in which each rat solved the labyrinth contrary to the increase in time and distance when the receptor was activated. GPR35 activation promotes a decrease in the spatial strategy percentage ($p < 0.05$) followed by an increase in the random strategy percentage ($p = 0.016$). Activated GPR55 in the defensive burying paradigm showed a decrease in the active coping response (fight) ($p = 0.028$) referred to a less burying behavior by a small pile height ($p < 0.05$) and an increase in freezing time ($p < 0.002$). The conjugated treatment antagonist/agonist showed anxiolytic effects in the plus maze and open-field paradigm with a higher time in the open arm of the plus maze ($p = 0.025$) and a higher exploratory frequency (*Rearing*) ($p = 0.024$). Our findings suggest the inhibitory function of GPR35 in the hippocampal function and GPR55 facilitates a less intense active coping response in PAG.

INTRODUCCIÓN

El ser humano se encuentra en contacto continuo con múltiples sustancias: provenientes del ambiente, por exposición ocupacional en los trabajos, por cuestiones de salud (*e.g.*, ante la ingesta de medicamentos) o por el consumo de alimentos. Los efectos que estos compuestos pueden producir son variados y la respuesta dependerá de las interacciones a nivel molecular, celular y fisiológico que se establezcan con dichos xenobióticos (Klaassen & Watkins, 2019). Esta situación puede pasar inadvertida, prolongarse en el tiempo y traer como consecuencia problemas de salud. Algunos xenobióticos pueden afectar la función de los aparatos y sistemas humanos. Sin embargo, el sistema nervioso central es particularmente susceptible, ya que sus procesos de regeneración suelen ser limitados y muchos de los efectos de estas sustancias, que incluyen alteraciones en la conducta, suelen ser subestimados (Sharif et al., 2023).

En el sistema nervioso, se expresan múltiples receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que responden a neurotransmisores y mediadores clásicos, por mencionar algunos: glutamato, glicina, serotonina, etc. Sin embargo, para los GPCRs de reciente descubrimiento (e.g., GPR35 y GPR55) se desconocen muchas de sus funciones y existe controversia sobre el ligando endógeno con el que interactúan, éstos son denominados receptores huérfanos. La importancia de este tipo de receptores radica en que pueden representar nuevas dianas terapéuticas y/o pueden explicar algunos de los efectos no deseados a los xenobióticos en general.

Todos los GPCR tienen en común siete dominios transmembranales con tres giros extracelulares e intracelulares, sin embargo, existen diferencias funcionales entre ellos que los ha llevado a ser agrupados en seis familias: Los receptores de la **familia A** de la rodopsina que por lo general son pigmentos visuales, receptores afines a péptidos, nucleótidos y monoaminas, **la familia B** de los receptores de la secretina también afines a péptidos, **la familia C** de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos, **la familia D** de la feromona fungal P y los receptores α -factor, **la familia E** de la feromona fungal A y el factor M y **la familia F** de los receptores cAMP (Harmar, 2001). En el grupo A de receptores de la familia de la rodopsina existen 60 receptores huérfanos (Fricker & Devi, 2018), tal es el caso del GPR55 considerado como un receptor putativo a cannabinoides diferente a los receptores cannabinoides tipo 1 y tipo 2 (CB₁ y CB₂, respectivamente). Por otro lado, otro receptor huérfano, el GPR35 posee la mayor homología genética con el GPR55 que por el resto de los receptores acoplados a proteínas G. Lo cual llevó en un inicio a vincularlos con el sistema endocannabinoide. No obstante, este receptor no posee afinidad para los mediadores a cannabinoides clásicos, de hecho, se ha propuesto que su ligando endógeno sea el ácido quinurénico proveniente de la vía metabólica no proteica del triptófano (J. Wang et al., 2006) y los lisofosfolípidos como ácido 2-oleíl- lisofosfatídico ya que ambos ligandos incrementan la concentración del calcio intracelular [Ca⁺²]_i en cultivos celulares *in vitro* que expresan GPR35 (Oka et al., 2010).

Compuestos farmacéuticos como la lodoxamida, que se usa para tratar conjuntivitis alérgica, la furosemida usada como un antidiurético y el zaprinast que modula la liberación del óxido nítrico involucrado en la vasodilatación; tienen afinidad por GPR35 (Divorby et al.,

2015; Oh & Han, 2015; S. J. Park et al., 2018; Schermuly et al., 2005). GPR55 interactúa con lisofosfatidilinositol siendo este su ligando endógeno. Esta interacción desencadena cascadas de señalización relevantes para la proliferación, migración y supervivencia celular, la aparición de algunos tipos de cáncer y efectos antiinflamatorios en la microglía, etc (Falasca & Ferro, 2016a; Minamihata et al., 2020). El consumo de sustancias para uso recreativo como lo es el delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) que se encuentra en *Cannabis sativa* y fármacos como palmitoiletanolamina empleada para el tratamiento de padecimientos dolorosos e inflamatorios también interaccionan con GPR55 por lo que pudiera ser que este receptor se vea involucrado en la fisiología detrás del dolor y de la inflamación (Ryberg et al., 2007a). Los compuestos de origen sintético CID16020046 y ML194 han sido diseñados como antagonistas selectivos de los receptores GPR55 y GPR35, respectivamente y los compuestos sintéticos ML184 y GPR35C10 han sido diseñados como agonistas selectivos para GPR55 y GPR35 en el mismo orden (Figura 1) (Kargl et al., 2013a; Thimm et al., 2013a).

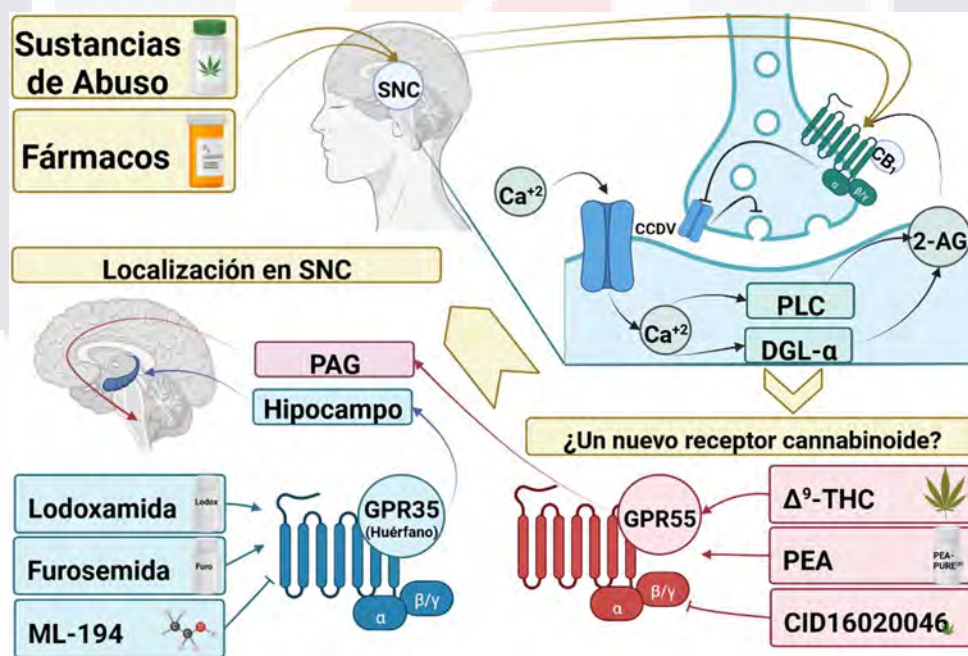


Figura 1. Esquema integrador sobre los xenobióticos que pueden actuar en el sistema nervioso vía receptores cannabinoides clásicos, pero también con los receptores GPR35 y GPR55.

El GPR55 se expresa en el área gris periacueductal dorsal (PAG) y este hallazgo fue descrito por primera vez en un estudio de dolor (Deliu et al., 2015). Además de relacionarse

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con el dolor, PAG forma parte del sistema límbico y se ve inmersa en una red funcional de circuitos neuronales de integración de estímulos estresores (*e.g.*, estímulos neurotrópicos: agorafobia, presencia de predador, evento doloroso o estímulos sistémicos: presencia de histamina, glucocorticoides, xenobióticos etc.) comprendida principalmente entre el tálamo, el núcleo central de la amígdala (CeA), el locus cereleus (LC) y D-PAG encargada de organizar y seleccionar la respuesta defensiva conductual apropiada en función de la información de intensidad del estímulo proveniente de CeA y LC ante estímulos amenazantes (Graeff et al., 1993).

Existe evidencia, de que hay una población de receptores GPR35 localizados en interneuronas en la región CA₁ hipocampal; área importante en la adquisición de memoria y el aprendizaje (Alkondon et al., 2015). Este receptor sigue una vía de señalización del tipo Gα_{i/o} en el SNC y se le ha una función neuroprotectora al inhibir la liberación de vesículas con NT. Inhibe a los canales de calcio dependientes de voltaje, inhibe a la adenilato ciclasa y apertura los canales de potasio hiperpolarizando a las neuronas y por ende pudiera prevenir sucesos dañinos de excitotoxicidad o bien como modulador de la plasticidad neuronal (Divorty et al., 2015).

Desórdenes de la conducta, como los trastornos de ansiedad (*e.g.*, trastorno generalizado de ansiedad, ataque de pánico y ansiedad social) y alteraciones en el aprendizaje y memoria se han incrementado en los últimos años. Se trata de fenómenos multifactoriales con causas psicosociales y biológicas que se interrelacionan entre sí y en donde participan vías fisiológicas como el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) que es una vía neuroendócrina de respuesta al estrés, potenciación a largo plazo (LTP) y cambios en la neuroplasticidad (en la memoria y aprendizaje) (Perez-Fernandez et al., 2019). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2015, 264 millones de personas padecieron trastorno de ansiedad a nivel mundial, es decir, aproximadamente un 3.6% de la población mundial (presentando un incremento del 14.9% con respecto a 2005). El continente americano fue en donde más prevalencia tuvo este padecimiento, afectando al 8% de su población (World Health Organization, 2017). Un estado de estrés crónico desencadena el trastorno generalizado de ansiedad (GAD) cuyos efectos colaterales involucra activación del sistema nervioso autónomo (SNA), trastornos en el sistema inmune, en el sistema cardiovascular,

alteraciones del sueño y trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina que eventualmente deriva en diabetes mellitus. La activación del SNA se da por acción de una activación constante del eje HPA por estados crónicos de estrés que culmina en la síntesis de catecolaminas y de glucocorticoides (GC) en las glándulas suprarrenales (Steimer, 2002). La liberación de NA por activación de SNA facilita la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos en los macrófagos desencadenando respuestas inflamatorias y en general un efecto depresor en la respuesta inmune innata (Barnes et al., 2015)..

El estrés y la memoria están interrelacionados, siendo otro efecto fisiopatológico de un estado de estrés crónico, la afectación a la memoria. Cuando existe un cuadro crónico de estrés, se da la activación del eje HPA que provoca un deterioro en la memoria por atrofia hipocampal. Elevados y persistentes niveles de glucocorticoides dañan a las neuronas maduras en el hipocampo, haciéndolas más susceptibles a excitotoxicidad por el glutamato, además de que afecta a la neurogénesis. El hipocampo es importante en la modulación de la secreción de glucocorticoides, participa con una retroalimentación negativa en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y restringe la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) provocando una disrupción en la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y finalmente evita la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal, pero un hipocampo dañado no modula esta vía eficientemente por lo que se da un ciclo continuo y desregulado que daña al hipocampo atrofiándose cada vez más (Kandel, 2013). La interrelación existente entre estrés y memoria y la fisiopatología que pudiera aparecer como producto de un cuadro de estrés crónico como lo es GAD, abre la ventana para la búsqueda de dianas terapéuticas dirigidas a los sitios anatómicos involucrados (D-PAG y CA1 hipocampal) en donde, como ya se ha mencionado, se expresan los receptores de reciente descubrimiento GPR55 (en D-PAG) y GPR35 (en hipocampo) y que poco han sido explorados en SNC pero que pudieran tener algún efecto terapéutico en tal caso.

En este trabajo se analizó el efecto farmacológico de la activación/bloqueo del GPR35 hipocampal y el GPR55 de PAG sobre la navegación y memoria espacial y diversas pruebas de ansiedad etológica y de evitación activa, respectivamente. Como sujetos de estudio se emplearon a la rata macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*). Para tal efecto se recurrirá la administración vía ICV bilateral del agonista sintético GPR35 Compuesto 10 (GPR35C10,

Merck[®]) y antagonista sintético ML194 (Merck[®]) para el receptor GPR35 en el hipocampo dorsal de la rata. También se administrará i.c.v., unilateral dorsal el agonista sintético ML184 (Merck[®]) y antagonista sintético CID16020046 (Merck[®]) para el receptor GPR55 en PAG de la rata. Se realizaron las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el paradigma laberinto en Barnes y para la medición de la conducta ansiosa se usaron los paradigmas de laberinto elevado en cruz, campo abierto y enterramiento defensivo.

Finalmente, se espera que, los resultados de este estudio permitan entender algunas de las posibles funciones del receptor huérfano GPR35 expresado en hipocampo en la memoria y navegación espacial, así como del papel que tiene el receptor GPR55 de PAG sobre la modulación de la ansiedad etológica y la evitación activa.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 *Marco histórico: Investigación de la memoria*

El estudio de la memoria como evento neurofisiológico tuvo su auge con los aportes de Santiago Ramón y Cajal en 1898 cuando identificó a la neurona como la entidad individual, anatómica, fisiológica, metabólica y genética del sistema nervioso (Mateos-Aparicio & Rodríguez-Moreno, 2019), describió los procesos de degeneración y generación del sistema nervioso, siendo un precedente para la explicación de los procesos neuroplásticos. Por el mismo tiempo Iván Petrovich Pavlov realizó ensayos para el estudio del aprendizaje condicionado (Rozo & Rodríguez-Moreno, 2015).

En los últimos 70 años, la investigación de la memoria tuvo su auge a partir de la investigación postdoctoral de Brenda Milner en 1952 con el paciente amnésico Henry Molaison (H.M.) al que se le extrajeron los dos lóbulos temporales. La extracción de los lóbulos temporales provocó el olvido de la información tan rápido como era asimilada, sin verse afectadas las capacidades intelectuales, postulándose que la memoria es una función cerebral distinta a las habilidades cognitivas. Se categorizaron múltiples sistemas de la memoria: la memoria primaria o inmediata que consiste en la retención de la información en el momento y la memoria secundaria que consiste en la evocación de recuerdos. La memoria declarativa se refiere a la evocación consciente de información de hechos y eventos regida

por el giro hipocampal y el hipocampo anterior, mientras que la memoria no declarativa o de procedimiento se refiere al conocimiento basado en habilidad que se desarrolla gradualmente sin reportar lo que se está aprendiendo por lo que se adquiere de manera no consciente siendo las áreas cerebrales participantes los ganglios de la base, cerebelo, amígdala y la neocorteza. Un tercer sistema; la memoria remota que consistió en la evocación de información adquirida mucho tiempo previo a la cirugía del paciente H.M., (Squire, 2009).

En los setenta en la publicación *The Hippocampus as a cognitive map* se describieron las “células de lugar” adjudicando una función espacial a las células del hipocampo (O’Keefe & Nadel, 1978). La potenciación a largo plazo (LTP) descrita por primera vez por Bliss y Lomo en 1973 en el giro dentado hipocampal es similar al supuesto Hebbiano para el fortalecimiento de las sinapsis en donde se vieron involucrados los receptores NMDA y AMPAR (Bliss & Lomo, 1973). El diseño de dispositivos y paradigmas como el laberinto radial de Olton y Samuelson (1976), el laberinto de Barnes (1979) y el laberinto de agua de Morris (1981) permitieron llevar a cabo el análisis conductual del aprendizaje y evidenciar el vínculo que existe entre LTP hipocampal y la memoria espacial. En la actualidad, el estudio de la memoria se centra en el entendimiento de los mecanismos neuroplásticos a través de las vías fisiológicas que regulan la expresión de genes para el reordenamiento de la sinapsis, la modificación genética de las células para evaluar segunda mensajería involucrada en aprendizaje y de memoria y las tecnologías de imagen de resonancia magnética (MRI) que cuantifica la actividad neuronal en las regiones involucradas en el aprendizaje y la memoria (Aggleton & Morris, 2018).

1.1.2 Marco histórico: Investigaciones en la ansiedad

Previo a la era de investigación científica de lo que hoy día se entiende por estrés referente a todos los estados emocionales aberrantes se trataban de interpretaciones subjetivas y los tratamientos para estos padecimientos no eran apegados a la clínica dado que no se conocía la componente fisiológica.

Fue hasta mediados del siglo XX cuando Hans Selye propuso la teoría del estrés. Incluyó por primera vez el término “estrés” y en un principio se refirió a este como “la respuesta inespecífica del cuerpo ante cualquier demanda” y al estado crónico de estrés lo definió como el síndrome de adaptación general (GAS). Por las mismas fechas, Walter B. Cannon definió

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

al estrés en términos de una triada de respuestas; endócrinas, autónomas e inmunes. Sayers en 1950, intentó encontrar el elemento bioquímico encargado de mediar la liberación de ACTH, es decir; al factor liberador de corticotropinas (CRF) que durante algún tiempo se creyó fue la epinefrina y tal supuesto fue elaborado por Long en 1952 ya que él observó que como respuesta al estrés se daba un incremento en la secreción de adrenalina en la médula adrenal y esta actuaba directamente en la pituitaria induciendo la secreción de ACTH, sin embargo; Sayer tuvo otra explicación en función de los niveles de glucocorticoides en sangre; en donde bajo condiciones de estrés los tejidos periféricos utilizan a los GCs más rápidamente lo que ocasiona una baja en los niveles en sangre lo que estimula la pituitaria anterior y se da la inmediata secreción de ACTH (Steckler et al., 2005). Independientemente de si los mecanismos propuestos eran acertados o no, es importante resaltar que hasta este punto y en poco tiempo ya se había identificado a las suprarrenales y a la pituitaria como centros anatómicos funcionales en la respuesta a estrés.

Los experimentos de Marthe Vogt en 1952 demostraron que la remoción de la médula de las suprarrenales redujo los niveles de adrenalina circulante a casi cero, pero seguía habiendo una reducción de ácido ascórbico en la adrenal desmedulada, esto refutó la teoría de Long sobre que la adrenalina es el CRF detrás de la liberación de ACTH (Vogt, 1952). La búsqueda por el CRF continuó con los aportes de Roger Guillemin y Andrew Schally (1977) cuando se enfocaron en el hipotálamo y la comunicación portal que establecía este con la pituitaria por lo que se realizaron extractos hipotalámicos para dar con la molécula CRF encargada de la liberación de ACTH, propusieron a la vasopresina pero este no fue el caso puesto que Vale y colaboradores en 1981 clonaron a los genes de los receptores CRF1 y CRF2 lo que eventualmente dio lugar a la identificación de la urocortina 1 y 2 (péptidos de afrontamiento al estrés) y la urocortina 3 (estrescopina) como los ligandos endógenos y con una presencia significativa en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Este último descubrimiento estableció al eje HPA y se destacó su función primordial en los mecanismos adaptativos de respuesta al estrés (Vale et al., 1981).

Las funciones de los glucocorticoides en el sistema nervioso son una red compleja de efectos estimulantes, permisivos y supresivos (Sapolsky et al., 2000). En la década de los ochenta, se encontraron receptores a glucocorticoides en regiones del CNS fuera de las

estructuras hipotalámicas y preópticas, postulándose que los efectos de los glucocorticoides podrían ir más allá de la regulación de la respuesta a estrés. En el hipocampo, en las neuronas del giro dentado se descubrió una población de receptores a GC y que desde entonces se les adjudicó influencia en los procesos de aprendizaje espacial y de memoria, sin embargo, la función del hipocampo más importante en términos de estrés fue la retroalimentación negativa de GR que inhibe la secreción de ACTH y permite retornar a los niveles basales de GR (De Kloet & Reul, 1987).

Hasta la fecha, no se ha logrado delimitar el concepto de estrés, pues sigue siendo un término impreciso que se podría referir a los eventos que inducen a las respuestas de estrés o a la respuesta en sí misma, esto se tenderá a esclarecer con forme se avance con las investigaciones en el área (Carlson, 2005).

1.1.3 Marco histórico; GPR35 Y GPR55

El estudio de los GCPR se remonta al descubrimiento de la rodopsina a finales del siglo XIX por el fisiólogo Franz Christian Boll, siendo secuenciada por primera vez en la década de los ochenta y su estructura tridimensional elucidada hasta la década de los noventa. El avance continuo en el descubrimiento de nuevos GCPRs requirió que se les agrupase por familias de la A a la F, siendo la de la rodopsina (Familia A) la más grande y con al menos el 80% de los GCPR que se conocen. Son dianas terapéuticas de gran relevancia y hasta la fecha el 50% de las drogas tienen como objetivo a alguno de estos receptores, únicamente se han utilizado fármacos para el 10% de los receptores conocidos en el genoma humano por lo que el potencial terapéutico se explora de manera continua (Hu et al., 2017).

Los receptores GPR35 y GPR55 son de reciente descubrimiento y desde su clonado en 1997, las investigaciones se han centrado en encontrar un ligando endógeno. La expresión de GPR35 se reportó inicialmente en el intestino de la rata y de GPR55 en el cerebro, sobre todo en el putamen y en el núcleo caudado (O'dowd et al., 1998; Sawzdargo et al., 1999). El GPR35 se encontró expresado moderadamente en SNC cuando fue descubierto, pero, diez años después se realizaron ensayos farmacológicos observándose la inhibición de canales de Ca^{+2} tipo N en neuronas periféricas de la rata asociándosele principalmente una función inhibitoria en la excitación neuronal y en la liberación de las vesículas presinápticas (J. Guo et al., 2008). A nivel de SNC, un análisis de inmunofluorescencia permitió localizar a GPR35

en neuronas piramidales del hipocampo en la región CA₁ además de que se realizaron cultivos celulares hipocampales a los cuales se les administró agonistas sintéticos para GPR35 como zaprinast y dicumarol, éstos disminuyeron la actividad neuronal al observarse una baja en las cuentas por minuto de ingreso de calcio extracelular y caso contrario, cuando se administró antagonista ML145 se observó un incremento de la actividad neuronal sobre el tono basal (Figura 2) (Alkondon et al., 2015).

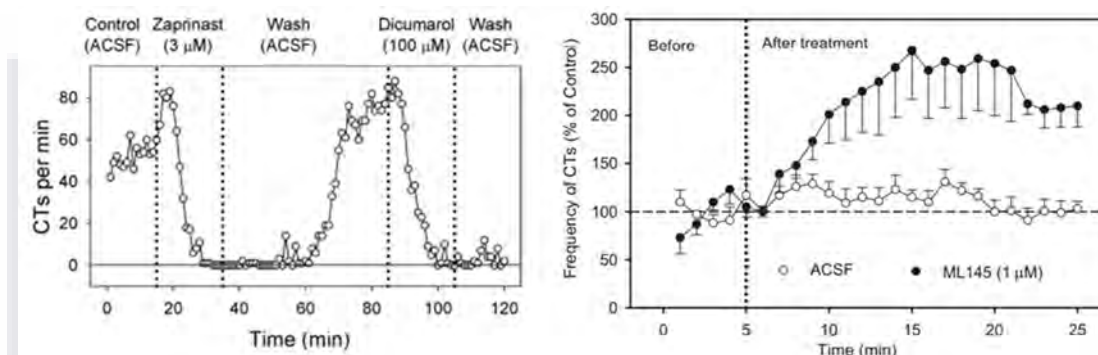


Figura 2. Manipulación farmacológica de GPR35 en cultivos celulares hipocampales. Nótese que la administración de antagonista ML145 (1 μ M) incrementa la actividad de las neuronas por el aumento por de cuentas por minuto de calcio. Caso contrario cuando el receptor es activado. Tomado de (Alkondon et al., 2015).

Los receptores GPR35 Y GPR55 son evolutivamente similares con una homología aproximadamente del 51% en humanos y 44% en ratas, encontrándose adyacentes en el árbol filogenético y esta relación ha servido para la localización de los ligandos endógenos entre sí (Yamashita et al., 2013). Primerio se encontró que el α -lisofosfatidil-inositol (LPI) es el ligando endógeno de GPR55, mediante el estudio concluyente de Oka S., et al. (2007), y sus investigaciones se centraron en la búsqueda de moléculas estructuralmente similares al LPI que pudieran ser afines a GPR35. Se encontró que el ácido 2-acil-lisofosfatídico (2-acil LPA) a concentraciones del orden de 10^{-8} M promueven la movilización de Ca^{2+} intracelular y la fosforilación de Rho designado como molécula candidata para ocupar el lugar de ligando endógeno además del ácido quinurénico (Oka et al., 2010). Previamente, el ácido quinurénico había sido propuesto como el ligando endógeno para GPR35 y fue el primer compuesto en ser contemplado ya que su vía de síntesis endógena es por el metabolismo no proteico del triptófano en la vía de la quirunenina. En estudios *in vitro* de cultivo celular HEK293 con una proteína G quimérica G_{qi/o}, la movilización de Ca^{2+} y la acumulación de IP₃ se midieron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y se observó una relación dosis dependiente al exponer el cultivo a concentraciones de ácido quinurénico a partir del orden de 10^{-6} M (J. Wang et al., 2006). Una concentración elevada como la anterior es cuestionable para una molécula que se pretende sea endógena, por lo que se ha desacreditado (más no descartado) al ácido quinurénico y en contraparte se ha reforzado al 2-acil LPA, que además se encuentra presente en SN.

Paralelamente a la identificación del LPI como el ligando endógeno de GPR55; anandamida, 2-araquinoilglicerol y N-palmitoiletanolamina mostraron afinidad por el receptor GPR55 siendo estas moléculas endocannabinoides y postulando la posibilidad a que GPR55 pudiera ser un nuevo receptor a cannabinoides diferente a los clásicos CB₁ y CB₂, (Ryberg et al., 2007), sin embargo; este receptor es afín a moléculas que no son cannabinoides y esto vuelve controversial el hecho de considerarlo como un nuevo receptor cannabinoide.

En la actualidad se continúa explorando el potencial terapéutico de GPR35 y GPR55 incluso en áreas independientes al SNC. Se ha sugerido que GPR35 tiene un potencial cardioprotector, previene de la falla cardiaca y de la arteriosclerosis, mejorar las condiciones en pacientes con síndrome metabólico y en conjunto con el GPR55, modula la inflamación y dolor neuropático (MacKenzie et al., 2011). Sin embargo; ambos receptores se ven involucrados en progresión de algunos tipos de cáncer por lo que es de gran relevancia continuar con las investigaciones sobre GPR35 y GPR55.

1.2 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G (GPCRs)

La detección de las señales extracelulares desencadena una transmisión intracelular caracterizada por la activación cascadas de señalización que tiene como destino final la modulación de algún proceso molecular en el núcleo, retículo endoplasmático, síntesis de factores de transcripción, movilización de calcio intracelular, etc., (Okada et al., 2001).

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) son un tipo de proteína receptora con unidades proteicas transmembranales acopladas a un heterotrímero de subunidades α , β y γ . Todos los receptores pertenecientes a este grupo comparten una misma estructura de siete dominios conformados en una α -hélice. El nombre que de este tipo de receptores se debe a la activación de proteínas heterotriméricas guaniladas de unión a nucleótidos denominadas

proteínas G. Esta super familia de receptores se conforma por 950 genes conocidos del genoma humano de los cuales 500 tienen que ver con funciones sensoriales (Palczewski, 2006). El 60% de las drogas comerciales existentes están dirigidas para uno o varios de los receptores GPCR ya caracterizados, sin embargo, de los casi mil receptores, aproximadamente cien GPCR no tienen un ligando endógeno conocido (Reggio & Shore, 2015).

Los GPCR tienen una elevada importancia, ya que se encuentran expresados en las membranas celulares de todos los tejidos del cuerpo humano. Además, los GPCRs median las respuestas a la mayoría de las hormonas, metabolitos, citoquinas, neurotransmisores y son usados como objetivos terapéuticos para el tratamiento de fisiopatologías (Basith et al., 2018).

A pesar de las funciones y estructuras tan diversas que presentan estos receptores, todos los tipos de GPCRs tienen en común regiones estructurales altamente conservadas que permite realizar una clasificación en función de dichas secuencias. Actualmente, se clasifican en las seis clases A, B, C, D, E y F. La clase A corresponde a los receptores del grupo de la Rodopsina y es el grupo más importante porque contiene al 80% de todos los GPCRs en humanos, la clase B se refiere a los receptores acoplados a proteína G del grupo receptor de secretina, el grupo C corresponde a los receptores más complejos glutamatérgicos metabotrópicos y a los receptores GABA, la clase D a receptores sensibles a feromonas (sobre todo en artrópodos), la clase E corresponde a receptores cAMP y una última clasificación F que es la más pequeña y tiene que ver con la vía de señalización Wnt encargada de la polarización celular durante el desarrollo embrionario (Davies et al., 2008). Se hace especial énfasis en a la familia de receptores de la rodopsina (Los GPCR de la familia A) siendo el referente estructural que ha servido para el estudio y predicción de las características de otros GPCR (Fotiadis et al., 2006). El receptor de la rodopsina se encuentra localizado en la retina, de manera específica en las estructuras celulares en forma de bastón del disco interno de las estructuras fotorreceptoras siendo los fotones el ligando de este receptor.

1.2.1 Farmacología y Fisiología del receptor GPR35

El receptor acoplado a proteína G 35 (GPR35) es un receptor transmembranal perteneciente a la Clase A de receptores de la rodopsina y es uno de los tantos receptores que

desde su descubrimiento en el año de 1998 cuenta con información limitada pues no se ha definido su ligando endógeno y permanece en el estatus de receptor huérfano. Esto último lo convierte en un objetivo atractivo con un posible potencial terapéutico en los órganos y sistemas en donde se expresa como lo es el sistema nervioso, intestino, sistema inmune y sistema cardiovascular. Este receptor fue descubierto en el cromosoma 2q37.3 en el ser humano con dos isoformas: GPR35a y GR35b, la primera variante tiene una secuencia de 301 aminoácidos y la segunda tiene una extensión adicional de 31 aminoácidos y se le ha encontrado en algunas líneas de cáncer. De acuerdo con el grado de expresión, mayoritariamente se le ha encontrado en: colon, en el bazo, en la membrana de células inmunes, en la raíz dorsal y con una menor expresión en el estómago, músculo esquelético, tejido adiposo, hígado y el timo, mientras que, en el cerebro, en el corazón y médula espinal tiene una expresión moderada (MacKenzie et al., 2011) .

En sistema nervioso hay altos niveles de del GPR35 en el ganglio de la raíz dorsal de la rata lo cual sugiere que este receptor es un objetivo terapéutico atractivo para la investigación en el dolor, pues se ha hipotetizado que al igual que el receptor TRPV1 el GPR35 también podría modular la hiperalgesia, la inflamación y el dolor neurogénicos. Por otro lado, la presencia de este receptor en el hipocampo detectada por un ensayo histológico de inmunofluorescencia y a través de la medición de los potenciales de acción generados de manera espontánea y en la presencia de agonistas del GPR35, se observó una disminución en dichos potenciales de acción por lo que pudiera tener un efecto inhibitorio en la comunicación neuronal y por ende un efecto deletéreo en la función hipocampal como podría ser alteraciones en memoria espacial (Alkondon et al., 2015).

Estudios moleculares recientes sobre este receptor establecen diferencias claras entre hGPR35 y mGPR lo que repercute directamente con una gran diferencia de la farmacología entre las variantes especie dependiente de este receptor. Con respecto a la homología del receptor GPR35 de rata y de ratón comparado con el GPR35 de humano se tiene una alineación del 72 y 73%, respectivamente. Esto significa que muchas de las veces el estudiar el GPR35 para el desarrollo de fármacos en modelos murinos no es la mejor vía para el descubrimiento de nuevos fármacos con potencial terapéutico, como en el caso del derivado del triptófano; el ácido quinurénico que al entrar en contacto con el GPR35 del ser humano

es al menos 40 a 100 veces menos potente que a comparación del GPR35 que se expresa en rata (Quon et al., 2020). Este metabolito resulta ser controversial dado que se pretende establecer como el ligando endógeno del GPR35. Sin embargo, se requieren concentraciones desde 7 μM hasta 66 μM para activar el receptor, pero, son demasiado elevadas como para ser producidas por la vía endógena y este es el principal motivo que se opone cuando se trata de definir al ácido quinurénico como ligando endógeno (Alkondon et al., 2015)

Al igual que el receptor GPR55, la respuesta del receptor GPR35 es dependiente del tipo de ligando pues para el caso de la Lodoxamida, el cual es un potente agonista y en la clínica se usa como un estabilizador de mastocitos para el tratamiento de la conjuntivitis alérgica, tiene un carácter equipotencial tanto en el GPR35 de rata como en el GPR35 de humano. Este receptor en el hipocampo al ser activado desencadena una vía de señalización de proteínas G inhibitoria en la que las subunidades β y γ serán las encargadas de inhibir a la neurotransmisión por la inhibición de los canales iónicos de calcio dependientes de voltaje VDCC con la subsecuente reducción del flujo de calcio hacia el interior de la neurona presináptica y, por ende, interrumpiendo el proceso de neurotransmisión (Mackenzie & Milligan, 2017).

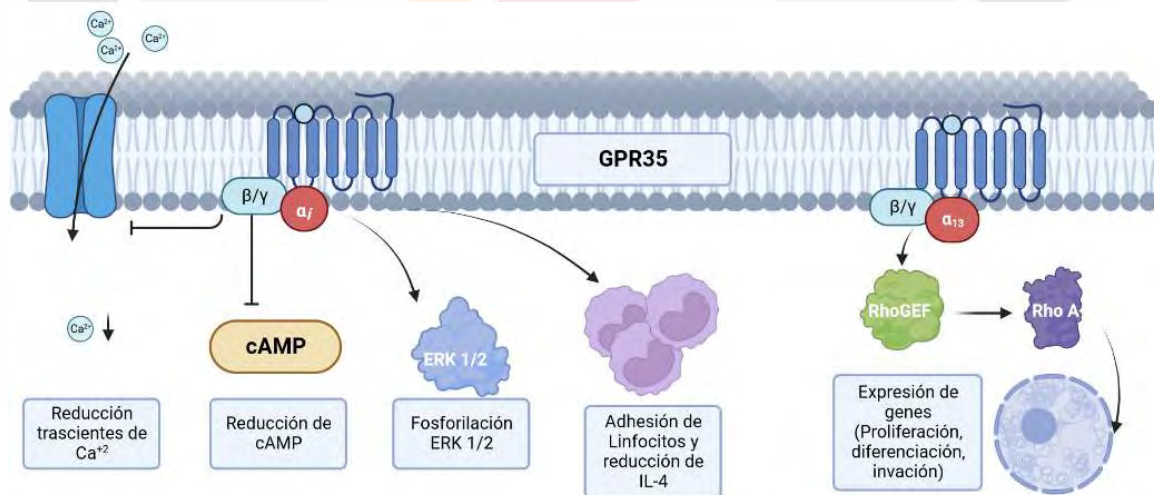


Figura 3. Vías de señalización de GPR35 $G\alpha_{i/o}$ y $G\alpha_{13}$ (Mackenzie & Milligan, 2017).

La inhibición de este receptor se da por acción del antagonista sintético ácido 6-bromo-8-(2,6-difluoro-4-metoxibenzamido)-4-oxo-4H-chromeno-2-carboxílico o por sus siglas

resumidas ML194 cuya concentración efectiva de inhibición EC_{50} es de 5.54 nM (Thimm et al., 2013b).

1.2.1.1 Participación del GPR35 en eventos fisiopatológicos

La literatura se refiere a GPR35 como el receptor de reciente descubrimiento en el que sus efectos fisiológicos y/o usos terapéuticos son poco conocidos. Sin embargo, mucho se ha investigado en años recientes; tal como nuestro estudio que aporta con nuevos hallazgos de GPR35 en SNC al manipularse farmacológicamente, a la par de otros estudios en los que se evaluaron sus efectos fisiológicos no solamente a nivel de sistema nervioso.

Para analizar tales efectos hay que tener en cuenta el grado de expresión de GPR35, es decir, su distribución en los diferentes tejidos y sistemas de órganos del cuerpo. Según datos del Human Protein Atlas y los reportados por (Reggio & Shore, 2015), GPR35 se expresa en el tracto gastrointestinal, hígado, sistema inmune, sistema nervioso central y el sistema cardiovascular, por ende, GPR35 no solamente podría desempeñar funciones nerviosas sino también metabólicas, de cardioprotección, vasculares y fisiopatológicas.

Cuando se comenzó a investigar el ligando endógeno de GPR35, el ácido quinurénico fue la molécula propuesta y además se tuvo el antecedente de que se trata de una molécula neuroprotectora por acción de diferentes receptores, pero que pudiera también estar actuando por la vía del GPR35 para modular eventos excitatorios nocivos a nivel de sistema nervioso central y la periferia (Divorty et al., 2015), lo que es razonable dada la vía de señalización ($G\alpha_{i/o}$) inhibitoria previamente descrita para este receptor. Sobre la misma línea del ácido quinurénico, se ha relacionado a la vía metabólica de la quinurenina con la progresión de diabetes mellitus (Kozielec & Urbanska, 2023) como una posible alternativa terapéutica para el tratamiento del padecimiento en donde previa activación de GPR35 por el ácido quinurénico se desencadenan efectos antiinflamatorios y una reducción en la resistencia a la insulina. Los eventos detrás de los efectos antiinflamatorios son una disminución en la expresión de TNF (Factor de Necrosis Tumoral), de la expresión de interleucina-4 (IL-4) y α -defensinas y la fosforilación de la cinasa activada por AMP (AMPK) que trae una reducción en la resistencia a insulina ya que esta enzima es importante para la homeostasis del metabolismo mitocondrial cuando bajos niveles de ATP existen a nivel intracelular, incrementa el

catabolismo y adicionalmente regula los mecanismos celulares de autofagia y apoptosis en células musculares y adipocitos (Herzig & Shaw, 2018).

La reciente asociación entre el sistema cardiovascular y el GPR35 pudiera ofrecer una nueva alternativa terapéutica para las enfermedades cardiovasculares, mejorando la función de las células del endotelio y la homeostasis hemodinámica. El GPR35 ha demostrado inhibir la expresión de la enzima guanosina trifosfato ciclohidrolasa I (GCH1) esencial para la síntesis de la tetrahidrobiopterina (BH4) que a su vez es importante como cofactor de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Tales eventos traen consigo una inhibición en la formación de óxido nítrico y por ende una disrupción en la función endotelial, alteraciones en el tono vascular y un incremento en la presión sanguínea (sistólica en ratones macho). Se ha propuesto que un bloqueo con antagonista de GPR35, podría ser benéfico para tratar enfermedades como la arteriosclerosis e hipertensión y de esta manera prevenir la enfermedad cardiaca. El efecto vasodilatador no es el único observado, pues se ha visto que en ratones con GPR35 silenciado genéticamente, hay una mayor proliferación y migración que a comparación de la cepa silvestre, sugiriendo que la inhibición o bloqueo de GPR35 en células del endotelio incrementa la angiogénesis *in vivo* proponiendo tentativamente una vía de señalización $G\alpha_{12/13}$ ya que se ha visto que la delección de RhoA/Rho-cinasa promueve la vasodilatación del endotelio (H. Li et al., 2021), sin embargo, también se ha reportado que RhoA/Rho-cinasa promueve la inhibición mediada por Angiotensina II sobre BH4 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando una baja vasodilatación mediada por NO (Zhang et al., 2012) y que además, una inhibición del GPR35 no desencadenaría la vía de mensajería Rho que también es importante para los procesos de proliferación y migración celulares (P. Guo et al., 2022). Estos hallazgos deben de ser investigados más a fondo para elucidar con precisión el mecanismo por el cual GPR35 estaría mediando los efectos de proliferación y migración de las células endoteliales, así como los de vasodilatación o bien si existe una intercomunicación con mecanismos alternos aún no descubiertos.

Se sabe que GPR35 puede seguir vías de señalización $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{12/13}$ y/o $G\alpha_{q/11}$ (H. Li et al., 2021; Reggio & Shore, 2015) y la ocurrencia de una vía (o conjunto de estas en mayor o menor

medida entre sí) depende de propiedades intrínsecas del receptor cuando se acopla a un agonista y a esto se le conoce como agonismo sesgado. Las vías de señalización $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ comparten un 67% de similitud en su secuencia de aminoácidos y tienen segundos mensajeros en común lo que da cabida a que se den entrecruzamientos entre ambas. Actúan principalmente a través del mensajero RhoA, RhoGEF, y/o MAPK cuyo objetivo es la activación de factores transcripcionales como MMP-2, NF- $\kappa\beta$, FAK y YAP/TAZ con efectos en la proliferación, migración, diferenciación, invasión y supervivencia celular (P. Guo et al., 2022), por otro lado, la vía de $G\alpha_{q/11}$ modula dos efectos que son la movilización de calcio intracelular por la formación de IP3 (importante en eventos de neurotransmisión) y DAG por la acción de la PLC, este último favorece la fosforilación de la proteína cinasa C (PKC) que a su vez fosforila a la fosfolipasa D que activa a la proteína cinasa de fibrosarcoma (Raf-1) a la proteína tirosina cinasa (SRC) y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) encargadas de la liberación de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun, pero que en células cancerígenas puede inhibir la proliferación celular por la disminución de factores de transcripción como lo son el factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el factor de crecimiento asociado a la insulina (IGF-1R) (AGUILAR-ROJAS et al., 2016).

El ácido lisofosfatídico (LPA), agonista de GPR35 activa vías de señalización $G\alpha_{12/13}$ participando en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos por lo que podría estar involucrado en la angiogénesis en tumores cancerígenos. Adicionalmente, la activación de factores como Rho, MAPK y ERK regulan la proliferación, migración celular y reordenamiento del citoesqueleto (P. Guo et al., 2022). MAPK una vez se fosforila por activación del receptor, fosforila a la ERK $\frac{1}{2}$ provocando la translocación de esta última cinasa al núcleo para la fosforilación de los proto-oncogenes c-fos, c-jun y c-Myc. La señalización MAPK/ERK también favorece a vías extracelulares como la vía del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) importante en la angiogénesis tumoral (Y. Guo et al., 2020).

Un posible ligando del GPR35 diferente a los ya mencionados es la citocina quimiotáctica CXCL17 expresada en las mucosas y algunos tipos de tumores. Las citocinas de este tipo se encargan de reclutar y activar factores inmunes, participando en enfermedades de este sistema, afectaciones inflamatorias y están involucradas en carcinogénesis porque se sabe que participan en regular la migración, proliferación y diferenciación celular (Y. Li et al.,

2022). La citocina CXCL17 favorece a la angiogénesis al conocerse también como la citocina -1 relacionada al factor de crecimiento endotelial y al GPR35 alternativamente como CXCR8 por tener como ligando a esta citocina (Maravillas-Montero et al., 2015). Recientemente se ha propuesto que la sobreexpresión del eje CXCL17/GPR35 participa en el agravamiento de algunos tipos de cáncer como en el cáncer colorrectal y cáncer de mama al encontrarse a las dos proteínas altamente expresadas en muestras de tejido de cáncer de colon y de cáncer de mama pero, la elevada presencia de estas proteínas en un mismo tejido no es suficiente para establecer una asociación entre estas y que dicha asociación tenga una repercusión directa en la prognosis del cáncer de colon y/o de mama. Se ha encontrado que el incremento o decremento en la expresión de CXCL17 y de GPR35 no es simultánea (Yao et al., 2020) y por ende no se puede establecer una asociación directa entre ambas proteínas en la progresión del cáncer. Aunado a esto, se ha demostrado que CXCL17 actúa por mecanismos alternos y/o independientes a GPR35 al fallar en la inducción de migración de células expresando GPR35 (Binti Mohd Amir et al., 2018; S.-J. Park et al., 2018). El mecanismo por el que GPR35 participa en la progresión de cáncer, sobre todo cáncer de colon es al formar un complejo de señalización con la bomba Na/K-ATPasa ya que, además de mantener el balance de electrolítico de la célula, tiene la capacidad de formar un complejo de señalización con las tirosinas cinasas de la familia Src que a su vez activan diferentes rutas como Ras/Raf y ERK1/2 (Tian et al., 2006). Previamente se mencionó que el GPR35 tiene una actividad basal o tono a nivel de SNC, este tono se manifiesta en otros tejidos como el colon en donde GPR35 activa de forma independiente de ligando con la bomba Na/K-ATPasa, activando el complejo de señalización Na/K-ATPasa-Src (Kaya et al., 2021). El GPR35 en situaciones en las que se encontrase sobreexpresado traería consigo una desregulación del complejo de señalización Na/K-ATPasa-Src-ERK1/2 provocando alteraciones en la proliferación, migración celular y que además se ha reportado que GPR35 también se ve involucrado en la liberación de factores que promueven la adhesión y migración transendotelial de monocitos como la molécula de adhesión celular-vascular 1 (VCAM-1) cuya inducción es dependiente de GPR35 y que en conjunto con la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$ es crítico para la activación endotelial y angiogénesis. Esto demuestra el potencial papel terapéutico del GPR35 como alternativa para el tratamiento de algunos tipos de cáncer

al ser bloqueado farmacológicamente para la reducción del tamaño de tumores (Pagano et al., 2022; Schneditz et al., 2019).

1.2.2 Farmacología y Fisiología del receptor GPR55

Una vez decodificado el genoma humano a finales de la década de los noventa, se descubrió al GPR55 y su afinidad hacia moléculas cannabinoideas y lisofosfolípidos como anandamida y lisofosfatidilinositol (LPI) (O’ Dowd et al., 1998). Se trata de un receptor cuyo locus se encuentra en el cromosoma humano 2q37 y que contiene una secuencia codificante de 319 aminoácidos. Este se encuentra altamente expresado en las glándulas adrenales, en el intestino, en el bazo y en el sistema nervioso central encargándose de la regulación de muchos procesos fisiológicos de variada naturaleza como: la hiperalgesia, la respuesta inflamatoria, la modulación del sistema cardiovascular y un posible papel en la proliferación de algunos tipos de cáncer (Moriconi # et al., 2010).

GPR55 pertenece a la familia de receptores A de la rodopsina. Farmacológicamente, se considera un receptor cannabinoide putativo pese a su bajo porcentaje de homología con los receptores cannabinoideos clásicos. Con el receptor CB₁ mantiene un porcentaje de homología del 13% y con CB₂ un porcentaje de homología del 14%. Se le ha intentado incorporar con los receptores endocannabinoideos clásicos por su afinidad a ligandos de naturaleza cannabinoide como: la anandamida, el Δ^9 -THC y 2-AG, cannabidiol y palmitoiletanolamida (Moriconi # et al., 2010). El hecho de tener afinidad por moléculas no cannabinoideas como el Lisofosfatidilinositol (LPI), favorece a la continuidad del debate. GPR55 se caracteriza por tener un agonismo sesgado ya que dependiendo del agonista se podrían desencadenar diferentes tipos de vías de señalización con diferentes respuestas, sobre todo a nivel de factores de transcripción (Figura 4) (Ross, 2009).

El GPR55 tiene diversas vías de señalización entre las que destacan $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ cuya segunda mensajería se distingue por la activación de diferentes proteínas y segundos mensajeros que favorecen la expresión de genes. Proteínas como RhoA, Proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), RhoGEF, entre otras están asociadas a $G\alpha_{12/13}$ y la Proteína cinasa C, la fosfolipasa C y la expresión de factores de la respuesta celular como Raf, asociados a $G\alpha_{q/11}$. Ambos tipos de vías mantienen intercomunicación y convergen en la liberación de calcio intracelular del retículo endoplasmático (Falasca & Ferro, 2016b).

Fenómeno que es importante para el acoplamiento de las vesículas con NT a la membrana plasmática, por lo cual, este fenómeno es importante para la comunicación interneuronas.

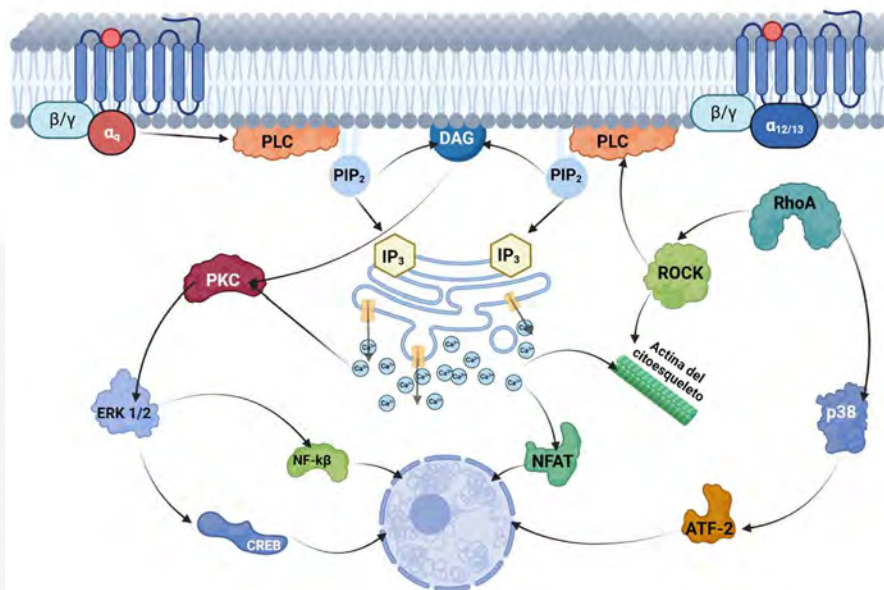


Figura 4. Vías de señalización que sigue GPR55 una vez es activado por algún agonista como el LPI y cuyo paso final es la expresión de diferentes genes involucrados con migración, proliferación y diferenciación celular (Falasca & Ferro, 2016a).

El ligando endógeno de GPR55 es el L- α -Lisofosfatidilinositol (LPI) y se trata de un lípido bioactivo que potencia la vía de señalización $G\alpha_{12/13}$ y que promueve la movilización de calcio intracelular y de factores de transcripción como NFAT y la fosforilación cinasas como RhoA, PKA y ERK $\frac{1}{2}$ que son importantes para la diferenciación, migración y proliferación celular. El tipo de señalización es $G\alpha_{12/13}$ y $G\alpha_{q/11}$, la ocurrencia de una u otra vía dependerá de factores como la localización del receptor en un tejido determinado, el ligando que interaccione con el receptor y además de que se puede dar una intercomunicación entre vías (Yamashita et al., 2013). El mecanismo $G\alpha_{13}$ y $G\alpha_{q/11}$ para la liberación de calcio es similar y parte de la activación de la fosfolipasa C (PLC) para la síntesis de inositol trifosfato (IP_3) a partir de los lípidos de membrana el cual se transloca al retículo endoplasmático y favorece la liberación de calcio intracelular (Henstridge et al., 2009), la movilización del calcio intracelular activa a cinasas dependientes de Ca^{+2} como la PKC que resulta en la fosforilación de ERK que se ha visto es importante en algunos sistemas de

neurotransmisión como por ejemplo en los de facilitación a largo plazo (Belcheva et al., 2002).

LPI tiene una potencia por GPR55 de pEC_{50} de 5.5 a 7.3, es decir, una EC_{50} , de 50.12 nM a 3.162 μ M (Henstridge et al., 2010). Para fines de investigación se han propuesto diferentes agonistas y antagonistas con alta selectividad al receptor como lo son los compuestos sintéticos ML-184 (CID2440433) y CID16020046, respectivamente cuyas potencias por el receptor son de pEC_{50} de 6.6 y pA_2 de 7.3, respectivamente (Kargl et al., 2013b; Kotsikorou et al., 2011). Por otro lado, existen ligandos más convencionales a los que el organismo pudiera estar expuesto como lo son el Δ^9 -THC y el CBD siendo agonista y antagonista cannabinoides para GPR55 (Pertwee et al., 2010; Ryberg et al., 2007b).

1.2.2.1 Participación del GPR55 en eventos Fisiopatológicos

El GPR55 se encuentra expresado en sistema nervioso, glándulas adrenales, en el tracto gastrointestinal, pulmones, útero, hígado, vejiga, riñones, huesos y en el sistema inmune (Reggio & Shore, 2015).

Como ya se ha revisado, el GPR55 se acopla a proteínas $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ que incrementa la concentración de Ca^{+2} intracelular, fosforila a ERK, proteína RhoA y también modula algunos efectores nucleares como NFAT. En el SNC este se expresa en la corteza prefrontal, hipocampo, cerebelo, médula, tallo cerebral, hipotálamo, cuerpo estriado y PAG (Deliu et al., 2015) la movilización de calcio intracelular participa en el acoplamiento y liberación vesicular de glutamato teniendo un efecto contrario a los receptores inhibitorios sobre la actividad neuronal (A. Marichal-Cancino et al., 2017) como es el caso del GPR35 que como ya se revisó, reduce los flujos de calcio y por ende evita la liberación de neurotransmisores vesiculares. En SN ha crecido el interés por los efectos del GPR55 en la modulación de eventos fisiológicos y/o fisiopatológicos como la neuroinflamación altamente relacionada con la aparición de la enfermedad de Parkinson y Alzheimer y en la modulación del dolor. La neuroinflamación se origina en la microglía en donde se da la respuesta del sistema inmune innato a nivel del SNC y se mantiene la homeostasis metabólica. El GPR55 está expresado en células de la microglía e inmunitarias como los monocitos y células NK existiendo una relación directa con los procesos inflamatorios y tal parece que el bloqueo del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

GPR55 con el agonista inverso KIT17, reduce citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α en la microglía y alternativamente se propone otro mecanismo en el que el GPR55 podría estar interfiriendo con la activación de prostaglandinas microsomales (mPGES-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) evitando la progresión de la neuroinflamación pero, se requieren más estudios para dar con el mecanismo exacto de como el bloqueo del GPR55 podría estar actuando (Saliba et al., 2018). Por otro lado, la activación del GPR55 con el agonista O-1602 en células germinales neurales del hipocampo surte un efecto neuroprotector en modelos de inducción de la inflamación con IL-1 β reflejado por un incremento en la neurogénesis por lo que la función antiinflamatoria del GPR55 (Hill et al., 2019) podría estar influenciada por un agonismo sesgado.

El GPR55 participa en eventos fisiopatológicos cuando se encuentra sobreexpresado. Similar al GPR35, el GPR55 se ve involucrado en la progresión de diferentes tipos de cáncer como el cáncer pancreático, el cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de colon, en donde el GPR55 se ha encontrado sobreexpresado y que a su vez el grado de expresión correlaciona con la agresividad del tipo de cáncer, ya que cuando este es silenciado se presenta una baja en la proliferación y que cuyos efectos proliferativos están mediados por la fosforilación de ERK1/2 (Hasenoehrl et al., 2019).

El eje LPI/GPR55 participa activamente en la proliferación y migración celular. El LPI es un agente mitógeno que al interactuar en la matriz extracelular con el GPR55 desencadena cascadas de señalización que estimulan el crecimiento celular, migración e invasión celular. Las vías de señalización asociadas a $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$ provocan efectos proliferativos, de migración e invasión por la liberación de Ca^{+2} intracelular previa activación de la PLC y síntesis de IP3. La activación de PLC se da por la fosforilación promovida por ROCK cuando se da una vía $G\alpha_{12/13}$ y directamente por las subunidades de $G\alpha_q$ cuando el agonista es LPI. El calcio tiene un efecto activador sobre diferentes proteínas cinasas como PKC, factores de transcripción como NFAT, y modificaciones en el arreglo del citoesqueleto. La activación de la PKC cataliza la fosforilación de MAPK y que a su vez esta activa a ERK1/2 que favorece la expresión de CREB y NF- $\kappa\beta$, dos reguladores de la transcripción importantes en respuestas como proliferación, supervivencia, diferenciación, progresión de tumores,

angiogénesis, inflamación y metástasis (Falasca & Ferro, 2016b; M. Park & Hong, 2016; Wen et al., 2010). Además de los ya mencionados, el gen p38 también se activa y favorece la progresión de angiogénesis (Falasca & Ferro, 2016b).

La disrupción de cualquiera de estas vías favorecidas por las subunidades $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$ se lleva a cabo con el uso de antagonistas para el GPR55 tal es el caso del CID16020046, antagonista sintético selectivo con una IC_{50} de $0.50 \mu M$ que es capaz de inhibir a expresión inducida por LPI de los factores reguladores en la transcripción como $NF-\kappa\beta$ y NFAT disminuyendo de esta manera la proliferación, migración y supervivencia celular de tumores (Falasca & Ferro, 2016b).

1.3 LAS BASES NEUROFISIOLÓGICAS DEL APRENDIZAJE Y DE LA MEMORIA

1.3.1 *Potenciación a largo plazo (LTP)*

La memoria y el aprendizaje tienen su origen en cambios neuroplásticos como consecuencia de estímulos intrínsecos y/o extrínsecos sobre el SN. El aprendizaje es el proceso en el que estos estímulos o experiencias cambian a nuestro sistema nervioso y que finalmente se ven reflejados en la manifestación de la conducta. Existen diferentes tipos de aprendizaje y los principales son: el aprendizaje perceptivo en el cual se destaca la capacidad del reconocimiento de los estímulos que se han percibido antes, el aprendizaje estímulo-respuesta que consiste en ejecutar una respuesta o conjunto de estas en función de un determinado estímulo y el aprendizaje motor que asocia a los sistemas sensitivos y motores. La memoria ha sido definida en un inicio como la capacidad de retención de información en el sistema nervioso y una vez se requiera, esta información puede ser evocada. La memoria al igual que el aprendizaje son fenómenos que tienen su origen en los procesos neuroplásticos que suceden en el sistema nervioso y por ende se trata de una retención de información dinámica, que puede cambiar en un determinado tiempo y está en función de nuevos estímulos o por la ausencia de otros; interviniendo procesos de reforzamiento de la sinapsis que se explican a continuación.

La inducción a la potenciación a largo plazo (LTP) propuesta por Donald Hebb (1949) como la base celular del aprendizaje consiste en el fortalecimiento de una sinapsis débil cuando la neurona postsináptica genera potenciales de acción de manera repetida y que fue

comprobada por Lomo (1996) en la circunvolución dentada del hipocampo al observar un incremento a largo plazo en la intensidad de los potenciales excitatorios postsinápticos producto de estimulación eléctrica. La LTP asociativa permite reforzar vías neuronales débiles de estímulos no condicionados durante un aprendizaje estímulo-respuesta y una vez dicho circuito neuronal se refuerza pasa a ser un estímulo condicionado (Bliss & Lømo, 1973).

La bioquímica de la potenciación a largo plazo asociativa se ve fuertemente influenciada por la participación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) en una primera fase, en el hipocampo. Este es un receptor tipo canal, ionotrópico, no selectivo dependiente de voltaje y de su ligando el glutamato. Para que se instale la LTP es necesaria la ocurrencia de dos procesos al mismo tiempo: una estimulación con un ritmo rápido para la despolarización de la neurona y la presencia del neurotransmisor glutamato en una espina dendrítica ya despolarizada. La estimulación de la neurona a alta frecuencia o por alguna otra sinapsis fuerte provocará que en la neurona piramidal en el hipocampo despolarice fuertemente y sea suficiente para poder despolarizar también a sus dendritas para después fortalecerlas como producto de la propagación de una espina dendrítica. Los receptores NMDA son activados por el glutamato en la espina dendrítica despolarizada en la neurona piramidal del hipocampo, es importante que la espina dendrítica esté despolarizada para que el receptor pueda admitir el flujo de iones, puesto que este en su estado basal se encuentra bloqueado por un átomo de Mg^{+2} y solo se desaloja en la presencia de carga. Una vez se activa el receptor se da la entrada de calcio extracelular que activa a la enzima calcio calmodulina cinasa tipo II (CaM-KII) y es fundamental para la translocación de los receptores AMPA a la membrana postsináptica. Recordemos que los receptores AMPA son canales ionotrópicos para sodio activados por glutamato y cuando se abre el canal, producen PEP, por lo que a una mayor cantidad de receptores AMPA, se produce una mayor cantidad de PEP's y se forma una sinapsis fuerte (Figura 5a). También ocurren cambios presinápticos por la enzima óxido nítrico sintasa (NO-sintasa) activada por el calcio, una vez este ingresa por la apertura del receptor NMDA en la dendrita postsináptica. En esta, se sintetiza a partir de la arginina óxido nítrico (NO) que difunde en sentido retrógrado al axón presináptico y provoca un incremento en la liberación de glutamato, contribuyendo al fortalecimiento de la sinapsis (Figura 5b) (Carlson, 2005).

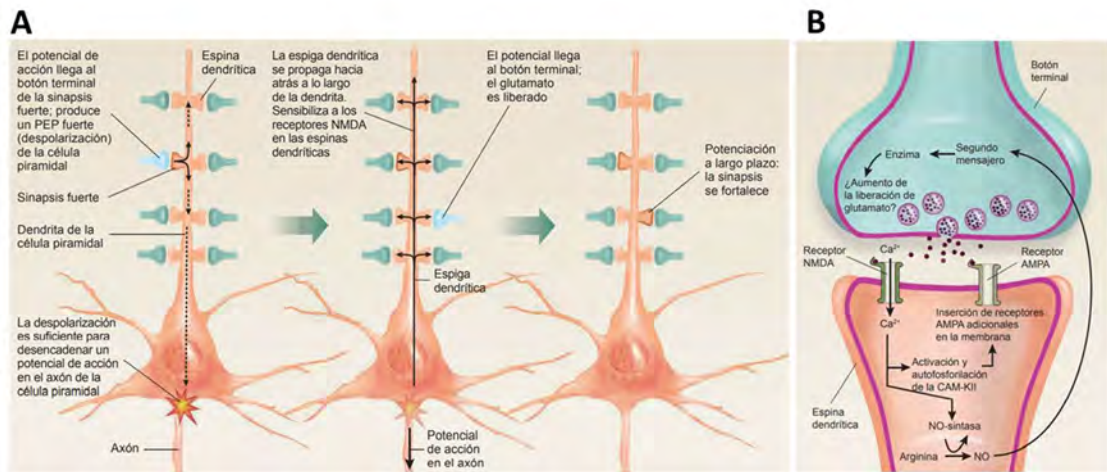


Figura 5. (A) Secuencia para el fortalecimiento de una sinapsis, una sinapsis fuerte en una neurona despolarizada genera una espina dendrítica que se expande a las otras dendritas y aquellas sinapsis débiles activas en las que haya presencia de glutamato, se fortalecerán. (B) Esquema del espacio sináptico con el mecanismo bioquímico para el fortalecimiento de la sinapsis, nótese el mecanismo propuesto para la síntesis presináptica del glutamato (Carlson, 2005).

1.3.2 Vía CREB: expresión génica para el fortalecimiento de la sinapsis y formación de la memoria

Las estructuras anatómicas del cerebro involucradas directamente en la memoria comprenden a las áreas de asociación sensorial como los lóbulos parietales, lóbulos temporales y los lóbulos occipitales. El sistema límbico con el hipocampo, la amígdala y áreas asociadas que ayudan a la formación de la memoria declarativa, las estructuras subcorticales como los núcleos de la base, el cerebelo, putamen y partes del tallo cerebral para la formación de la memoria no declarativa (Boss, 1986). La memoria declarativa y no declarativa, en conjunto, conforman al sistema de memoria de largo plazo el cual mantiene información por largo periodos de tiempo e inclusive por toda la vida. La formación de la memoria a largo plazo se da en un proceso de tres etapas: (i) codificación, (ii) consolidación y (iii) recuperación. El proceso de codificación consiste en la modificación de la información sensorial que llega al SNC para facilitar su almacenamiento, para la formación de la memoria a largo plazo se codifica en un formato de información semántico en el cual se relacionan conceptos y hechos con sus significados y en menor medida de manera visual o auditiva. El proceso de recuperación suele ser acompañado de una imagen mental de lo que se recuerda, sin embargo; solo se puede recuperar una fracción de las memorias codificadas puesto que la codificación se realiza en diferentes vías por lo que muchas veces para evocar una memoria

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hace falta un estímulo externo a manera de pista que permita llegar a la información que yace codificada (Mujawar et al., 2021).

El proceso de consolidación de la memoria a largo plazo es el paso más complejo que involucra un mecanismo dependiente de expresión génica con duración de algunas horas y/o días. La vía molecular de la proteína de respuesta de unión al elemento de cAMP (CREB) ocurre en el hipocampo durante la consolidación y es la vía de plasticidad a largo plazo altamente conservada entre diferentes especies para la formación de la memoria (Bisaz et al., 2014).

Como ya se revisó, en los procesos de aprendizaje ocurren cambios neuroplásticos a nivel presináptico con el cambio de la cantidad de glutamato liberado y cambios postsinápticos estructurales con la adecuación de la cantidad de receptores. La consolidación de la memoria está directamente relacionada con la adecuación estructural de la sinapsis y este proceso está mediado por CREB que es una vía activada por tres ejes principales: por un GPCR, el ingreso de Ca^{+2} por canales dependientes de voltaje (VDCC y NMDA) y por los receptores de tirosina-quinasa (RTK). Los tres mecanismos tienen como propósito la activación y reclutamiento de los factores de transcripción CBP-CREB A los cuales se unen a la secuencia promotora CRE para dar con la expresión de los genes tempranos-inmediatos (IEG's) con función reguladora en la estructura de la sinapsis en la terminal postsináptica (Figura 6). Los GPCR cuya vía de señalización descendente sea la AC-cAMP-PKA (i.e., $G\alpha_s$ o $G\alpha_{i/o}$) activarán por medio de fosforilación al factor de transcripción CREB-A. El receptor a tirosina-cinasa (RTK) moviliza a las cinasas PKB/AKT, ERK y a MAPK que se encargan de fosforilar al factor de transcripción CREB-A. Análogamente, el ingreso de Ca^{+2} por los receptores NMDA y VDCC, activa al factor de transcripción CREB-A por la fosforilación de CaM-KII. Contrariamente a estos tres mecanismos, se encuentra CREB-R que compite activamente con CREB-A por la secuencia promotora CRE, CREB-R impide la expresión por la acción de la fosfatasa PP2A y que a su vez es inhibida por RTK, este último proceso está finamente regulado y una desregulación producto de la disrupción de cualquiera de los tres ejes antes mencionados provoca disfunciones en la consolidación de la memoria y por el contrario, una sobre expresión de la vía, tiene efectos potenciadores en el proceso de consolidación. Los transcritos IEG's producto de la activación de CRE-CBP-CREB-A son

las proteínas *c-fos*, *jun*, *egr* y *NR4A* y a pesar de que no se conoce con claridad el mecanismo con el cual estas proteínas efectúan el cambio estructural en la sinapsis, sí se sabe que interactúan con subunidades de los receptores NMDA, AMPA, GABA y colinérgicos (Kaldun & Sprecher, 2019).

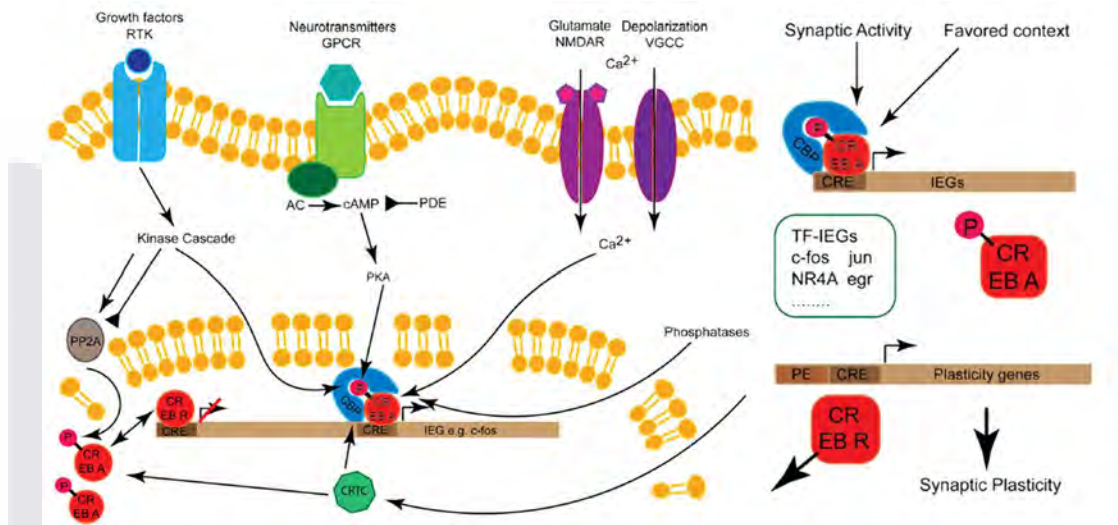


Figura 6. Vía CREB para la consolidación de la memoria, las tres vías de activación por (i) GPCR, (ii) RTK y (iv) NMDA y/o VDCC (Kaldun & Sprecher, 2019).

1.3.3 Memoria declarativa y no declarativa

La memoria, consiste en un fenómeno neuroplástico producto de los cambios y fortalecimiento en la sinapsis y se definió como la capacidad que se tiene para almacenar y evocar información o una respuesta (Zlotnik & Vansintjan, 2019). En función de la respuesta conductual observada se clasifica en dos tipos diferentes de memoria: la memoria declarativa y la memoria no declarativa.

La memoria declarativa, explícita o informacional responde a la pregunta “¿qué?” estableciendo relaciones conscientes entre hechos y/o conceptos con sus respectivos estímulos sensoriales, por tal motivo, la memoria declarativa se considera parte del sistema cortico-límbico donde se ven involucradas las áreas del hipocampo, la amígdala y las áreas de integración para la información sensorial. La memoria declarativa se divide a su vez en la memoria episódica (asociación de eventos) y en la memoria semántica (asociación de hechos), de esta distinción, la memoria episódica está referida a la evocación de contextos espaciales y temporales (Sharma et al., 2010).

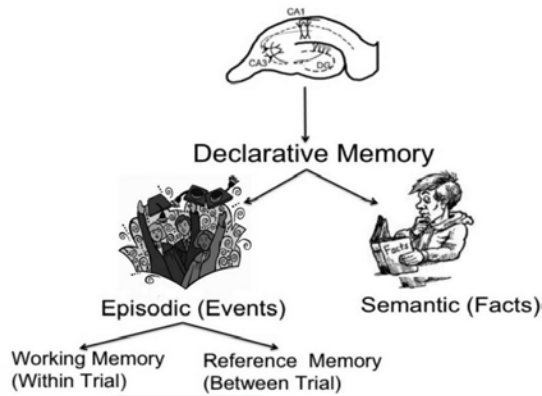


Figura 7. Clasificación de la memoria declarativa, nótese la importante participación del hipocampo en la formación de este tipo de memoria (Sharma et al., 2010).

La memoria no declarativa o de procedimiento se destaca por la ejecución de un hábito sin estar plenamente consciente de qué es lo que se está haciendo, más bien, el “cómo”. El tipo de conducta que se obtiene con la memoria no declarativa es el de una respuesta sin asociación consciente al estímulo contextual, requiere de varias repeticiones para que la respuesta se instale. Las áreas implicadas en la memoria no declarativa son la corteza motora y algunas regiones subcorticales como los ganglios de la base. Alternativamente, la memoria de trabajo o inmediata ha sido definida como la retención consciente de información breve como números, palabras, letras o frases cortas durante segundos después de haber sido asimilada. La memoria instantánea es lábil ante distractores y reside en las áreas necesarias para la atención selectiva y la estructuración temporal de actividades en la corteza prefrontal (Boss, 1986).

1.4 LAS BASES NEUROFISIOLÓGICAS DE LA ANSIEDAD

La ansiedad corresponde a un espectro de alteraciones psicóticas y fisiopatológicas caracterizadas por la predominancia de un estado de alerta con una hiperactivación del sistema neurovegetativo (Carlson, 2005), provocado por alguna perturbación o desbalance en los centros anatómicos del sistema límbico responsables de las emociones relacionadas al pánico, escape y/o lucha. Los trastornos afectivos ansiosos son: el ataque de pánico, trastorno depresivo mayor, trastorno generalizado de ansiedad, ansiedad social y también, algunos autores consideran al trastorno obsesivo compulsivo.

La etiología de la ansiedad es multifactorial y mantiene estrecha relación con causas neuroendocrinas, con los niveles de neurotransmisor y de receptores, alteraciones en la anatomía funcional, naturaleza genética y estímulos condicionantes externos que pudieran tener repercusión con cambios neuroplásticos a largo plazo (Martin et al., 2009).

1.4.1 La Neuroanatomía Funcional de la Ansiedad

Anatómicamente, la respuesta fisiológica y conductual de la ansiedad está mediada por estructuras especializadas del sistema límbico que están interconectados entre sí. La amígdala como principal actor en la modulación de respuestas al miedo y de agresión específicos para cada especie, se encarga de la recepción de información de los estímulos en su núcleo central y eventualmente la estratificación de esta información en función de la naturaleza del estímulo en el núcleo basolateral. Se ve implicada en la formación y evocación de memorias de estímulos aversivos al recibir aferencias del hipocampo, además mantiene comunicación con otras estructuras del SNC como corteza prefrontal, tálamo e hipotálamo y la área gris periacueductal (PAG) que recibe aferencias del núcleo central de la amígdala y esta se encarga de la función ejecutiva para luchar, escapar o bien inducir un estado paralizado; parámetros que funcionalmente pueden ser evaluados a través de la conducta y cuya magnitud ofrecen indicios del estado ansioso. El tálamo se encarga de la recepción de los estímulos auditivos, sensitivos, de olfato y gusto que posteriormente son enviados al núcleo lateral de la amígdala para su procesamiento. El locus cerúleo es un intermediario importante que permite medir la intensidad del estímulo al ser un centro noradrenérgico importante en SNC y que mantiene una comunicación activa con PAG y el núcleo central de la amígdala por lo que dependiendo de si el estímulo es lo suficientemente aversivo, este incrementará la cantidad de disparos activando a la amígdala y a las funciones ejecutivas de PAG, pero sobre todo a las funciones de atención dirigida de la corteza prefrontal (Steimer, 2002). Las áreas corticales superiores como lo son la corteza prefrontal y su porción ventromedial, así como la corteza orbitofrontal; tienen un efecto atenuador de modulación cognitiva sobre la respuesta emocional-ansiosa. Finalmente, la vía neuroendocrina de respuesta al estrés que comprende a la amígdala, a través de su núcleo central facilita la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) que lidera la respuesta neuroendocrina del estrés (Figura 8) (Martin et al., 2009).

1.4.2 El componente neuroendocrino de respuesta al estrés

La influencia de la ansiedad en la respuesta neuroendocrina que desempeña el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA), juega un papel crucial en la síntesis de glucocorticoides como moléculas efectoras finales de respuesta al estrés sistémico y/o neurogénico. Glucocorticoides como el cortisol en el ser humano y corticosterona en los roedores, traen consigo modulaciones a nivel del metabolismo, sistema nervioso y sistema inmune. La activación del eje HPA por la amígdala comienza con la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) de las neuronas secretoras parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y del núcleo periventricular del hipotálamo (PeVN), el CRF llega a la adenohipófisis por la vía portal hipotalámica-hipofisaria para liberar a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que accede a torrente y libera glucocorticoides de la corteza suprarrenal (Low, 2016) (Figura 8). El eje HPA mantiene un sistema de retroalimentación negativo a nivel de los receptores CRF1 de la pituitaria anterior (Martin et al., 2009). A nivel de hipocampo, la inhibición es tonal y/o de retroalimentación negativa por la presencia de glucocorticoides que activan neuronas glutamatérgicas del subículo ventral del hipocampo que inervan a la porción posterior del núcleo del lecho de la estría terminal y que este a su vez, mediante una vía inhibitoria gabaérgica inhibe al eje HPA a nivel del núcleo paraventricular (Fink, 2016; Ghasemi et al., 2022). El hipotálamo lateral favorece una activación simpática cuando es activado por la amígdala vía porción anterior del núcleo del lecho de la estría terminal ocasionando síntomas como taquicardia y un incremento en la presión sanguínea por la estimulación de la médula adrenal que trae consigo la liberación de catecolaminas. La hipertensión inducida por estrés crónico se da por el incremento en la actividad simpatoadrenal y la liberación de NA que incrementa el tono vascular, la presión sanguínea y el ritmo cardiaco, lo que aumenta el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Ayada et al., 2015). También se da una activación parasimpática durante eventos de estrés o ansiedad patológica, promovida por el núcleo motor dorsal del vago que establece comunicación directa con el núcleo central de la amígdala e induce síntomas como urinación, defecación y bradicardia (Steimer, 2002). El eje HPA tiene como molécula efectora final en la corteza suprarrenal a los glucocorticoides y la presencia de estos incrementan los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo vía gluconeogénesis lo que a la

larga ocasionan trastornos metabólicos como la resistencia a la glucosa y eventualmente a la diabetes mellitus (Yaribeygi et al., 2022)

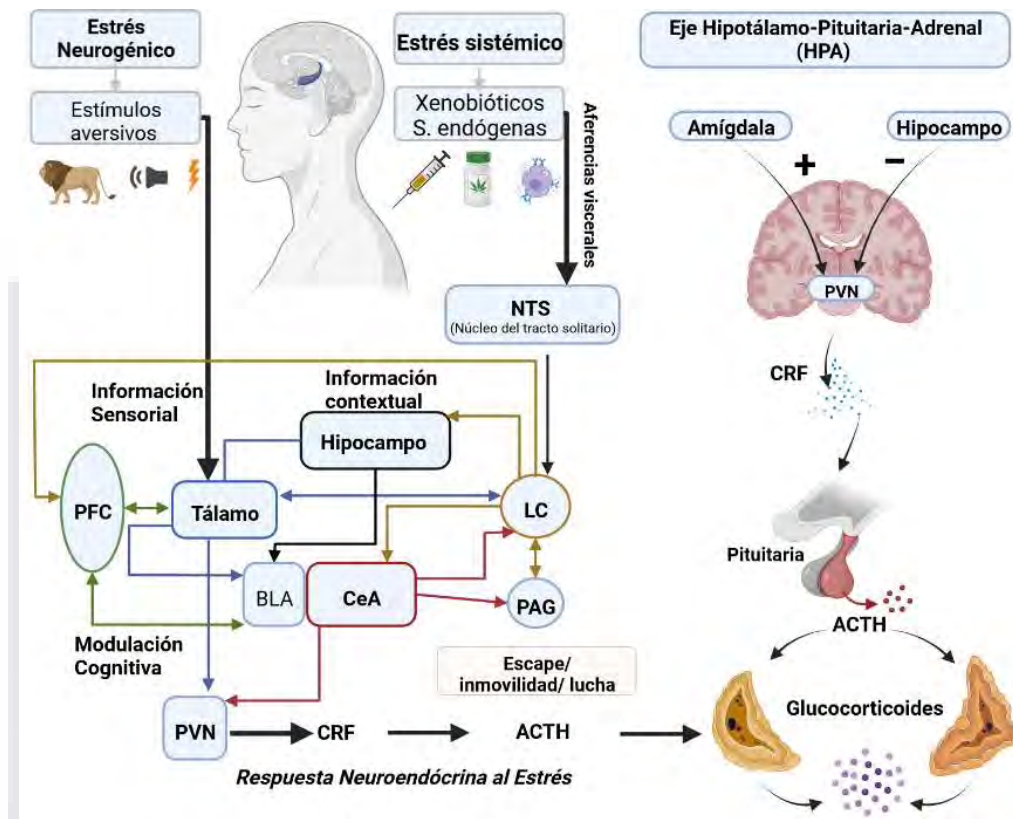


Figura 8. Disposición anatómica de los núcleos del sistema límbico involucrados en la respuesta ansiosa y la vía neuroendocrina de respuesta al estrés HPA.

1.4.3 Afectaciones comunes del estado de estrés

La hipertensión inducida por estrés crónico se da por el incremento en la actividad simpatoadrenal y la liberación de NA que incrementa el tono vascular, la presión sanguínea y el ritmo cardíaco, lo que aumenta el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Ayada et al., 2015). El eje HPA tiene como molécula efectora final en la corteza suprarrenal a los glucocorticoides y la presencia de estos incrementan los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo vía gluconeogénesis lo que a la larga ocasionan trastornos metabólicos como la resistencia a la glucosa y eventualmente a la diabetes mellitus (Yaribeygi et al., 2022)

1.5 LA RELACIÓN ENTRE LA ANSIEDAD CON EL APRENDIAZAJE Y LA MEMORIA

La relación que existe entre la memoria y los estímulos estresantes que eventualmente derivan en un cuadro de estrés neuroendocrino crónico como lo es la ansiedad está bien documentada. Se puede hablar de una fisiopatología derivada de la prolongada exposición a una elevada concentración de glucocorticoides en el organismo y el efecto deletéreo que tiene sobre los procesos hipocampales de aprendizaje y memoria. Nuevos hallazgos de como interactúan las alteraciones neurofisiológicas y fisiopatológicas del estrés a nivel de sistema límbico referido al aprendizaje y la memoria serán explicados, así como la propuesta de como el GPR35 y GPR55 pudieran contribuir a la contención de los efectos deletéreos sobre los procesos cognitivos hipocampales.

Como ya se explicó previamente en el capítulo referido a la neurofisiología de la ansiedad, el estrés tiene una componente neural de recepción de estímulos a nivel del tálamo, integración en la amígdala, asociación en corteza prefrontal, ejecución en el área gris periacueductal, modulación hipocampal sobre la componente endócrina y, la componente endócrina mediada por el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal en donde la molécula de respuesta final son los glucocorticoides.

Los glucocorticoides son de gran importancia para procesos cognitivos de formación y recuperación de la memoria por mecanismos genéticos y no genéticos. Los glucocorticoides, siendo el cortisol en el ser humano y la corticosterona en modelos murinos mantienen una relación dosis respuesta dependiente en la formación de la memoria manteniendo un comportamiento de “U” invertida por lo que a bajas y a elevadas concentraciones se tiene un bajo porcentaje de cambios en la neuroplasticidad facilitadores para el aprendizaje y, cuando existen concentraciones moderadas de glucocorticoides se suscita el máximo pico de cambios en la neuroplasticidad favorecedores para la formación de la memoria y del aprendizaje (Sandi, 2011). Además de la concentración, la exposición temporal prolongada a glucocorticoides tiene un efecto deletéreo en la actividad hipocampal (Kandel, 2013).

El mecanismo por el cual los glucocorticoides secretados afectan a los procesos de formación del aprendizaje y la memoria en el hipocampo es por la interacción con rutas glutamatergicas excitatorias en las neuronas piramidales del hipocampo. Los glucocorticoides afectan la transmisión neuronal excitatoria en el hipocampo por la inhibición en la recaptura de glutamato mediada por los receptores a glucocorticoides (GR) y por un incremento la liberación no genómica de glutamato de la neurona presináptica lo que deriva en la acumulación y posterior elevación de la concentración de glutamato en la sinapsis. El glutamato acumulado interacciona con receptores AMPAR y NMDA lo que provoca alteraciones en la homeostasis del calcio y debilitamiento de la potenciación a largo plazo por la inducción de una depresión a largo plazo. La subunidad GluN2B de los receptores NMDA extrasinápticos actúa cuando existe una acumulación excesiva de glutamato por la inhibición de la recaptura de este neurotransmisor y provoca la endocitosis de la subunidad de GluA2 (pero no en la subunidad GluA1) de los receptores AMPAR provocando una depresión a largo plazo y la disminución de la eficiencia sináptica lo que provoca una baja en los procesos neuroplásticos de formación de memoria y aprendizaje (Sandi, 2011).

Otra vía que perjudica a la formación de la memoria a causa de los glucocorticoides e incluso más importante desde el punto de vista toxicológico se da por la activación excesiva de los receptores glutamatergicos, es decir, por excitotoxicidad. Un evento excitotóxico de esta naturaleza implica una desregulación en la homeostasis de calcio por un incremento dramático en la concentración de calcio intracelular $[Ca_i\uparrow]$ y que finaliza con una neurodegeneración hipocampal. La muerte celular de las neuronas se da por la activación de diferentes cinasas con actividad sobre la disrupción de la membrana celular, modificaciones en el citoesqueleto, estrés oxidativo y factores de transcripción apoptóticos (Marambaud et al., 2009), sin embargo, alteraciones en la homeostasis mitocondrial promovidas por las altas concentraciones de $[Ca_i\uparrow]$ promueven una transición en la permeabilidad mitocondrial (MPT) referida a la pérdida a la membrana mitocondrial interna y a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que deriva en la depleción de la síntesis de ATP y en la liberación de factores proapoptóticos como: el citocromo C, factor inductor de la apoptosis, endonucleasa G, etc (Bonora & Pinton, 2014).

En el incremento de $[Ca_i^+]$ y la neurodegeneración hipocampal participan los receptores NMDA, AMPAR y los canales de calcio Cav1 y Cav2.2 (Tipo L y Tipo N). Los receptores NMDA y AMPAR al interactuar con el exceso de glutamato no recapturado y liberado en exceso, mientras la neurona esté despolarizada, permiten el ingreso de altas cantidades de calcio extracelular por medio de los receptores NMDA y, el receptor AMPAR (Sandi, 2011) al asociarse con los canales de calcio Cav₁ (Tipo L) (Marshall et al., 2003) y Cav_{2.2} (Tipo N) (Kang et al., 2006a) postsinápticos. Estos receptores desempeñan un papel importante en los procesos de potenciación a largo plazo (Youn et al., 2013) y por ende de facilitación de la memoria y del aprendizaje, pero que, bajo las condiciones ya descritas caracterizadas por una elevada concentración de glucocorticoides, propician excitotoxicidad. Existe la expresión de canales de calcio dependientes de voltaje Cav₁ y Cav_{2.2} en hipocampo siendo los dos tipos de VDCC más abundantes con una expresión del 45% y 25% respectivamente (Akaike, 1997).

El GPR35 tiene un efecto inhibitorio independiente de ligando, sobre los canales Cav_{2.2} ejerciendo una actividad reguladora negativa sobre los flujos de calcio en condiciones basales, posiblemente teniendo una función reguladora de la actividad neuronal y protegiendo de fenómenos excitatorios desregulados en el hipocampo. La inhibición de la actividad de los canales se lleva a cabo por su vía de señalización asociada a proteínas $G\alpha_{i/o}$ (J. Guo et al., 2008), cuyas subunidades γ y β se acoplan a los canales de calcio dependientes de voltaje interfiriendo con el flujo de calcio al interior de la neurona presináptica interfiriendo con el acoplamiento de las vesículas presinápticas cargadas con glutamato y de esta manera evitando su exocitosis o bien, evitando el ingreso de calcio en la neurona postsináptica al inhibir los canales Cav₁ y Cav_{2.2}. La manipulación farmacológica del GPR35 pudiera ofrecer una alternativa para el tratamiento de la neurodegeneración hipocampal y control de eventos excitatorios desregulados en el SN pero se requieren más estudios al respecto. Referido a la actividad de GPR55 en la respuesta del estrés y los posibles efectos negativos que este pudiera acarrear, se pudiera manipular farmacológicamente desde antes de llegar más abajo en la vía a nivel del eje HPA, precisamente en el área gris periacueductal para interrumpir la respuesta al estrés mucho antes de que se dé la liberación del cortisol. Existe el antecedente en el que, al bloquear al GPR55 en PAG de ratas con abstinencia

alcohólica se observó un incremento en conductas ansiosas y agresivas (Vázquez-León et al., 2021). Sin embargo, el mecanismo por el cual pudiera estar ejerciendo dicho efecto aún es inexplorado.

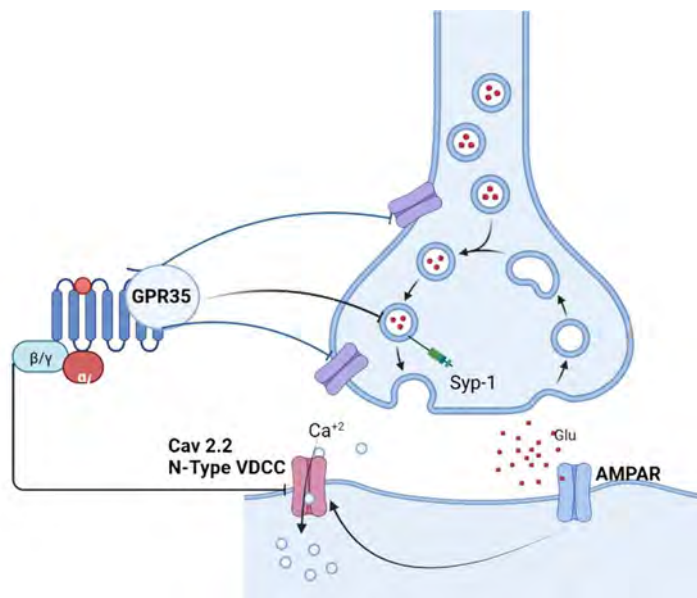


Figura 9. Efecto del receptor GPR35 sobre los canales de calcio $Ca_{v2.2}$ o de tipo-N (J. Guo et al., 2008; Kang et al., 2006a).

1.6 PARADIGMAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA EN LA RATA

1.6.1 El paradigma de laberinto de Barnes para la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial

El laberinto en Barnes para la evaluación de la memoria espacial evalúa directamente a la función hipocampal siendo el procesamiento de información facilitadora para el aprendizaje y formación de la memoria. El hipocampo integra a tres subregiones intercomunicadas entre sí como: el giro dentado (DG), el campo CA₃ y el campo CA₁ (Kesner et al., 2004a).

El giro dentado y el área CA₁ son los encargados de la recuperación y procesamiento de información espacial. Esto puede ser cuantificado mediante pruebas conductuales específicas como lo es en este caso el laberinto en Barnes que tiene como objetivo el evaluar el aprendizaje espacial por medio del establecimiento de relaciones entre señales gráficas distales en los alrededores y con respecto a una unidad fija de escape. Para un mejor

entendimiento de lo anterior, se trata de un laberinto con un solo sitio de escape el cual consiste en una caja que corresponde al refugio en el cual el roedor ingresará una vez se ubique en su contexto espacial. El dispositivo consiste en una plataforma circular con 40 hoyos dispuestos en la circunferencia del dispositivo, uno conteniendo la caja por lo que se tendrán 39 hoyos vacíos, se tiene una cámara para grabar el trayecto que toma el roedor de prueba, se tiene un recipiente contenedor para iniciar la prueba y marcos de referencia en la habitación. La plataforma circular debe de ser de un diámetro de 122 cm con un grosor en la tabla de 1 cm, cada uno de los hoyos en la periferia debe de tener cinco centímetros de diámetro además de estar elevado a una altura de 80 cm del suelo. El uso de este dispositivo ofrece ventajas sobre otras metodologías como podría ser el laberinto en agua de Morris ya que al no emplear el agua nos permite realizar una experimentación más limpia, reducir el estrés excesivo y por ende la concentración de glucocorticoides en sangre los cuales sesgan el proceso de aprendizaje, sin embargo, esto resulta ser un arma de doble filo ya que la ausencia de efectos estresores puede hacer el proceso más lento, el uso de ruido blanco a 80 dB como estresor ha mostrado buenos resultados (Figura 10) (Pitts, 2018).

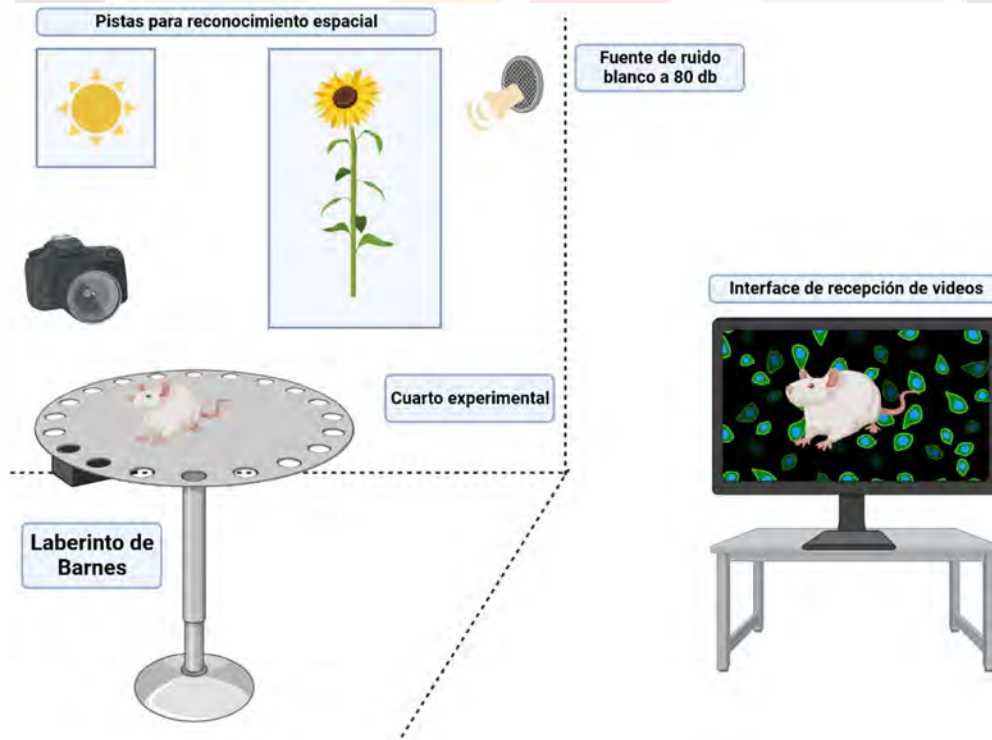


Figura 10. Disposición del paradigma de laberinto en Barnes (Pitts, 2018).

El experimento con laberinto de Barnes se lleva en tres fases a lo largo de cinco días. La primera fase consiste en una sesión de habituación y entrenamiento en el primer día, la segunda fase consiste en tres días en los cuales se estará entrenando a la rata y una tercera fase de duración de un día que corresponde a la evaluación de la memoria espacial mediante el conteo de visitas al hoyo en donde se posicionó a la caja durante los días anteriores de la prueba (Sunyer et al., 2007). Las variables que se consideran para la obtención de información en laberinto de Barnes son los errores totales que se cometen, la latencia y la distancia total de su ruta, además de ellos también se analiza la frecuencia en cuanto al tipo de estrategia empleada, ya sea serial, aleatoria o espacial (Kesner et al., 2004b).

1.6.2 El paradigma de Campo abierto para la evaluación de la respuesta ansiosa etológica de la rata

El laberinto en campo abierto se basa principalmente en la actividad motora del animal ante un estado de ansiedad. El fundamento de esta técnica radica en causas evolutivas del roedor, por aversión a los espacios abiertos e iluminados, considerados como peligrosos por el animal. El laberinto de campo abierto puede ser una superficie circular o cuadrada la cual se encuentra rodeada por paredes de suficiente altura para evitar que el animal escape, es importante resaltar que las dimensiones del laberinto dependerán del tamaño del animal, ya sea rata o ratón. Las variables que se suele evaluar corresponden a la ambulación, es decir, el tiempo que se mantuvo en movimiento por el campo abierto, la distancia de dicho recorrido, la latencia y si se incluyen objetos se analiza la aproximación a estos objetos como un indicativo de aversión o aceptación de dichos objetos (Seibenhener & Wooten, 2015).

Las dimensiones del campo abierto con ratas, consiste en un área de 250 cm² (Figura 11). La prueba tradicional de campo abierto toma cinco minutos en completarse dependiendo de si la obtención de datos es manual o bien, para periodos más prolongados si se cuenta con algún software de interpretación para los videos en donde se evaluará a los parámetros en función del movimiento, la locación y manifestaciones del sistema nervioso autónomo (Cuadro 2) (Gould et al., 2009).

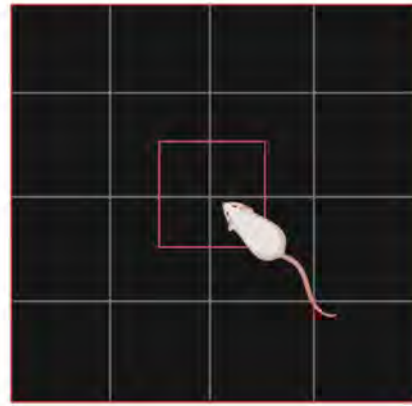


Figura 11. Disposición del campo abierto (Gould et al., 2009).

Cuadro 2. Parámetros tomados en cuenta para la prueba de campo abierto (Gould et al., 2009).

<p>Movimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> - Distancia recorrida - Tiempo de recorrido - Actividad vertical (Rearing) - Parálisis - Asicalamiento
<p>Localización</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tiempo en el centro - Cruzamientos por el centro
<p>Respuestas del sistema nervioso autónomo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Defecado - Orina

1.6.3 El paradigma de Laberinto suspendido en cruz para la evaluación de la respuesta de ansiedad etológica de la rata

El laberinto elevado en cruz, al igual que el paradigma de campo abierto, se basa en la aversión que tiene el roedor por los espacios amplios. Este dispositivo tiene dos brazos expuestos en dirección opuesta y otros dos brazos cubiertos en dirección opuesta entre sí. Una rata que permanece más tiempo en los brazos cerrados tiende a ser más ansiosa que una rata que permanece más tiempo en los brazos abiertos del paradigma. El laberinto elevado en cruz se encuentra a 60 cm del suelo, cada uno de los brazos tiene de largo una longitud de

alrededor de 36 cm y de ancho 6 cm. Los brazos que van cubiertos tienen paredes de 15 cm de altura mientras que se tiene un centro de 36 cm² (Figura 12). (Kraeuter et al., 2019).

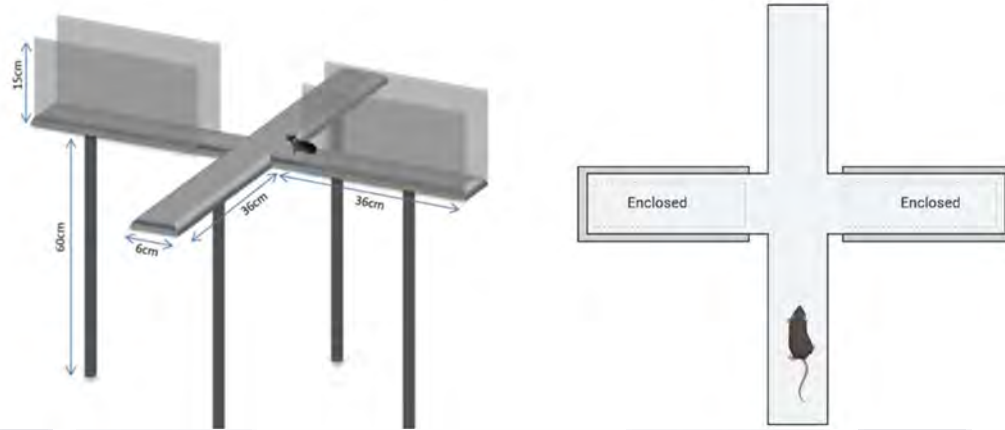


Figura 12. Configuración de un laberinto elevado en cruz convencional (Kraeuter et al., 2019).

Los estudios en la actualidad se realizan de manera automatizada con el uso de software o de visualmente por el observador. Por lo general se tienden a tomar en cuenta a los mismos parámetros como lo son el número de entradas a cada brazo del laberinto, se debe de registrar el tiempo de latencia en cada brazo, el número de posturas observando un brazo abierto y las veces que le da la espalda a la plataforma central con la cabeza hacia el brazo cerrado (Horii et al., 2018).

1.6.4 *El Paradigma de enterramiento defensivo para la evaluación de la respuesta ansiosa por confrontación activa*

El comportamiento de enterramiento defensivo consiste en el desplazamiento del material del lecho con las patas delanteras y cabeza en dirección a la fuente del estímulo aversivo. El procedimiento convencional consiste en infringir choques eléctricos al animal, esto se hace en un recipiente el cual cuenta con un lecho de aserrín de alrededor de cinco centímetros y con un electrodo de diámetro de 0.5x7.0 cm, emitiendo descargas de 12 mV proveniente de una fuente de poder (Figura 13), se expone al animal alrededor de 15 minutos y se finaliza la prueba. Para la interpretación de los resultados se mide el tiempo en movimiento el cual se refiere a cualquier desplazamiento locomotor horizontal, la exploración vertical o posturas de escape, cuantificación del tiempo cuando la rata se encuentra inmóvil y solo se percibe su respiración o movimientos laterales de la cabeza, el enterramiento rápido del electrodo con

el lecho, acicalamientos, investigación del electrodo, impulso de comer y conductas defensivas con desplazamientos en reversa mientras se observa a la fuente del estímulo dañino (De Boer & Koolhaas, 2003).

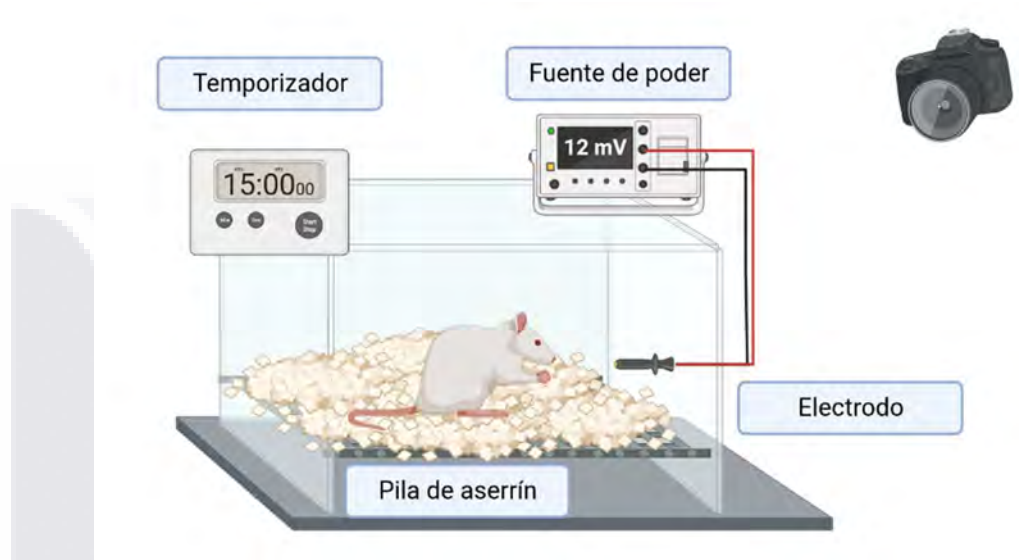


Figura 13. Disposición del paradigma de enterramiento defensivo (Fucich & Morilak, 2018).

2 JUSTIFICACIÓN

Poco se sabe sobre la neurobiología de los receptores GPR35 y GPR55. Debido a su ubicación, estos receptores son de interés toxicológico y terapéutico; ya que parecen modular la función hipocámpal y de PAG, y por tanto, múltiples conductas involucradas en el aprendizaje, memoria y emociones en el mamífero. El GPR35 tiene un efecto regulador negativo sobre la actividad neuronal de las células piramidales hipocámpales. Lo anterior podría ser relevante en los complejos procesos de formación de la memoria y del aprendizaje. Por otro lado, GPR55 en PAG participa en la modulación de la conducta en situaciones de confrontación ante una amenaza y durante fenómenos de adicción alcohólica. Por lo que constituye un blanco terapéutico potencial para el tratamiento y control de la respuesta fisiológica del estrés.

Esta investigación está enfocada en atender el **objetivo número tres** fijados por “La Organización de Naciones Unidas” que refiere a la seguridad de las vidas saludables y promoción del bienestar para todas las edades. Este estudio también contribuye con el

objetivo de la salud de los “Programas Nacionales Estratégicos (PRONACES-CONACyT)”. Investigar a los efectos neurofisiológicos mediados por GPR35 y GPR55 podría traer potenciales alternativas terapéuticas contra trastornos afectivos de ansiedad y de memoria, contribuyendo activamente al cumplimiento de los objetivos antes mencionados (Figura 14).



Figura 14. Objetivos PRONACES-CONACyT y objetivo tercero de la ONU, esta investigación contribuye con la generación de conocimiento en el área de la salud.

3 HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de la función del GPR35 hipocampal

La activación del receptor GPR35 hipocampal con el agonista sintético GPR35C10 (Merck®) provoca una disminución en la función del hipocampo interpretada funcionalmente con una baja en la conducta de la navegación espacial y el uso de mayores tiempos y distancias para la resolución del paradigma de Barnes.

El bloqueo del GPR35 hipocampal con el antagonista sintético ML194 (Merck®) provoca un incremento en la función del hipocampo interpretada funcionalmente con un aumento de la conducta de la navegación espacial y el uso de menores tiempos y distancias para la resolución del paradigma de Barnes.

3.2 Hipótesis de la función del GPR55 en PAG

La activación del receptor GPR55 en PAG con el agonista sintético ML184 (Merck®) promueve conductas ansiolíticas con mayores tiempos y distancias en las porciones abiertas de los paradigmas conductuales de laberinto suspendido en cruz y campo abierto, así como

menos conductas defensivas, de enterramiento y/o de escape en el paradigma de enterramiento defensivo.

El bloqueo del receptor GPR55 en PAG con el antagonista sintético CID16020046 (Merck®) promueve conductas ansiogénicas con mayores tiempos y distancias en las porciones cerradas de los paradigmas conductuales de laberinto suspendido en cruz y campo abierto, así como un incremento en conductas defensivas, de enterramiento y/o de escape en el paradigma de enterramiento defensivo.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las alteraciones en memoria espacial mediadas por GPR35 hipocampal y la participación del GPR55 en PAG sobre el control de ansiedad de la rata.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar las alteraciones navegación y memoria espacial en la rata por la manipulación farmacológica del GPR35 hipocampal.

Evaluar la respuesta ansiosa etológica y de evitación activa por la manipulación farmacológica del GPR55 del área gris periacueductal (PAG).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cirugía estereotáctica y administración i.c.v.

Ratas Wistar macho fueron pesadas y aquellas con un peso entre los 250g y 300g fueron seleccionadas para cirugía estereotáctica. Se indujo anestesia quirúrgica con la mezcla zoletil® 50/xilazina (hidrocloruro de zolacepam 25 mg/kg, hidrocloruro de tiletamina 25 mg/kg, xilazina 8 mg/kg; i.p.). Se depiló la parte superior del cráneo con ayuda de unas tijeras sencillas y crema depilatoria (Veet®) desde la región del hueso frontal del cráneo y hasta la zona posterior al nivel del hueso occipital abarcando un área aproximada de 2.5cm². Se administró xilocaína (6mg/kg i.d.) en la zona expuesta y se montó a la rata en el aparato de estereotaxia (Figura 15)



Figura 15. Pasos preparativos al inicio de la cirugía estereotáctica.

Trépanos bilaterales y unilaterales dirigidos a hipocampo y PAG, respectivamente, fueron ejecutados con un taladro (Chicago Electric™) a un diámetro de 0.6mm y se insertaron cánulas (10 mm x 23G) siguiendo las coordenadas descritas por Paxinos y Watson (2013); para hipocampo dorsal se usaron las coordenadas - 3.24 AP, ± 1.60 ML, + 2.4 DV, para PAG se usaron las coordenadas - 6.84 AP, - 0.7 ML, + 4.2 DV. Se fijaron dos tornillos de soporte de 0.8 mm x 5mm y se colocó una capa de acrílico dental (NicTone[®]) para fijar las cánulas y cubrir el cráneo. La rata se dejó en recuperación bajo condiciones de bioterio (ciclo luz/oscuridad 12h/12h, 25°C) durante siete días (Figura 16).

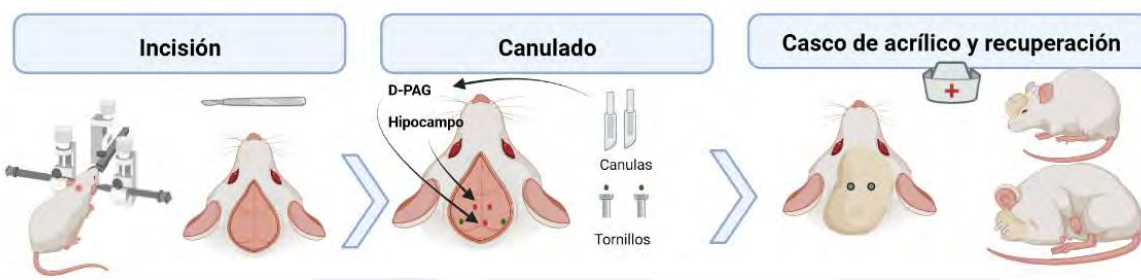


Figura 16. Secuencia de los pasos a seguir durante la cirugía estereotáctica.

Transcurrido el tiempo de recuperación postoperatorio, las ratas fueron sometidas a la administración i.c.v. del agonista sintético selectivo GPR35C10 (Merck[®]) a 1.79nmol, el antagonista sintético selectivo ML194 (CID2745687, Merck[®]) a 4.92 nmol y el tratamiento combinado ML194 + GPR35C10 (1.79 nmol/4.92 nmol) para el receptor GPR35 hipocampal. Para las ratas operadas en PAG se administró i.c.v. el agonista sintético selectivo ML184 (CID244043, Merck[®]) a 0.425 nmol, el antagonista sintético CID16020046 (Merck[®]) a 1.16

nmol y el tratamiento conjugado de ambos CID16020046 + ML184 (0.425 nmol/1.16 nmol) para GPR55. Se usó a DMSO al 10% como vehículo para ambos receptores en sus respectivas áreas cerebrales (Figura 17).

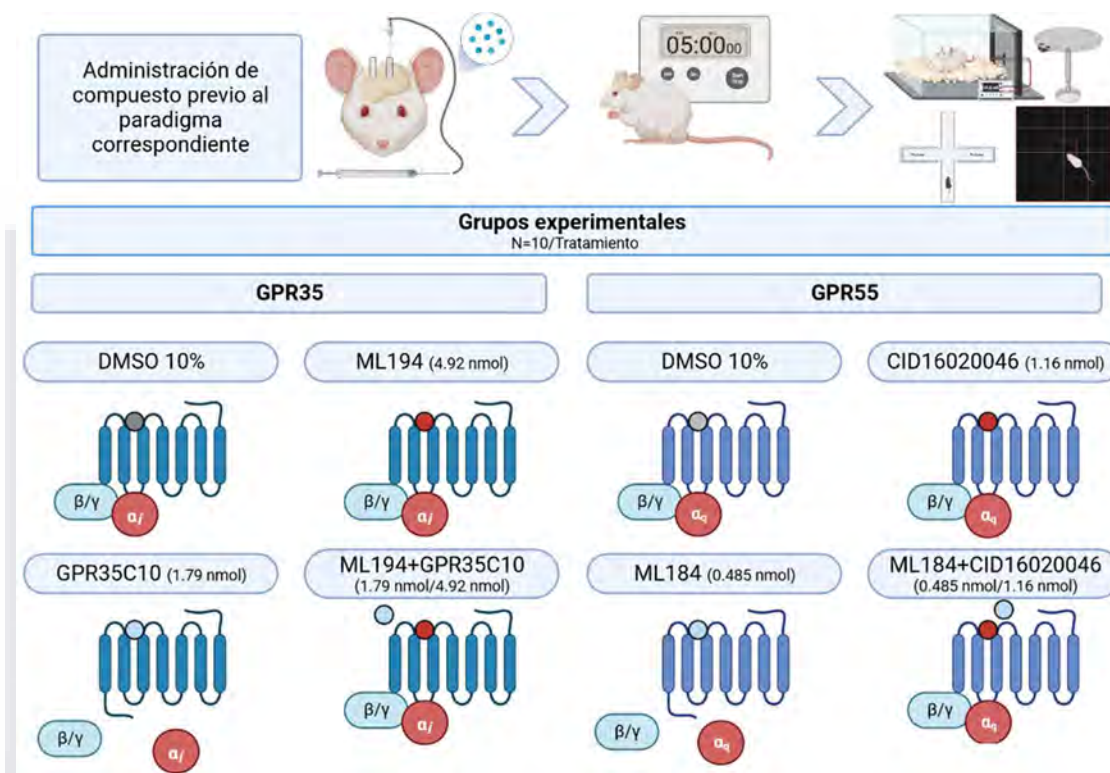


Figura 17. Diseño experimental de los tratamientos para GPR35 y GPR55, se empleó una n=10 para cada grupo experimental.

5.2 Paradigma para la evaluación de la memoria y navegación espacial: laberinto de Barnes

La memoria y navegación espaciales fueron evaluadas durante cinco días en el laberinto de Barnes. El primer día consistió en la habituación de la rata y la primera sesión de entrenamiento (S1), el segundo, tercero y cuarto día las sesiones de entrenamiento: S2, S3 y S4, respectivamente, siendo el día cinco la prueba final (Figura 18).

i. *Habitación*

Previo a la administración bilateral i.c.v. del compuesto agonista, antagonista o vehículo en el hipocampo dorsal de la rata, éstas se habituaron al entorno del laberinto de Barnes. Se asignó cada rata a una posición de túnel de escape diferente entre sí, la rata se colocó en la

caja refugio durante tres minutos y terminado ese tiempo, se extrajo a la rata de la caja refugio y se colocó en el centro del laberinto de Barnes, se dejó explorar durante cinco minutos o hasta encontrar el túnel con la caja de escape, pasados los cinco minutos y en caso de que la rata experimental no haya encontrado el túnel de escape, se dirige gentilmente sujeta de la cola hacia la caja. La rata fue regresada a su caja origen, se removieron los rastros olorosos de eses y orina con una solución de etanol al 70% v/v, se secó el laberinto y se repitió el mismo proceso de habituación con la siguiente rata del grupo en una posición diferente. Una vez terminada la habituación del grupo experimental, se dejó transcurrir una hora hasta comenzar con la administración y la sesión de entrenamiento correspondiente.

ii. Entrenamiento

El entrenamiento se realizó durante los primeros cuatro días, siendo el entrenamiento del primer día (S1) una hora después de la sesión de habituación. Se asignó a cada rata una posición estratégica diferente a la que tuvo en la sesión de habituación. Las posiciones fueron rotuladas con los números I, II, III y IV al ser dividida el área del laberinto en cuatro cuadrantes simétricos. Cada rata fue administrada i.c.v., bilateralmente, con un microlitro en cada cánula de compuesto agonista (GPR35C10), antagonista (ML194) y combinación de ambos (ML194 + GPR35C10) para GPR35 y vehículo (DMSO10%), cinco minutos previos a cada sesión de entrenamiento.

La rata se colocó en el centro del laberinto con una cubierta protectora, se reprodujo sonido blanco a un volumen mayor a 90db, se inició la grabación con ayuda de una video cámara web (Mod. C525 Logitech®) a una velocidad de captura de 15/1 FPS y a una resolución de 480x640px y se comenzó a medir el tiempo una vez se removió la cubierta protectora de la rata. Se detuvo la grabación de video completado el tiempo total de tres minutos o en el instante en el que la rata se refugió en su túnel de escape. Se permitió la permanencia de la rata en el túnel durante quince segundos, después se limpió a los rastros aromáticos en el área del laberinto y en el túnel con una solución de etanol al 70% v/v y con ayuda de toallas de papel. Este proceso se realizó para cada rata con cuatro repeticiones y de manera idéntica en cada sesión de entrenamiento.

iii. Prueba

En el quinto día se eliminó el túnel de escape del laberinto de Barnes y una única repetición de cinco minutos se grabó con las condiciones de captura de video previamente mencionadas. La rata no fue administrada y se extrajo directamente de su jaula. Se colocó en el centro del laberinto de Barnes con su cubierta protectora, se reprodujo el sonido blanco a 90db y se comenzó con la grabación al tiempo que se removió la cubierta protectora y la rata comenzó a explorar durante los cinco minutos. El propósito de la prueba fue el de evaluar el recuerdo que formó la rata de la posición en donde solía estar el túnel de escape.

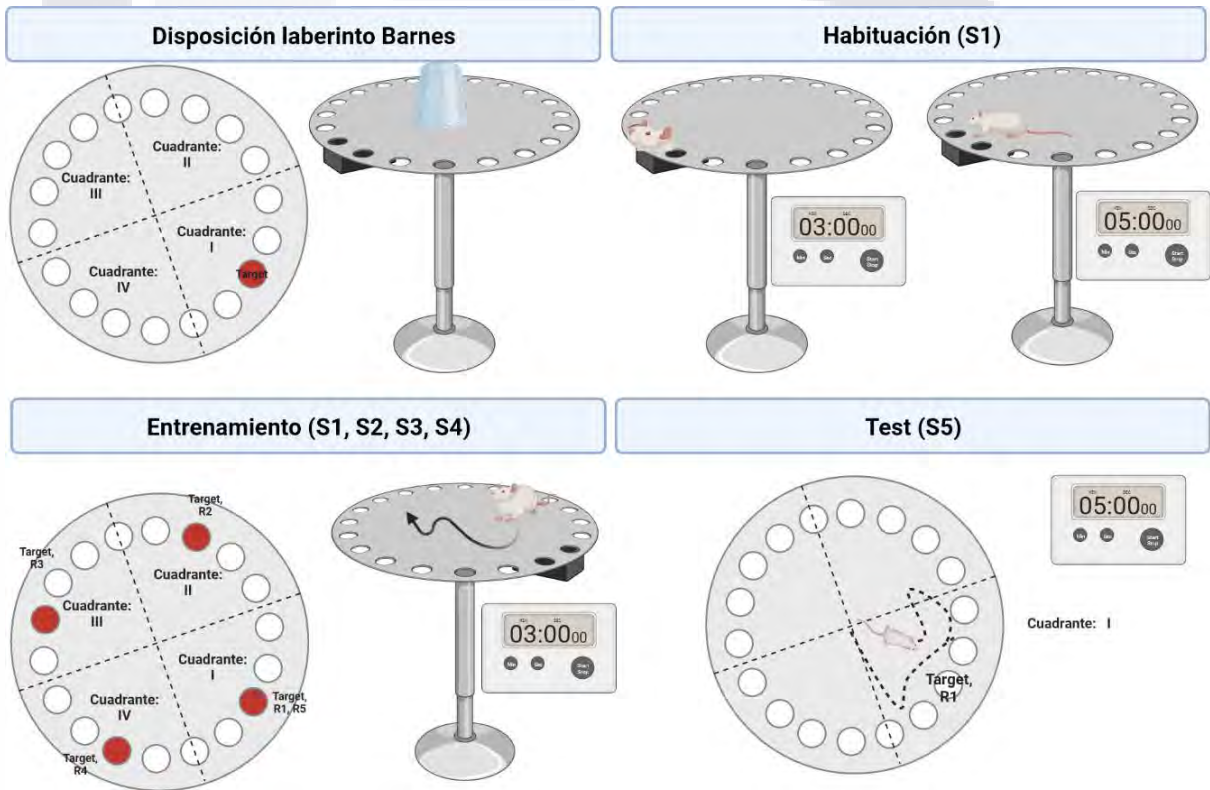


Figura 18. Fases del laberinto en Barnes para la evaluación de la memoria espacial, la habituación y el primer entrenamiento ocurrieron el primer día, pero la disposición del túnel de escape cambia y permanece constante en los subsecuentes entrenamientos, en el quinto día se hizo el “test” en donde se remueve el túnel de escape y se analiza la interacción de la rata con la posición de escape.

5.3 Paradigmas para evaluación de la ansiedad

La evaluación de la respuesta ansiosa se dividió en dos tipos de respuesta: Respuesta de ansiedad etológica y respuesta de ansiedad por evitación activa/pasiva. Para la respuesta por

ansiedad etológica de la rata, se usó al paradigma de campo abierto y al de laberinto elevado en cruz. La respuesta de evitación activa/pasiva se evaluó con el paradigma de enterramiento defensivo.

5.3.1 *Evaluación de la respuesta ansiosa etológica*

i. Campo abierto

Se administró unilateralmente, i.c.v., un microlitro de compuesto agonista (ML184), antagonista (CID16020046) para GPR55 o vehículo (DMSO10%) en las ratas con las cánulas en PAG, transcurrieron cinco minutos y se colocó a la rata en el centro del paradigma de campo abierto. La rata deambuló libremente durante cinco minutos y en ese periodo se grabó su recorrido con una videocámara web (Mod. C525 Logitech®) a una velocidad de captura de 15/1 FPS y una resolución de 600x800px. Terminada la grabación, se guardó el video y la rata fue devuelta a su jaula. Se limpió al paradigma en campo abierto con una solución de etanol al 70% v/v para eliminar cualquier rastro aromático que pudiera sesgar la prueba (Figura 19).

ii. Laberinto elevado en cruz

A la misma rata experimental, después de dos a tres días de descanso en el bioterio, se le administró un microlitro de compuesto agonista (ML184), antagonista (ML194) y combinación de ambos (CID16020046 + ML184) para GPR55 y vehículo (DMSO10%) en las ratas con cánula en PAG, transcurrieron cinco minutos y se colocó a la rata en el centro del paradigma de laberinto elevado en cruz. La rata deambuló libremente durante cinco minutos y en ese periodo se grabó su recorrido con una videocámara web (Mod. C944, Logitech®) a una velocidad de captura de 15/1 FPS y una resolución de 1280x720px. Terminada la grabación, se guardó el video y la rata fue devuelta a su jaula. Se limpió el área del laberinto con una solución de etanol al 70% v/v para eliminar cualquier rastro oloroso de eses y orina que pudiera sesgar la prueba (Figura 19).

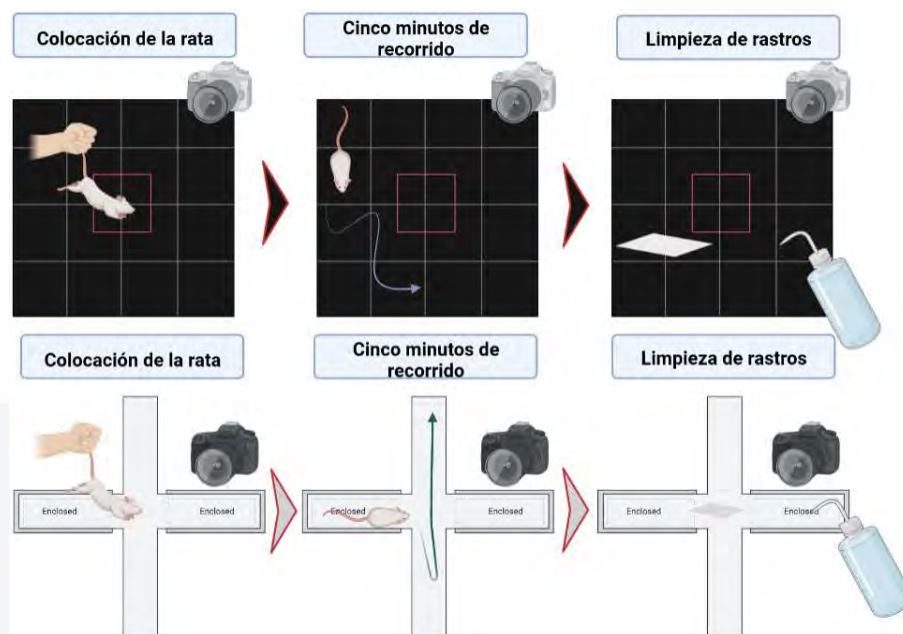


Figura 19. Simplificación de las tres etapas fundamentales para la evaluación de la respuesta ansiosa etológica de la rata en el paradigma de campo abierto y laberinto elevado en cruz.

5.3.2 Evaluación de la respuesta ansiosa por evitación activa

A la misma rata experimental, después de dos a tres días de descanso en el bioterio, se le administró un microlitro de compuesto agonista (ML184), antagonista (ML194) y combinación de ambos (CID16020046 + ML184) para GPR55 y vehículo (DMSO10%) en las ratas con cánula en PAG, se dejaron transcurrir cinco minutos y se colocó a la rata en el centro del paradigma de enterramiento defensivo, volteando en dirección contraria a la posición de electrodo. Previamente se llenó la caja plástica (75x50x40cm) con una capa de aserrín de cinco centímetros de grosor. La rata deambuló hasta que entró en contacto con el electrodo, se registró la reacción de sobresalto al momento de la descarga de 12 mV y se comenzó a contar 15 minutos a partir de ese momento. La grabación de video se capturó con una video cámara web (Mod. C944, Logitech®) a una velocidad de captura de 15/1 FPS y una resolución de 600x800px. Transcurridos los quince minutos, se detuvo la grabación, se guardó el archivo y se regresó la rata a su jaula. Finalmente, se desechó el aserrín usado y se limpió la caja plástica con una solución de etanol al 70% v/v, se secó y se puso una capa de cinco centímetros de aserrín nuevo antes de colocar a la siguiente rata administrada con compuesto (Figura 20).



Figura 20. Etapas para la medición de la respuesta ansiosa por evitación activa en el paradigma de enterramiento defensivo.

5.4 Eutanasia y análisis histológico

Todas las ratas al final de cada evaluación fueron sacrificadas con una dosis letal de pentobarbital sódico (200 mg/kg, i.p.), una vez la rata presentó síntomas de hipoxia y no se percibió pulso, se removió el casco de acrílico y se perfundió para fijar el cerebro. La perfusión se realizó por la vía i.c., cateterizando del ventrículo lateral izquierdo del corazón, se escindió la aurícula y se hizo pasar 120 ml de solución salina fisiológica (0.9% p/v), se recolectó el fluido saliente y se depositó en el recipiente adecuado para sangre en los RPBI, después se administró por la misma vía, 60 mL de p-formaldehído (PFA, 4% p/v). Se realizó una craneotomía para dejar expuesto al cerebro y el encéfalo se extrajo con ayuda de una espátula, el cerebro fue colocado en 20 mL de PFA (4% p/v) y se fijó el tejido a 4°C durante una semana y posteriormente el cerebro fue transferido a una solución de sacarosa (20% p/v) en donde permaneció tres días.

El corte histológico se realizó a -25°C en un criostato (Mod. HM505E, Zeiss®) con una sección de corte de 70µm, los cortes fueron recuperados en portaobjetos previamente impregnados en grenetina (3% p/v). Las laminillas con los seis cortes coronales de cerebro se atemperaron por media hora y se realizó la tinción de cuerpos de Nissl con violeta de cresilo. La tinción se realizó con un gradiente descendente de etanol (100% v/v, 96% v/v, 70% v/v, 50% v/v) en tiempos de incubación de tres minutos. Seguidamente de una incubación en violeta de cresilo al 0.1% p/v, por seis minutos y el desteñido por tres minutos

en agua destilada. Las laminillas se dejaron secar durante una hora y se cubrieron con resina entellan (Merck®) y un cubreobjetos (Figura 21).

5.5 Tracking de los videos experimentales y análisis estadístico

El análisis de los videos se realizó con el software Fiji-ImajeJ (V. 1.53t) (Schindelin et al., 2012) y con ayuda del plug-in Animal Tracker (Gulyás et al., 2016). Para el análisis de los videos se hizo la conversión del formato de los videos guardados “.mkv” a la extensión “.avi” por medio del software ffmpeg herramienta codificadora de código abierto. Los valores de las variables medidas (i.e., tiempo y distancias) y las imágenes de las trayectorias seguidas por las ratas fueron almacenados en una base de datos en el programa de hojas de cálculo de Libre Office (V. 7.4.0). El análisis estadístico se realizó con el software comercial GraphPad Prism® (V. 8.4.2) y SigmaStat (V. 12.0). Para el análisis de los tratamientos de los paradigmas de ansiedad etológica se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con prueba de *Student-Newman-Keuls* ($\alpha=0.05$), aquellos datos que no pasaron los supuestos de normalidad se analizaron con una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con $P<0.05$. Para los análisis de memoria y navegación espacial que involucraron a los factores tiempo y tratamiento se les aplicó un análisis de varianza de doble vía con medidas repetidas ($\alpha=0.05$) (Figura 21).

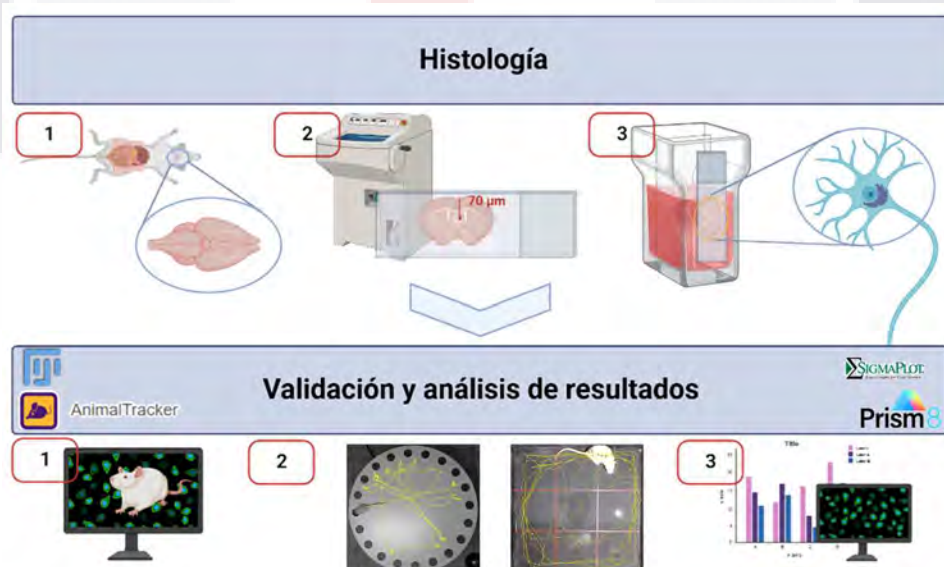


Figura 21. Análisis histológico para la validación de la cirugía estereotáxica partiendo de la (1) craneotomía para la extracción de cerebro, (2) el corte histológico en frío, (3) tinción con violeta de cresilo y metodología para el análisis de datos partiendo del (1) Tracking de los videos con Fiji(ImajeJ), (2) Obtención de las medidas de los parámetros evaluados, (3) Análisis estadístico.

6 RESULTADOS

6.1 Evaluación de la memoria espacial por la manipulación farmacológica del GPR35 hipocampal en el laberinto de Barnes

6.1.1 Análisis de la latencia y de la distancia de escape al túnel en el laberinto de Barnes

Las ratas fueron tratadas con: (i) vehículo (DMSO 10%); (ii) 1.79 nmol de GPR35C10 (agonista GPR35); (iii) 4.92nmol de ML194 (antagonista GPR35); y (iv) la combinación 1.79 nmol de GPR35C10 + 4.92nmol de ML194 antes de cada sesión de entrenamiento en el laberinto de Barnes. Los parámetros evaluados fueron: (i) latencia de entrada al túnel de escape; (ii) distancia total recorrida; y (iii) visitas al túnel de escape durante la prueba. Los primeros dos parámetros se midieron durante cuatro días en toda la superficie del laberinto y segmentados en cuadrantes. El número de visitas, distancia y tiempo en el cuadrante con el túnel de escape se midieron en la prueba del quinto día. Para las comparaciones entre tratamientos se usó un análisis de varianza ANOVA de una vía, α : 0.05 con prueba de Student-Newman-Keuls.

i. Latencia de escape al túnel durante el entrenamiento

La figura 22 muestra el efecto de los tratamientos sobre la latencia de entrada al túnel de escape. El grupo tratado con el vehículo (DMSO 10%) presentó disminución pronunciada en el tiempo de latencia a partir de la tercera sesión de entrenamiento. El grupo tratado con GPR35C10 presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a: (i) vehículo en las sesiones 3 y 4; (ii) ML194 (4.92 nmol) en las sesiones 2, 3 y 4; y (iii) ML194 (4.92nmol) + GPR35C10 (1.79nmol) en las sesiones 2 y 3. Mientras que el resto de los tratamientos no generó cambios significativos con respecto al vehículo (DMSO 10%; $p > 0.05$).

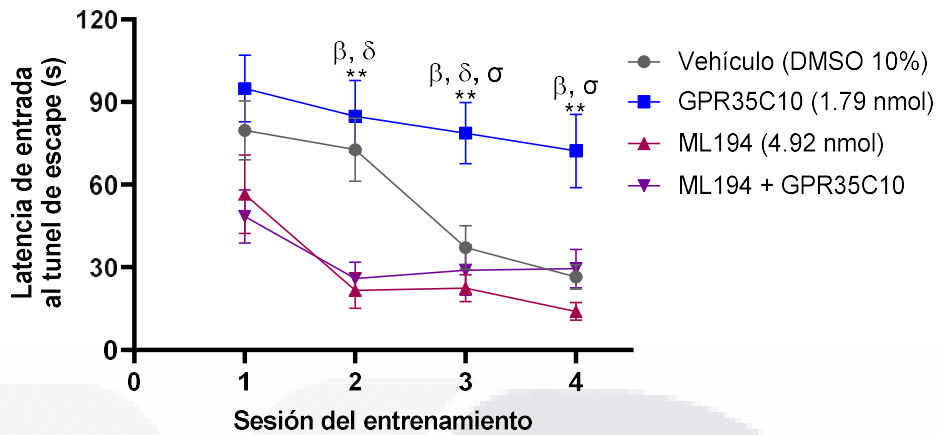


Figura 22. Latencia de escape al túnel en el paradigma de laberinto de Barnes para la evaluación de la memoria espacial. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. **, $p < 0.05$; β , $p < 0.05$ vs. ML194 (4.92 nmol); δ , $p < 0.05$ vs. ML194 + GPR35C10, σ , $p < 0.05$ vs. DMSO 10%.

ii. *Distancia de escape al túnel durante el entrenamiento*

La figura 23 muestra el efecto de los tratamientos sobre la distancia promedio recorrida en la resolución del laberinto. El grupo tratado con GPR35C10 (1.79 nmol) no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al grupo vehículo (DMSO 10%). El grupo tratado con ML194 (4.92 nmol) recorrió una menor distancia en comparación con el grupo control durante la segunda sesión y con respecto al grupo GPR35C10 (1.79 nmol) en la segunda y cuarta sesión ($p < 0.05$). Por último, la combinación ML194 + GPR35C10 recorrió una menor distancia en comparación con el grupo agonista (GPR35C10, $p < 0.05$) en la segunda sesión.

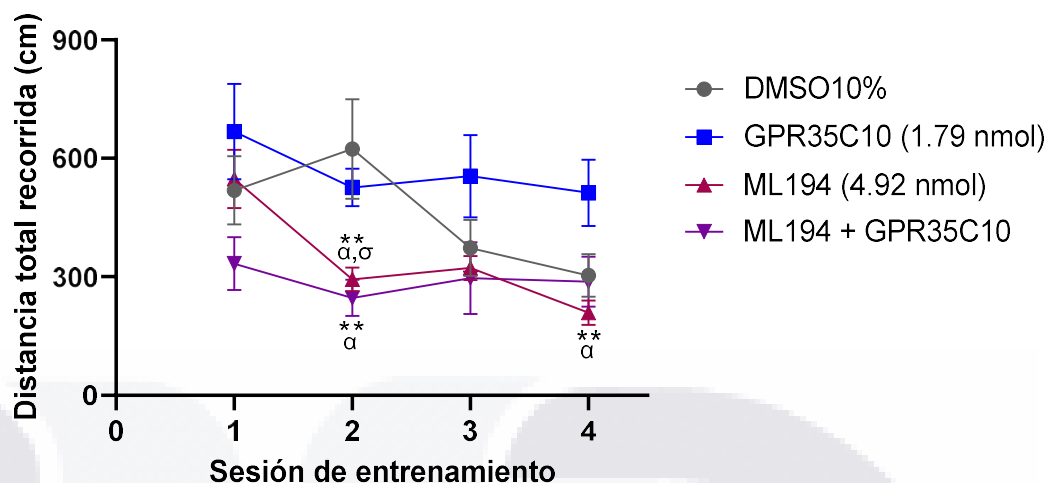


Figura 23. Distancia de entrada al túnel en el paradigma de laberinto de Barnes para la evaluación de la memoria espacial. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. **, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. GPR35C10 (1.79 nmol); σ , $p < 0.05$ vs. DMSO 10%.

iii. Cambio en la latencia de escape al túnel en S_1 y S_4

La figura 24 muestra el efecto de los tratamientos sobre la latencia de entrada al túnel de escape durante la primera (S_1) y la última sesión de entrenamiento (S_4). En el grupo vehículo (DMSO 10%), el tratamiento ML194 (4.92 nmol) y la combinación ML194 + GPR35C10, los animales mostraron una disminución significativa en la latencia ($p < 0.05$) entre sesiones. En marcado contraste, los animales que recibieron el tratamiento agonista con GPR35C10 (1.79 nmol) no mostraron cambios entre sesiones ($p > 0.05$). De hecho, el tratamiento GPR35C10 (1.79 nmol) se comportó estadísticamente distinto al resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

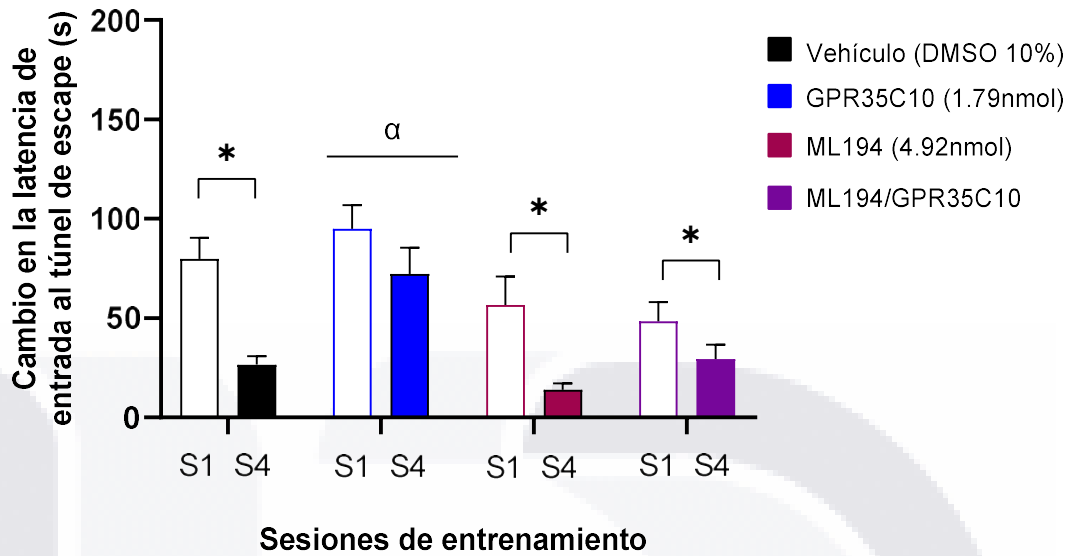


Figura 24. Cambio en la latencia de entrada al túnel de escape por sesiones y tratamientos. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante RM-ANOVA de dos vías. *, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

iv. *Cambio en la distancia de escape al túnel en S₁ y S₄*

La figura 25 muestra el efecto de los tratamientos sobre la distancia de entrada al túnel de escape que recorrió al animal para resolver el laberinto durante la primera (S₁) y la última sesión de entrenamiento (S₄). En el grupo antagonista ML194 (4.92 nmol) los animales mostraron una disminución significativa en la distancia ($p < 0.05$) entre sesiones, mientras que en el grupo vehículo (DMSO 10%) hubo una tendencia a disminuir ($p = 0.051$). Los tratamientos: agonista (GPR35C10, 1.79nmol) y ML194 + GPR35C10 no mostraron diferencias significativas entre sesiones ($p < 0.05$) pero, el tratamiento GPR35C10 (1.79 nmol) fue estadísticamente distinto al resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

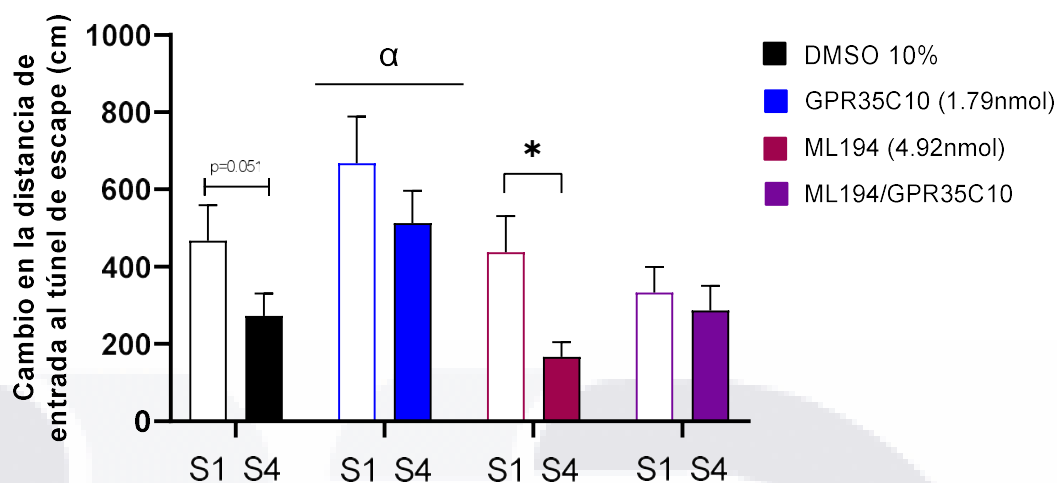


Figura 25. Cambio en la distancia de entrada al túnel de escape por sesiones y tratamientos. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante RM-ANOVA de dos vías. *, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

v. *Comparativa de permanencia en los cuatro cuadrantes en el día de la prueba (S₅)*

La figura 26 muestra los efectos, por tratamiento, de la diferencia de tiempo que la rata permaneció en el cuadrante nativo del túnel de escape y los cuadrantes no nativos del túnel de escape en el quinto día. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la permanencia media en el cuadrante nativo del túnel de escape en los tratamientos; vehículo (DMSO 10%), ML194 (4.92 nmol) y ML194 + GPR35C10. Caso contrario con el tratamiento agonista GPR35C10 (1.79 nmol) en donde la permanencia del animal en el cuadrante nativo del túnel de escape no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al de los cuadrantes no nativos.

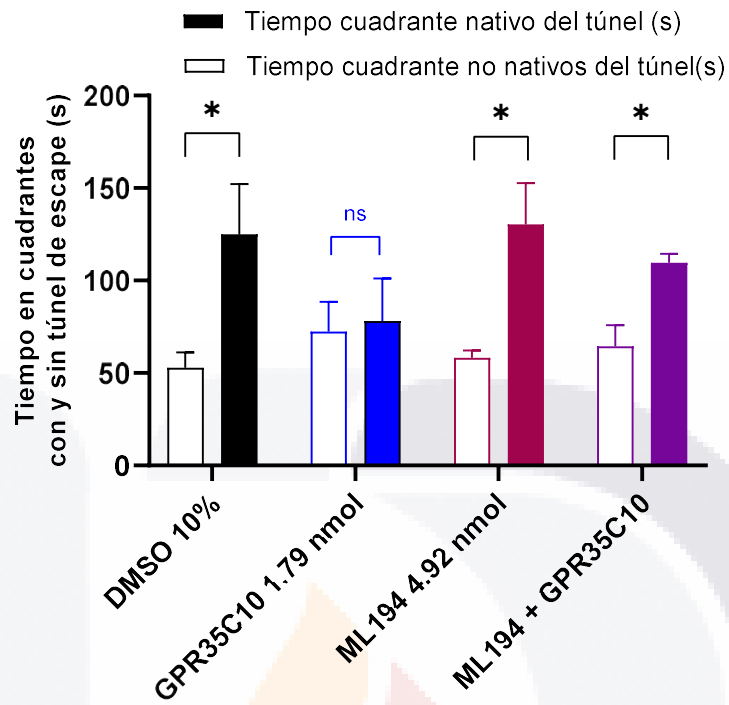


Figura 26. Permanencia de las ratas en el cuadrante nativo del túnel de escape y cuadrantes no nativos del túnel de escape. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante comparaciones no pareadas t-Student. *, $p < 0.05$.

vi. *Comparativa de distancia en los cuatro cuadrantes en el día de la prueba (S₅)*

La figura 27 muestra los efectos, por tratamiento, de la diferencia en la distancia que recorrió el animal en el cuadrante nativo del túnel de escape y en los cuadrantes no nativos del túnel de escape en el quinto día. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de la distancia media recorrida en el cuadrante nativo del túnel de escape en los tratamientos; vehículo (DMSO 10%) y ML194 (4.92 nmol). Caso contrario con los tratamientos agonista GPR35C10 (4.92 nmol) y ML194 + GPR35C10, en donde la distancia recorrida de la rata en el cuadrante nativo del túnel de escape no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la de los cuadrantes no nativos.

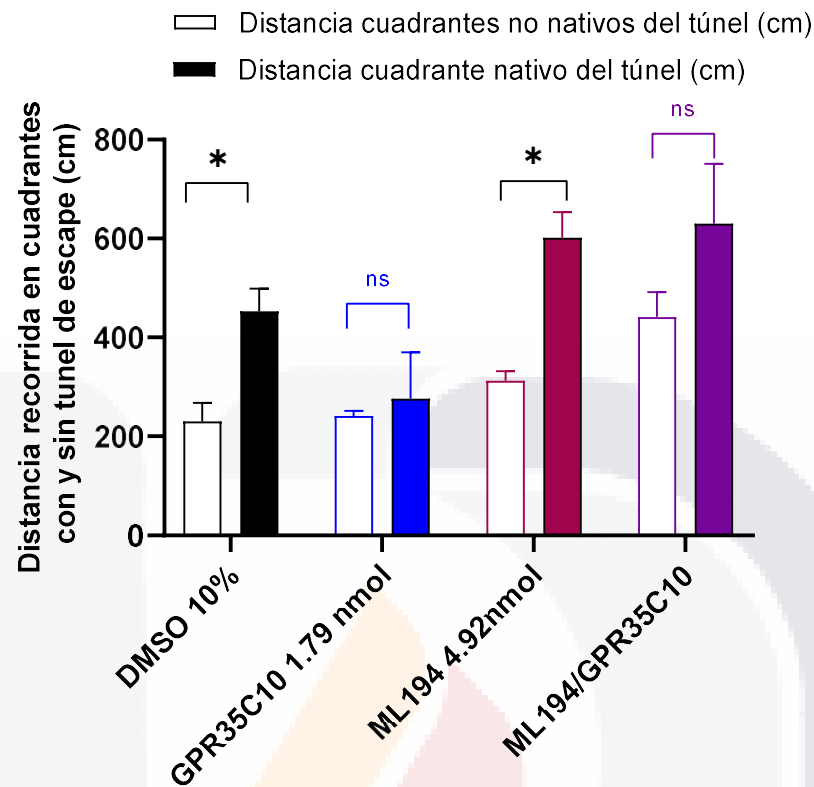


Figura 27. Distancia recorrida por las ratas de estudio en el cuadrante nativo del túnel de escape y cuadrantes no nativos del túnel de escape. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante comparaciones no pareadas t-Student. *, $p < 0.05$.

vii. *Visitas al túnel objetivo en la prueba (S₅)*

El número de visitas al túnel objetivo fue medido en términos de la distancia recorrida en el área del túnel objetivo más dos túneles adyacentes. La búsqueda de diferencias entre los tratamientos se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía con un nivel de significancia de $\alpha:0.05$.

La figura 28 muestra el desplazamiento en el hoyo del túnel de escape más un hoyo adyacente a cada lado, en la quinta sesión. Gráficamente se observó un incremento no significativo ($p > 0.05$) en las visitas de los tratamientos ML194 (4.92 nmol) y ML194 + GPR35C10, a diferencia de los tratamientos DMSO 10% y GPR35C10 (1.79 nmol). Estadísticamente, no existieron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos evaluados ($p > 0.05$).

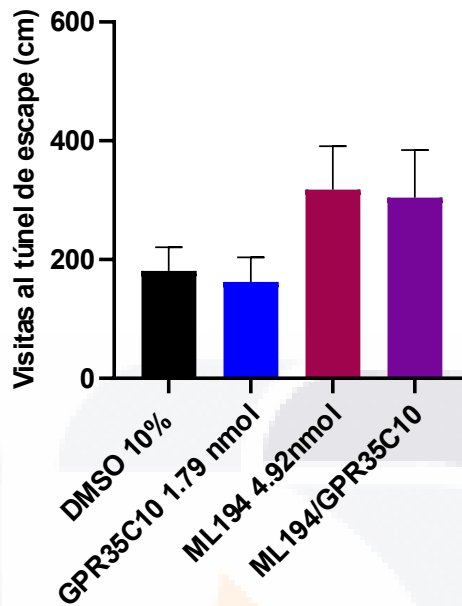


Figura 28. Recorrido en el área de visita del túnel de escape, por tratamientos. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante análisis ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$.

6.1.2 *Análisis de estrategias para la resolución del laberinto de Barnes*

Otros parámetros para evaluar el aprendizaje y a memoria fueron las estrategias para la resolución del laberinto de Barnes. Las tres estrategias empleadas fueron: (i) la estrategia serial, (ii) la estrategia aleatoria y (iii) la estrategia espacial (Figura 29). Los datos de los trayectos fueron obtenidos por medio del software Fiji (ImageJ). El porcentaje de estrategia fue analizado mediante un análisis de ANOVA de una vía con $\alpha: 0.05$, con prueba de *Student-Newman-Keuls* y el cambio de estrategia por sesión y por tratamiento con un análisis RM-ANOVA de doble vía con $\alpha: 0.05$.

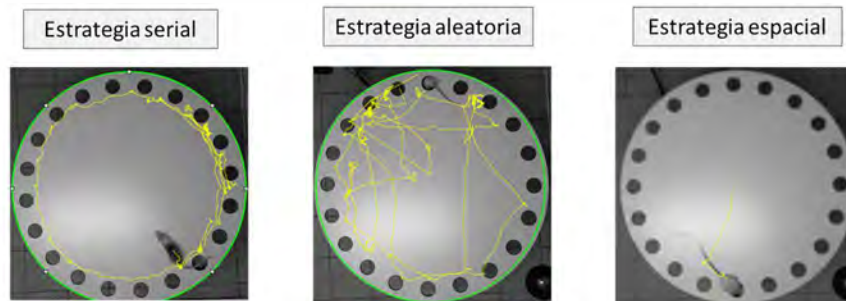


Figura 29. Descripción gráfica de las trayectorias características de cada estrategia.

i. *Porcentaje de estrategias totales en el laberinto de Barnes*

El análisis del porcentaje de las estrategias abarca a las estrategias totales durante los cuatro días que duró el estudio de navegación espacial. Para el análisis de las estrategias por tratamiento se empleó un análisis de varianza ANOVA de una vía a un nivel de significancia de $\alpha:0.05$.

La figura 30 muestra el porcentaje de uso de las estrategias: serial, aleatoria y espacial para la resolución del laberinto de Barnes por tratamiento. La estrategia serial fue usada indistintamente por el animal para la resolución del laberinto sin arrojar diferencias significativas en ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$). Contrariamente, la media del porcentaje de la estrategia aleatoria fue significativamente mayor en el tratamiento GPR35C10 ($p < 0.05$) en comparación a los tratamientos DMSO 10% y ML194 (4.92 nmol). La estrategia espacial tuvo una media de porcentaje significativamente menor ($p < 0.05$) del tratamiento GPR35C10 (1.79 nmol) en comparación al vehículo.

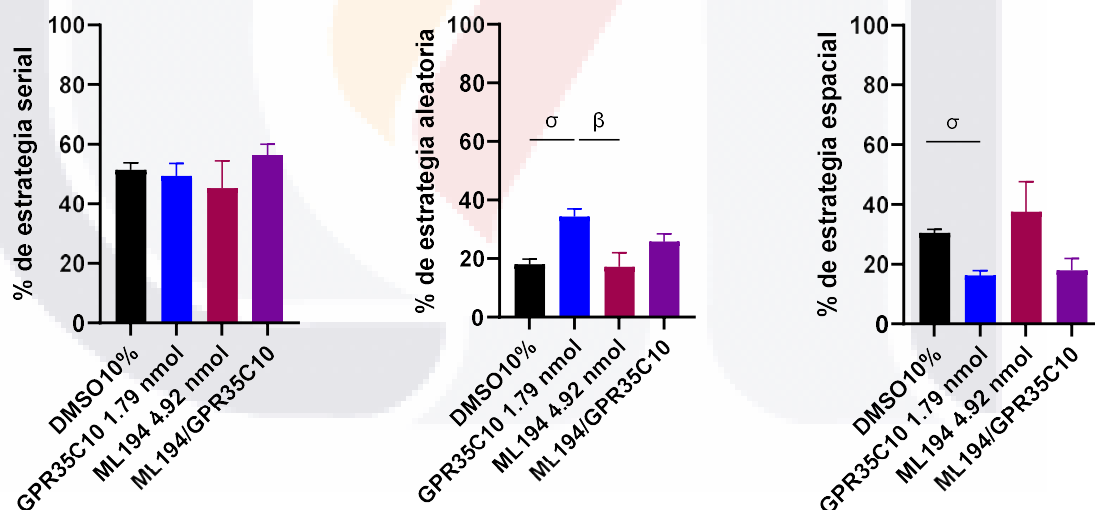


Figura 30. Porcentaje de estrategia serial, aleatoria y espacial para la resolución del laberinto de Barnes. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante análisis ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$.

ii. Cambio en el porcentaje de estrategias para la resolución del laberinto de Barnes en las sesiones S_1 y S_4

El cambio de las estrategias para la resolución del laberinto de Barnes se analizó en función de los tratamientos y de la primera y última sesiones de entrenamiento (S_1 y S_4). Los análisis fueron llevados a cabo por medio de un análisis de varianza RM-ANOVA de doble vía a un nivel de significancia de $\alpha:0.05$ y prueba de *Holm-Sidak*.

En la figura 31 se analiza el cambio de estrategia serial y aleatoria en función del tratamiento y la sesión de entrenamiento. En la estrategia serial no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) pero, sí en las sesiones; existiendo una reducción significativa ($p > 0.05$) en la cuarta sesión del tratamiento ML194 (4.92 nmol). En el porcentaje de cambio de la estrategia espacial no se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en tratamientos ni en sesiones del entrenamiento.

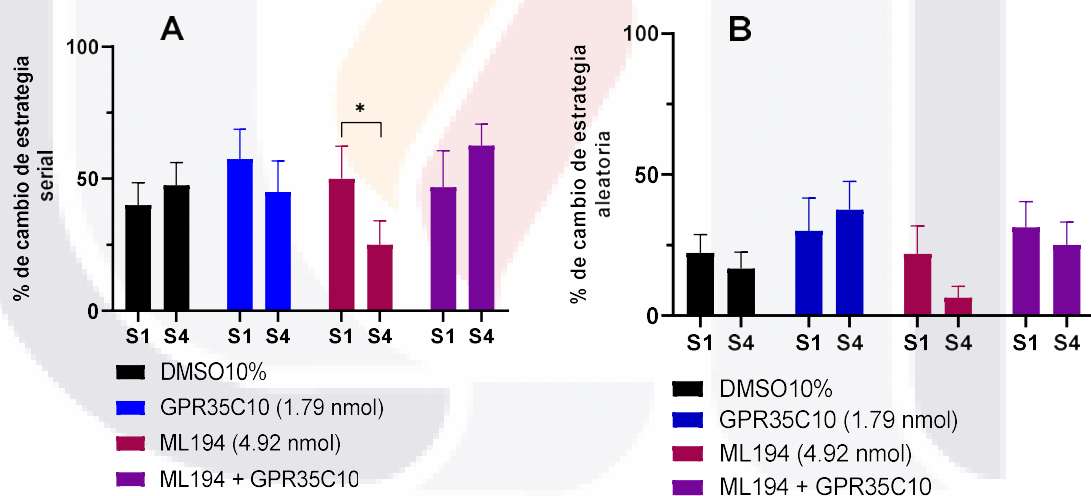


Figura 31. Cambio en el porcentaje de estrategias serial y aleatorio por tratamiento y sesiones. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante análisis RM-ANOVA de doble vía. *, $p < 0.05$.

En la figura 32 se analiza el cambio en la estrategia espacial en función del tratamiento y la sesión del entrenamiento. El tratamiento antagonista ML194 (4.92 nmol) tuvo una media de porcentaje de estrategia espacial significativamente mayor en la cuarta sesión a

comparación del resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Referido a las sesiones de cada tratamiento, el tratamiento antagonista ML194 (4.92 nmol) tuvo en su cuarta sesión una media de porcentaje de estrategia espacial significativamente mayor que en su primera sesión ($p > 0.05$), contrario a lo que sucedió con el resto de los tratamientos en donde no hubo diferencias significativas entre su primera y cuarta sesión ($p < 0.05$).

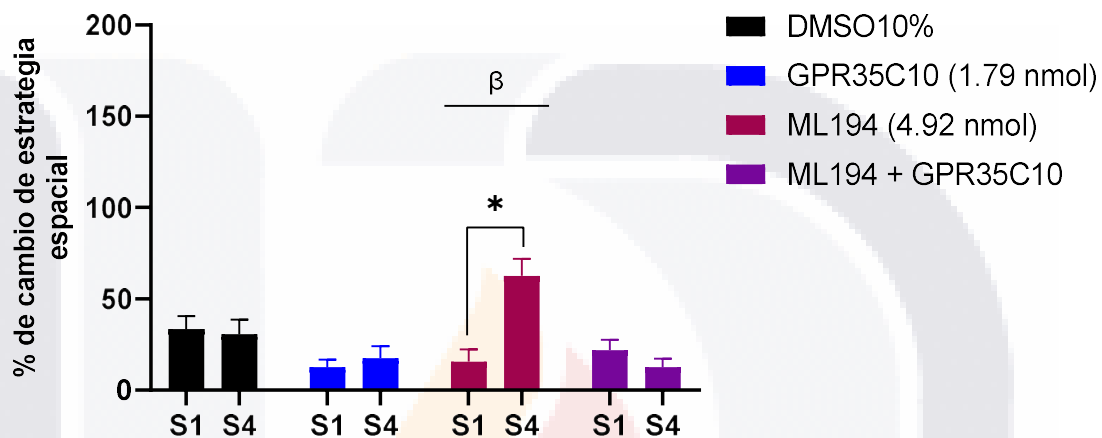


Figura 32. Cambio en el porcentaje de estrategia espacial por tratamiento y sesiones. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante RM-ANOVA de dos vías. *, $p < 0.05$; β , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

iii. *Esquematización de las estrategias por grupos y por día de entrenamiento*

Se realizó una selección con las imágenes más representativas de las estrategias usadas por una misma rata de cada tratamiento. Visualmente, se observó que el tratamiento DMSO 10% y ML194 (4.92nmol) tuvieron una mayor incidencia en la estrategia espacial que a comparación del tratamiento GPR35C10 (1.79nmol) en el cual prevaleció la estrategia aleatoria y serial mientras que en el grupo ML194 + GPR35C10 hubo una mayor prevalencia en el uso de la estrategia serial.

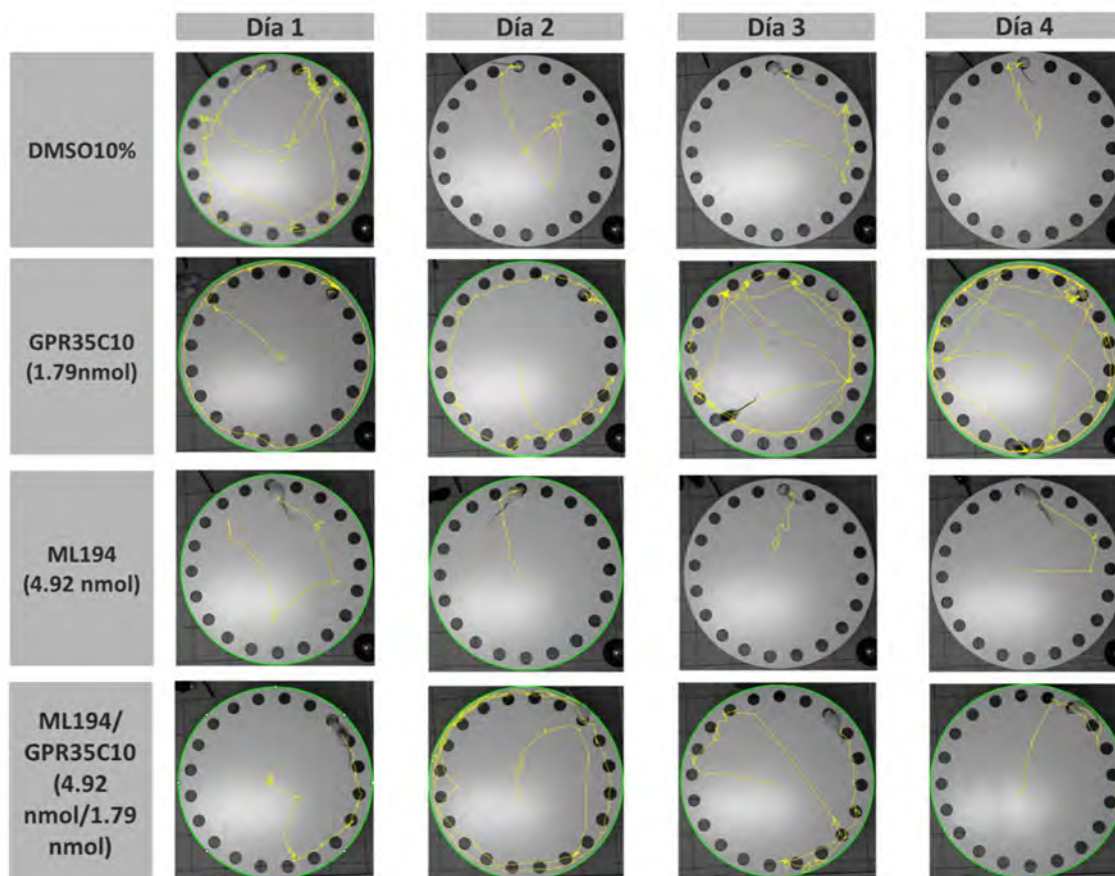


Figura 33. Esquematzación de las estrategias empleadas por una rata representativa de cada grupo.

iv. *Análisis histológico para comprobación de la cirugía estereotáctica*

El análisis histológico con tinción de Nissl permitió verificar la precisión con la cual se realizó la cirugía estereotáctica. La mayoría de las cánulas insertadas de manera bilateral para el tratamiento DMSO 10% cayeron en las regiones menos ventrales del hipocampo cerca de la región CA₁ representando al 70% del total de las cirugías mientras que el otro 30% fue más ventral. El tratamiento agonista GPR35C10 (1.79 nmol) tuvo un porcentaje de aciertos en CA₁ del 30% mientras que el resto terminó en regiones como el giro dentado y CA₃. El tratamiento antagonista ML194 (4.92 nmol) tuvo un porcentaje de aciertos similar al del agonista con un 30% de las cánulas en CA₁ hipocampal, 50% en el giro dentado y un 20% en CA₃.



Figura 34. Análisis histológico de los grupos vehículo (DMSO 10%), agonista (1.79 nmol) y ML194 (4.92 nmol) en el hipocampo.

6.2 Evaluación de la respuesta ansiosa por la manipulación farmacológica del GPR55 del área gris periacueductal (PAG)

6.2.1 Análisis de la respuesta ansiosa por evitación activa en el paradigma de enterramiento defensivo.

La respuesta ansiosa de evitación activa que también se le conoce como confrontación activa fue medida con el paradigma de enterramiento defensivo mediante la evaluación de conductas innatas como: el enterramiento, el tiempo en movimiento, el tiempo inmóvil, posturas estereotipadas defensivas en dirección a la fuente de la amenaza y la frecuencia de acicalamiento. Todas estas variables y sus tratamientos correspondientes fueron evaluados en búsqueda de diferencias entre grupos por un análisis de varianza ANOVA de una vía con un nivel de significancia de $\alpha:0.05$ y una prueba de *Student-Newman-Keuls*.

i. Evaluación de la conducta de enterramiento

La conducta de enterramiento se midió en función del tiempo que duró el animal enterrando y la altura de la pila de aserrín después de haber concluido tal enterramiento.

En la figura 35, la altura de la pila de aserrín se refiere a la altura final del lecho que desplazó el animal hacia la fuente de la amenaza (el electrodo) con sus patas delanteras. Las ratas administradas con el tratamiento agonista ML184 (0.425 nmol) se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la altura de la pila del lecho de aserrín a comparación del resto de los tratamientos. El grupo agonista ML184 (0.425 nmol), gráficamente tuvo una

disminución con respecto a los demás tratamientos, pero sin ser estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

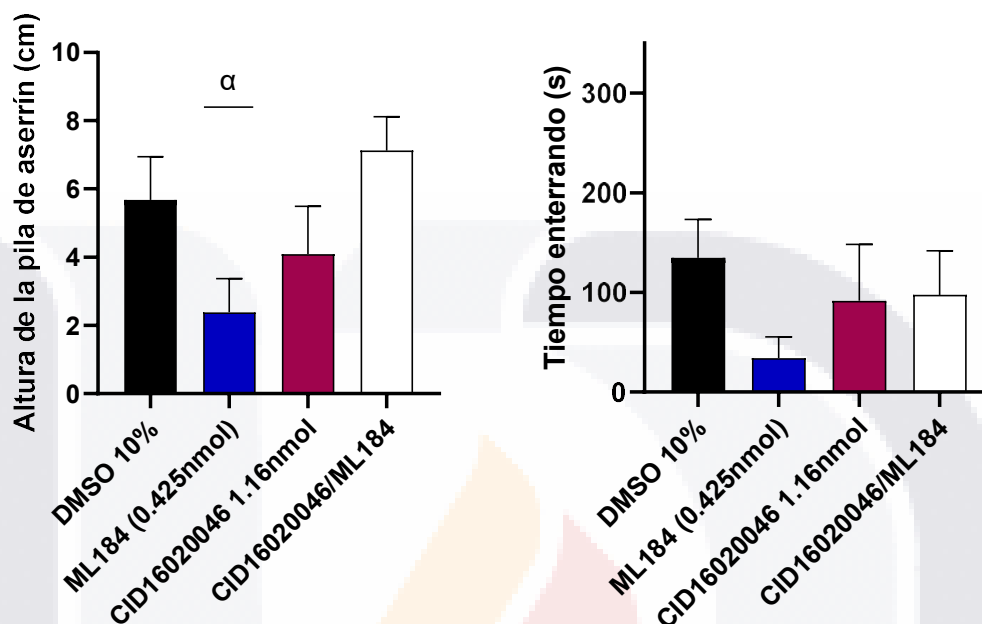


Figura 35. Conducta de enterramiento en función de la altura de la pila y el tiempo de enterramiento. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

Otra manera para medir la conducta de confrontación activa (lucha) en la rata fue mediante el coeficiente de enterramiento que relaciona el tiempo de enterramiento y los periodos de inmovilidad de la rata. La media del coeficiente de enterramiento fue comparada entre los tratamientos mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía con una significancia de α : 0.05 y una prueba de Student- Newman- Keuls.

En la figura 36, el tratamiento agonista ML184 (0.425 nmol) mostró un coeficiente de enterramiento significativamente menor ($p < 0.05$) que el resto de los tratamientos, mientras que el tratamiento vehículo, agonista ML184 (0.425 nmol), antagonista CID16020050 (1.16 nmol) y ML184 + CID16020046, no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$).

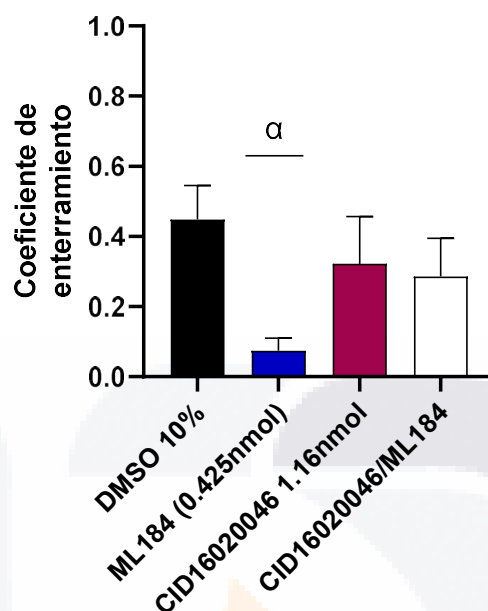


Figura 36. Gráfico del coeficiente de enterramiento en el paradigma de enterramiento defensivo. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante una ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; α , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

ii. *Evaluación de conducta motora*

La conducta motora fue evaluada en términos de tiempo que duró la rata en movimiento durante los quince minutos de la prueba y el tiempo que permaneció inmóvil dentro del mismo periodo. Para el análisis de los tiempos entre tratamientos se recurrió a un análisis de varianza de una vía ANOVA con un nivel de significancia de α : 0.05 y con una prueba de *Student-Newman-Keuls*.

En la figura 37, se evaluó el tiempo que permaneció en movimiento la rata; ya sea enterrando, deambulando, acicalándose o realizando cualquier otro movimiento que no fuera solo el de su propia respiración. Los animales del tratamiento agonista ML184 (0.425 nmol) tuvieron un menor tiempo de movilidad ($p < 0.05$) en comparación de las ratas de los tratamientos DMSO 10% y CID16020046 (1.16 nmol). Además, se observó una tendencia del grupo ML184 + CID16020046 a ser menor que el antagonista. Como contraparte, el grupo agonista tuvo un tiempo de inmovilidad significativamente mayor ($p > 0.05$) que los

tratamientos agonista y antagonista, existiendo una tendencia entre el grupo CID16020046 + ML184 y el grupo antagonista CID16020046.

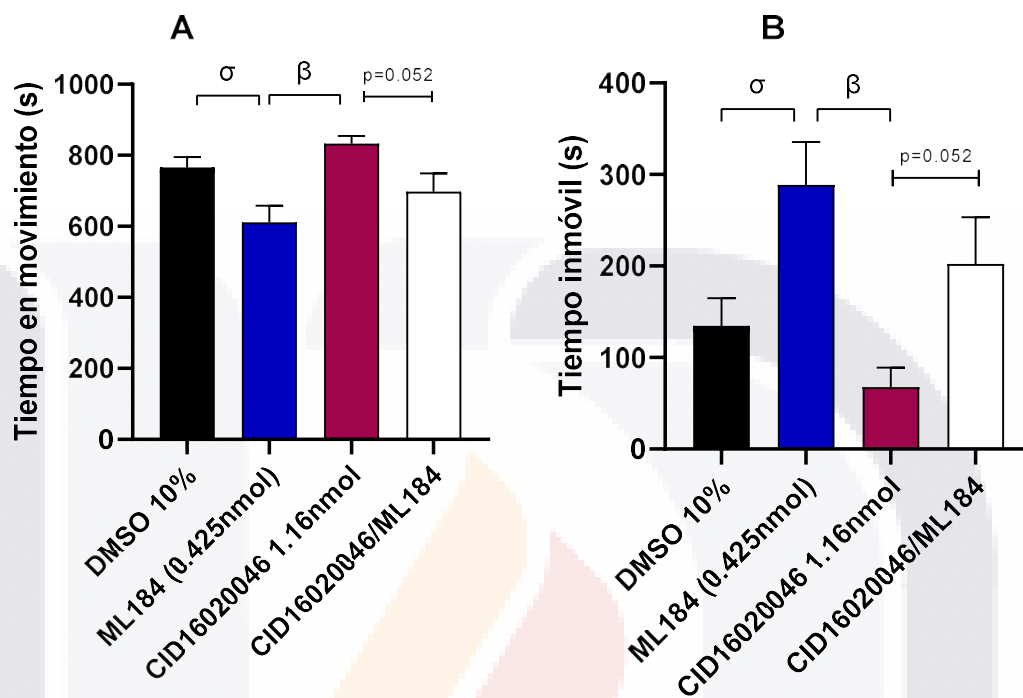


Figura 37. Conducta motora en enterramiento defensivo. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; σ , $p < 0.05$ vs. DMSO 10%, β , $p < 0.05$ vs CID16020046 (1.16 nmol)

iii. *Evaluación de posturas defensivas y de escape*

La postura defensiva se refiere al número de veces que la rata encaró al electrodo y retrocedió y la postura de escape se refiere al número de veces que la rata se levantó en las dos patas traseras y observó a los alrededores. Las variables de frecuencia en la postura defensiva y la postura exploratoria fueron evaluadas con un análisis de varianza ANOVA de una vía con una significancia de α : 0.05 y prueba de *Student-Newman-Keuls*.

En la figura 38, no se muestran diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en las variables de postura defensiva y de la frecuencia de postura de escape ($p < 0.05$). Sin embargo, gráficamente se observa una disminución de la frecuencia en ambas posturas del tratamiento agonista ML184 (0.425 nmol) en comparación con el resto de los tratamientos.

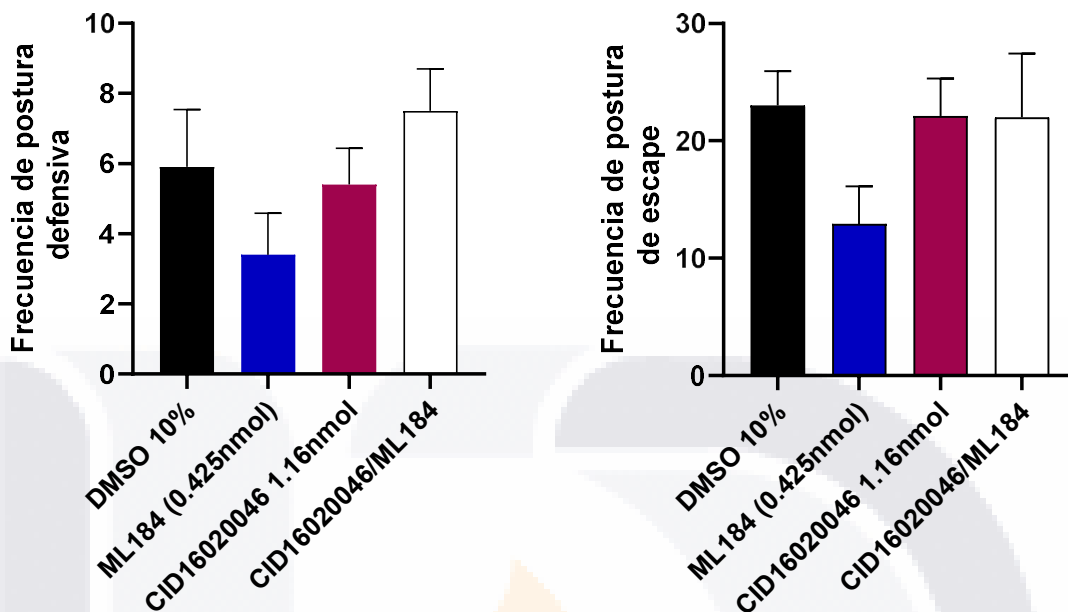


Figura 38. Conducta defensiva y de escape en el paradigma de enterramiento defensivo. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$.

6.2.2 *Análisis de la respuesta ansiosa etológica en el paradigma de laberinto elevado en cruz y campo abierto*

La respuesta conductual de confrontación pasiva (ansiedad etológica) en el laberinto elevado en cruz fue evaluada mediante la medición del tiempo en brazos abiertos y brazos cerrados, así como la distancia que la rata recorrió en estos, mientras que en el paradigma de campo abierto se evaluó el tiempo y la distancia en los cuadrantes externo y el cuadrante interno, así como las posturas exploratorias. Estas variables fueron evaluadas mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía con una significancia de $\alpha: 0.05$ y una prueba de *Student-Newman-Keuls*.

i. Evaluación del tiempo en brazos abiertos y brazos cerrados del laberinto elevado en cruz

En la figura 39, se midió el tiempo entre tratamientos que los animales permanecieron en los brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Se observaron diferencias entre los tratamientos siendo el grupo CID16020046 + ML184 el que permaneció más tiempo en

los brazos abiertos del laberinto en comparación del resto de los tratamientos (Figura 39a, $p < 0.05$). En contraparte, el tratamiento CID16020046 + ML184 tuvo el menor tiempo en los brazos cerrados del laberinto que en comparación al resto de los tratamientos (Figura 39b, $p < 0.05$).

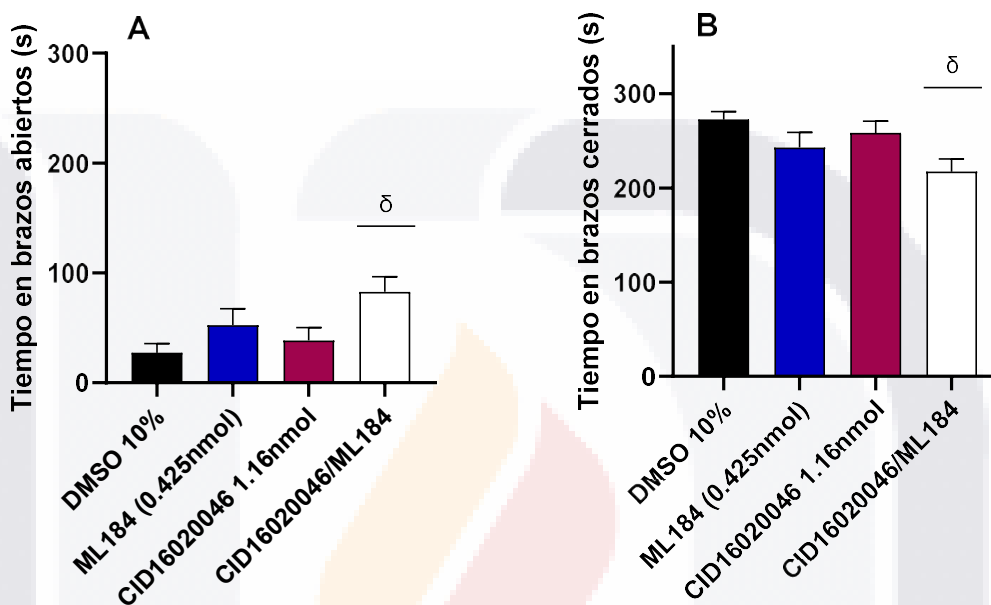


Figura 39. Tiempo en brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; δ , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

ii. *Evaluación de la distancia recorrida en brazos abiertos y brazos cerrados del laberinto elevado en cruz*

En la figura 40, se midió la distancia entre tratamientos que los animales recorrieron en los brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Se observaron diferencias entre los tratamientos siendo el grupo CID16020046 + ML184 el que recorrió una mayor distancia en los brazos abiertos del laberinto en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 40a, $p < 0.05$). Mientras que, en la distancia recorrida en los brazos cerrados, no fue posible ver diferencias estadísticas significativas (Figura 40b, $p < 0.05$).

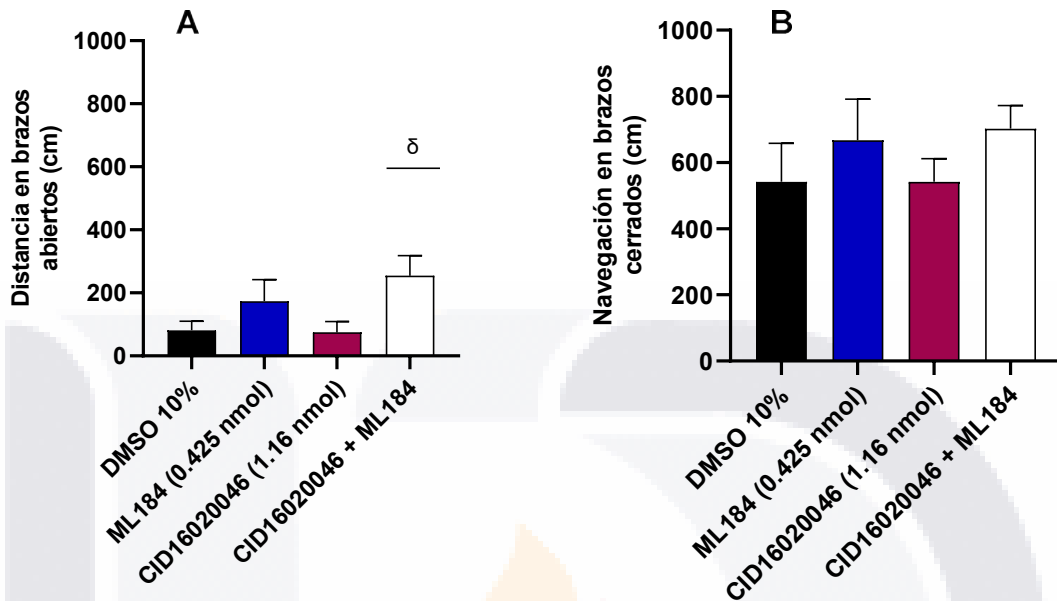


Figura 40. Navegación en brazos abiertos y cerrados del laberinto elevado en cruz. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; δ , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

iii. *Evaluación del tiempo en los cuadrantes internos y externos del paradigma de campo abierto*

En la figura 41, el tiempo que permanecieron los animales en los cuadrantes externos del paradigma de campo abierto no mostró diferencias estadísticamente significativas ni gráficas entre tratamientos (Figura 41a, $p > 0.05$). El tiempo de permanencia en el cuadrante internos se observó un incremento gráfico discreto en el grupo ML184 (0.425 nmol) pero sin ser estadísticamente significativo (Figura 41b, $p > 0.05$).

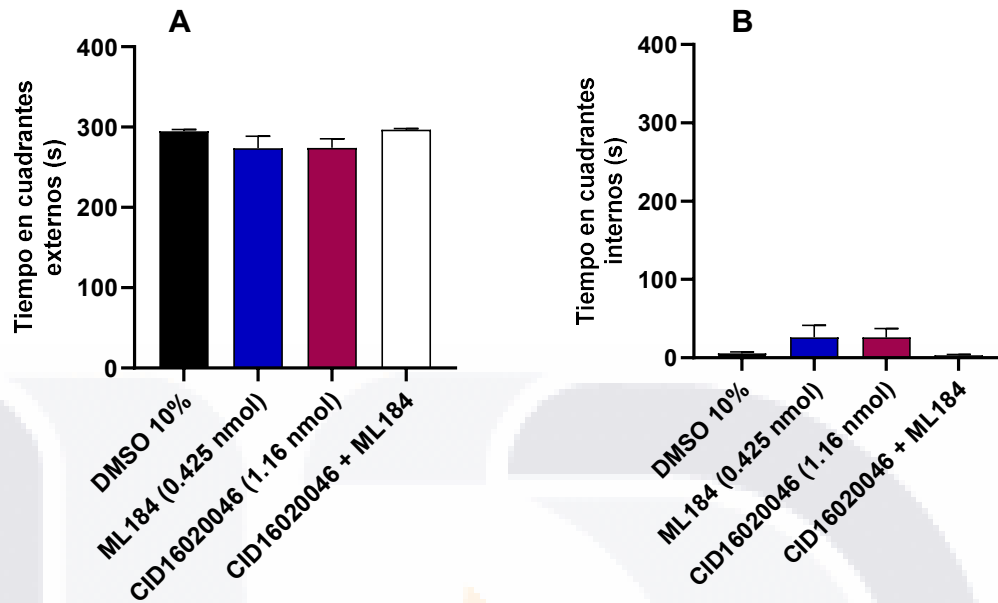


Figura 41. Tiempo en los cuadrantes externos y cuadrantes internos del paradigma en campo abierto. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$.

En la figura 42, la distancia recorrida entre cuadrantes externos no fue significativamente diferente entre los tratamientos evaluados (Figura 42a, $p > 0.05$), mientras que el tratamiento CID16020046 + ML184 mostro recorrer una distancia significativamente menor en el cuadrante interno que en comparación con los otros tratamientos (Figura 42b, $p < 0.05$).

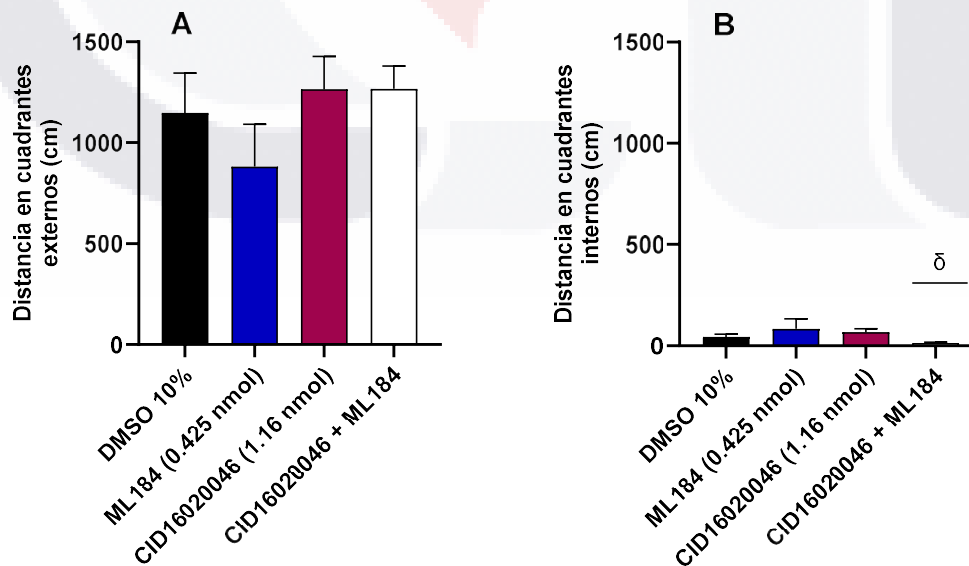


Figura 42. Navegación en los cuadrantes internos y externos del paradigma de campo abierto. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; δ , $p < 0.05$ vs. el resto de los grupos.

En la figura 43, la frecuencia de posturas exploratorias fue significativamente mayor con respecto a los tratamientos vehículo DMSO 10% y agonista ML184 (4.92 nmol) ($p < 0.05$) pero no con respecto al tratamiento CID16020046 (1.16 nmol) ($p > 0.05$).

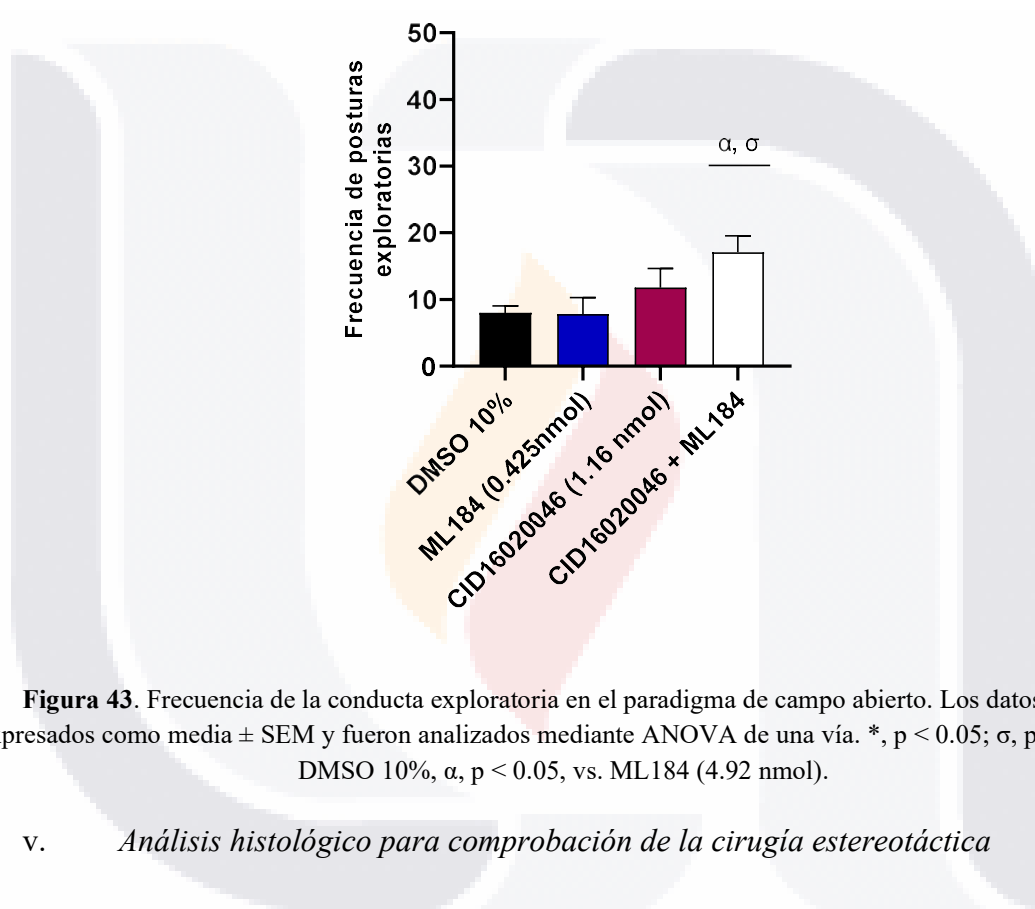


Figura 43. Frecuencia de la conducta exploratoria en el paradigma de campo abierto. Los datos están expresados como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía. *, $p < 0.05$; σ , $p < 0.05$ vs. DMSO 10%, α , $p < 0.05$, vs. ML184 (4.92 nmol).

v. *Análisis histológico para comprobación de la cirugía estereotáctica*

El análisis histológico con tinción de Nissl permitió verificar la precisión con la cual se realizó la cirugía estereotáctica. El 50% de las cánulas insertadas unilateralmente para el tratamiento DMSO 10% terminaron en d-PAG, el 20% en m-PAG y el 30% en v-PAG. Para el tratamiento agonista ML184 (0.425 nmol) el 100% de las canulaciones corresponde a d-PAG y para el tratamiento antagonista CID16020046 (1.16 nmol) también se uvo un porcentaje de acierto del 100% en d-PAG.

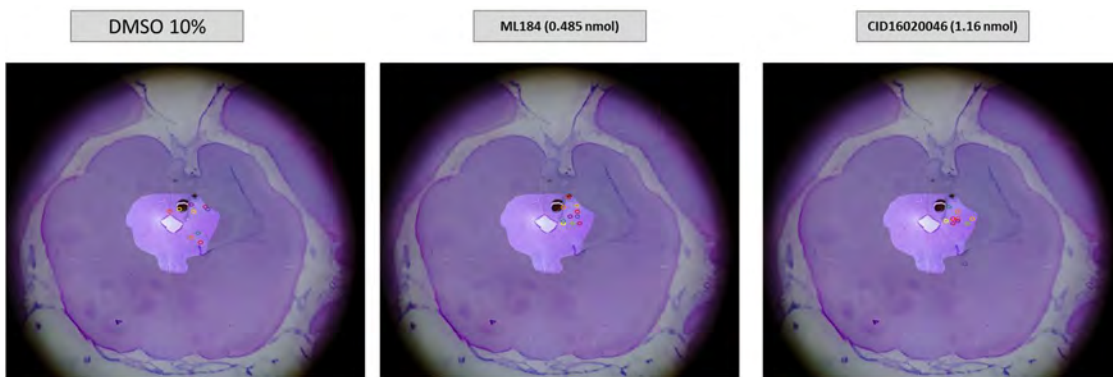


Figura 44. Análisis histológico de los grupos vehículo (DMSO 10%), agonista ML184 (0.425 nmol) y CID16020046 (1.16 nmol) en PAG.

7 DISCUSIÓN

7.1 Efectos en la memoria por la manipulación farmacológica del GPR35

Se ha revisado que la memoria es el fenómeno neuroplástico que involucra la adquisición y almacenamiento dinámico de información y que permite evocarla en un momento dado. El proceso de consolidación de la memoria se da de manera importante en las regiones del hipocampo encargadas de la memoria, sobre todo la espacial en el área CA₁, CA₃ y el giro dentado. Partiendo de esta premisa, receptores GPR de reciente descubrimiento como lo es el GPR35 y que pudiera ser una nueva diana terapéutica, se encontró expresado en el sistema nervioso central, específicamente en las interneuronas y neuronas piramidales del hipocampo, zona de interés en donde se estudió por primera vez los mecanismos de formación de la memoria y de la potenciación a largo plazo (Alkondon et al., 2015).

Uno de los principales cuestionamientos previo a abordar el tema de la memoria y la relación que esta guarda con GPR35, es el mecanismo con el que GPR35 pudiera estar modulando la actividad hipocampal. Tomando en cuenta que las neuronas en las que se encuentra expresado GPR35 en el hipocampo son del tipo piramidal y se sabe que estas neuronas además de participar en la integración cognitiva, de memoria espacial y contextual, también representan una de las fuentes excitatorias principales por la vía glutamatérgica y colinérgica por lo que se ven fuertemente involucradas en procesos de plasticidad neuronal (Graves et al., 2012). Estas neuronas se autorregulan por receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGlurs) y muscarínicos, lo interesante de tal autorregulación es que algunas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

familias de mGlurs (Familia II y III) son inhibitorios de la enzima adenilato ciclasa por la vía $G\alpha_{i/o}$ y también tienen acción negativa sobre canales de calcio, sobre todo los $Ca_{v2.1}$ y $Ca_{v2.2}$ (H. Wang & Zhuo, 2012). Análogamente, GPR35 es otro receptor del tipo metabotrópico con una vía de señalización de proteínas $G\alpha_{i/o}$ que pareciera también estar participando en la modulación de la respuesta excitatoria de las neuronas piramidales, GPR35 además de inhibir a la adenilato ciclasa, bloquea mediante las subunidades $\beta\gamma$ a los canales $Ca_{v2.2}$ los cuales desempeñan un papel importante en la plasticidad neuronal al establecer asociaciones sinérgicas con receptores AMPA para el fortalecimiento de las sinapsis (J. Guo et al., 2008; Kang et al., 2006b). La evidencia antes descrita hace presuponer que GPR35 al ser estimulado podría tener un efecto debilitador sobre la actividad hipocampal, la plasticidad y finalmente sobre el aprendizaje y la memoria al inhibir la actividad de las neuronas piramidales.

El supuesto anterior se puede verificar mediante la evaluación y cuantificación indirecta de la función hipocampal producto de la estimulación de GPR35 usando metodologías conductuales como el laberinto de Barnes. El laberinto de Barnes proporcionó datos de tiempos, distancia y estrategias para su resolución a lo largo de un entrenamiento de cuatro días y se observó que en el último día de entrenamiento (S_4), las ratas a la que se le bloqueó el GPR35 con el antagonista ML194 (4.92 nmol) tuvieron en promedio tiempos de resolución de **13.94s** significativamente menores a los del grupo agonista GPR35C10 (1.79nmol) con medias de resolución de **72.22s**. Además del tiempo, hubo un decremento significativo en la distancia total de resolución del laberinto entre la primera sesión de entrenamiento (S_1) y la última sesión (S_4) en los grupos vehículo DMSO 10% y tratamiento antagonista/agonista de aproximadamente el 50% y con el receptor bloqueado con ML194 (4.92 nmol) de más del 50%. No siendo así en el caso del grupo agonista CPR35C10 (1.79 nmol) en donde no hubo una diferencia significativa entre la distancia que le tomó a la rata en la S_1 y S_4 para resolver el laberinto. Esta evidencia nos permite distinguir en cuales grupos experimentales sí se estaba dando un aprendizaje espacial (DMSO 10%, ML194 [4.92 nmol] y ML194 + GPR35C10 [4.92nmol]) y en cual los animales no eran capaces de recordar las pistas para el túnel de escape (GPR35C10 [1.79nmol]). Tales hallazgos concuerdan con los resultados de las pruebas moleculares de (Berlinguer-Palmini et al., 2013) en donde estimularon a GPR35 con ácido quinurénico y aislaron su efecto al inhibir receptores a los cuales este agonista

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también es afín como su efecto antagónico en los receptores NMDA, observaron una disminución en la amplitud potenciales excitatorios postsinápticos cuando GPR35 fue activado y una recuperación en la actividad al ser expuesto a una combinación agonista-antagonista de ácido quinurénico + ML194, denotando a su vez la cualidad selectiva de este antagonista.

Dentro de las diversas definiciones y clasificaciones de la memoria se encuentra a la memoria declarativa y no declarativa, un subtipo es la memoria declarativa episódica que se caracteriza por la asociación consciente de contextos espaciales y temporales. El sistema cortico-límbico y principalmente el hipocampo participa en la memoria declarativa episódica (Sharma et al., 2010). Otra de las maneras conductuales para determinar la actividad hipocampal es la evaluación de las estrategias espaciales para la resolución del laberinto, una estrategia espacial involucra la asociación consciente de las pistas espaciales y con el túnel de escape y una comunicación activa entre las áreas corticales visuales, de atención dirigida, pero sobre todo de estas con el hipocampo (Boss, 1986).

Conductualmente se observó que bloqueando al receptor GPR35 con ML194 (4.92nmol) se obtuvo una mayor respuesta espacial al tener un incremento en la estrategia espacial entre S₁ y S₄ de más del 50% y además de que fue el tratamiento que más tuvo una estrategia espacial a comparación del agonista de GPR35 y del grupo vehículo, por lo que cuando el receptor se encuentra bloqueado, existe una mayor respuesta por parte del hipocampo, lo cual hace sentido al incrementar los flujos de calcio y por ende favoreciendo la liberación de neurotransmisor (glutamato siendo el más probable) de las neuronas piramidales del CA₁. Esto nos lleva a que GPR35 pudiera tener un tono de actividad basal que se encuentra regulando constantemente la actividad excitatoria neuronal (Alkondon et al., 2015). Además de esto, el grupo con el receptor activado (GPR35C10) tuvo en promedio hasta un 40% de incremento en estrategia aleatoria, lo que indica que no se vio involucrado el hipocampo ni los núcleos de la base para la resolución del laberinto.

Ante todo, se puede afirmar que GPR35 tiene efectos deletéreos sobre los tiempos de resolución del laberinto de Barnes, un incremento en los recorridos para la resolución del laberinto y un aumento significativo de la estrategia aleatoria. Caso totalmente contrario

cuando el receptor es bloqueado con el agonista ML194, se recurre significativamente más a la estrategia espacial para la resolución del laberinto y se disminuyen los tiempos y distancias de escape al túnel objetivo. Por lo que GPR35 y su activación podrían estar modulando procesos de neuroplasticidad y excitabilidad neuronal.

7.2 Efectos en la respuesta ansiosa por la manipulación del GPR55 del área gris periacueductal dorsal (PAG)

La ansiedad es la respuesta caracterizada por un estado de alerta constante y por ende un estado de estrés crónico que induce a una eventual hiperactividad del sistema neurovegetativo (Carlson, 2005). El circuito neuronal que desencadena la respuesta ansiosa es complejo y forma parte del sistema límbico. En este circuito se destacan tres partes fundamentales importantes que son. La amígdala, el locus cerúleo y PAG. La amígdala se encargará de integrar la información sensorial de los estímulos estresores ambientales, el locus cerúleo se encargará de evaluar la intensidad del estímulo y este, en su conjunto con la amígdala, enviarán la información a PAG para la ejecución de la respuesta defensiva apropiada (Graeff et al., 1993).

Como se mencionó, la intensidad del estímulo mediada por el locus cerúleo y transmitida para su ejecución en PAG, es un aspecto importante para considerar en los paradigmas conductuales. En este estudio se aplicaron tres paradigmas diferentes para la evaluación de la respuesta ansiosa en donde el paradigma de **enterramiento defensivo**, en el cual se aplicó una descarga eléctrica que favoreció la aparición de una respuesta ansiosa de confrontación activa o bien de confrontación pasiva. La diferencia entre estos dos tipos de respuesta se refiere a la aparición de posturas o acciones de lucha para el caso de confrontación activa o bien de evitación a la fuente de peligro y una reducción en la movilidad cuando se trata de una confrontación pasiva. Para la evaluación de tales efectos se usó al coeficiente de enterramiento en el cual se observó una reducción significativa del valor de éste en el tratamiento ML184 (0.425 nmol) con un valor de 0.07 denotando una respuesta altamente pasiva en comparación de los otros tratamientos DMSO 10%, CID16020046 (1.16 nmol) y CID16020046 + ML184 (1.16 nmol + 0.425 nmol) con valores rondando entre 0.28-0.44. Los valores del coeficiente de enterramiento menores a 0.5 indican una prevalencia de

confrontación pasiva siendo más evidentes conforme se acercan al cero, mientras que los valores de este coeficiente por arriba de 0.5 se refieren a respuestas de confrontación activa intensificándose conforme se acercan más al valor de 1.0 (Fucich & Morilak, 2018).

La prevalencia de una respuesta conductual de confrontación pasiva al activar GPR55 con su agonista selectivo ML184 (0.425 nmol) es consistente con la disminución en la actividad locomotora con una media de tiempo en movimiento de **611.36s** significativamente menor a las de los otros tratamientos y en contraparte con un incremento significativo en la cantidad de tiempo inmóvil promedio de **288.641s**. Por otro lado, los parámetros de tiempo de enterramiento y de altura de la pila de aserrín también corresponden a conductas de confrontación activa y una disminución en tales parámetros se interpreta como un efecto ansiolítico (Koob et al., 2014) como el caso del tratamiento ML184 (0.425 nmol) que tuvo una altura de la pila de **2.39 cm** significativamente más pequeña que la altura de la pila de los tratamientos vehículo, antagonista y antagonista + agonista. Ante tales cambios, se puede afirmar que la activación del GPR55 trae consigo una disminución de conductas activas de lucha cuando la rata se enfrenta a un estímulo nocivo y que, por el contrario, el bloqueo de éste potencia los efectos activos de conducta defensiva a nivel de PAG.

El área gris periacueductal (PAG) es la región del sistema límbico que en conjunto con la amígdala se encargan de la componente afectiva de la ansiedad. La respuesta de confrontación activa y de lucha son mediadas por la porción dorsal (d-PAG) mientras que la respuesta de confrontación pasiva es facilitada por la porción ventral (v-PAG). Los estímulos dolorosos, como en enterramiento defensivo fue la descarga eléctrica con el electrodo llegan directamente a d-PAG (Deliu et al., 2015) y desencadenan en ratas intactas una respuesta de confrontación activa caracterizada por saltos, carrera y enterramiento mientras que un condicionamiento por miedo ante la existencia de estímulos innatos y distales que suponen cierto peligro para el animal como en el caso del laberinto elevado en cruz y campo abierto, favorece a una respuesta de confrontación pasiva y la rata permanece expectante (Brandão et al., 2008). Los resultados previamente analizados en el paradigma de enterramiento defensivo sugieren que existe una inhibición de la función de d-PAG cuando GPR55 es activado dada la disminución en las respuestas conductuales de confrontación activa

previamente descritas, respaldado en los resultados histológicos en donde la mayoría de las cánulas insertadas vía cirugía estereotáctica en PAG corresponden a d-PAG. El fenómeno que pudiera estar tomando lugar es que al existir una inhibición de d-PAG, la proporción de confrontación activa sería menor que en comparación con las respuestas pasivas mediadas por v-PAG por lo que el animal tendería a permanecer inmóvil y expectante.

Los paradigmas empleados para el análisis de los estímulos innatos etológicos fueron los paradigmas de campo abierto y laberinto elevado en cruz, en el laberinto elevado en cruz se obtuvo en el tratamiento CID16020046 + ML184 (1.16 nmol + 0.425 nmol) en efecto ansiolítico marcado con una media de **82.986s** de tiempo en brazos abiertos significativamente mayor al resto de los tratamientos y como contraparte, una media de tiempo en brazos cerrados de **217.014s** significativamente menor al resto de los tratamientos. Además, la distancia recorrida en brazos abiertos también fue mayor en el tratamiento combinado con una media de **254.44 cm** significativamente mayor que todos los tratamientos. El efecto ansiolítico opuesto a la inmovilidad (Brandão et al., 2008) en el tratamiento combinado no solamente estuvo presente en el laberinto elevado en cruz, sino que también en el paradigma de campo abierto en donde la media de exploraciones fue de **17.1** significativamente mayor que el grupo agonista ML184 (0.425 nmol) y el grupo vehículo (DMSO 10%) siendo en los cuadrantes externos en donde se dio en mayor medida tal conducta exploratoria.

Este patrón en la respuesta ansiolítica con el tratamiento combinado CID16020046 + ML184 (1.16 nmol + 0.425 nmol) nos permite debatir sobre la afinidad que tiene el agonista ML184 (CID2440433) sobre GPR55, ya que este tratamiento combinado en ninguno de los dos paradigmas se comportó como el tratamiento antagonista. Este comportamiento indica que ML184 pudiera estar actuando por un receptor diferente al GPR55 ya que cuando se diseñó al ML184, si bien presentó una potencia de 110-250 nM EC₅₀, también se especificó que en GPR55 se tenía una afinidad 100 veces mayor que en GPR35, CB₁ y CB₂ (Kotsikorou et al., 2011). Por lo que esta posibilidad no se descarta y pudiera ser que los efectos ansiolíticos de ML184 pudieran estar siendo mediados por mecanismos diferentes a GPR55.

8 CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la activación de GPR35 en hipocampal reduce la capacidad de aprendizaje en el laberinto de Barnes. Además, reduce la estrategia de navegación espacial y la memoria de lugar. Por lo tanto, el GPR35 hipocampal parece modular negativamente la actividad hipocampal.

El GPR55 de PAG parece modular la respuesta de confrontación activa, disminuyéndola y favoreciendo las respuestas conductuales propias de la confrontación pasiva. Mientras que la combinación ML184+CID16020046 desenmascaró efectos ansiolíticos y de aumento en la conducta de exploración inducidos por ML184 independientes al receptor GPR55, abriendo nuevas líneas de estudio.

Finalmente se concluye que estos receptores tienen un papel importante en la modulación de la actividad neuronal en sus respectivas áreas, sobre todo GPR35 podría ayudar a controlar fisiopatologías involucradas con una sobreexcitación neuronal y GPR55 en el tratamiento de trastornos afectivos, por lo que aquí se sienta la base para nuevas investigaciones respecto a estos dos receptores en SNC.

9 REFERENCIAS

- A. Marichal-Cancino, B., Fajardo-Valdez, A., E. Ruiz-Contreras, A., Mendez-Díaz, M., & Prospero-García, O. (2017). Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 15(5). <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160729155441>
- Aggleton, J. P., & Morris, R. G. M. (2018). Memory: Looking back and looking forward. *Brain and Neuroscience Advances*, 2, 2398212818794830. <https://doi.org/10.1177/2398212818794830>
- AGUILAR-ROJAS, A., PÉREZ-SOLIS, M. A., & MAYA-NÚÑEZ, G. (2016). The gonadotropin-releasing hormone system: Perspectives from reproduction to cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 48(3), 861–868. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3346>
- Akaike, N. (1997). Distribution of different types of calcium channels in the brain structures. *Neurophysiology*, 29(4–5), 233–240. <https://doi.org/10.1007/BF02461234>

- Alkondon, M., Pereira, E. F. R., Todd, S. W., Randall, W. R., Lane, M. V., & Albuquerque, E. X. (2015). Functional G-protein-coupled receptor 35 is expressed by neurons in the CA1 field of the hippocampus. *Biochemical Pharmacology*, *93*(4), 506–518. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.009>
- Ayada, C., Toru, Ü., & Korkut, Y. (2015). The relationship of stress and blood pressure effectors. *Hippokratia*, *19*, 99–108.
- Barnes, M. A., Carson, M. J., & Nair, M. G. (2015). Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. In *Cytokine* (Vol. 72, Issue 2, pp. 210–219). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.008>
- Basith, S., Cui, M., Macalino, S. J. Y., Park, J., Clavio, N. A. B., Kang, S., & Choi, S. (2018). Exploring G protein-coupled receptors (GPCRs) ligand space via cheminformatics approaches: Impact on rational drug design. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00128>
- Belcheva, M. M., Coscia, C. J., & Doisy, E. A. (2002). *Diversity of G Protein-Coupled Receptor Signaling Pathways to ERK/MAP Kinase*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2581518/pdf/nihms73223.pdf>
- Berlinguer-Palmini, R., Masi, A., Narducci, R., Cavone, L., Maratea, D., Cozzi, A., Sili, M., Moroni, F., & Mannaioni, G. (2013). GPR35 Activation Reduces Ca²⁺ Transients and Contributes to the Kynurenic Acid-Dependent Reduction of Synaptic Activity at CA3-CA1 Synapses. *PLoS ONE*, *8*(11), e82180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082180>
- Binti Mohd Amir, N. A. S., Mackenzie, A. E., Jenkins, L., Boustani, K., Hillier, M. C., Tsuchiya, T., Milligan, G., & Pease, J. E. (2018). Evidence for the Existence of a CXCL17 Receptor Distinct from GPR35. *The Journal of Immunology*, *201*(2), 714–724. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700884>
- Bisaz, R., Travaglia, A., & Alberini, C. M. (2014). The Neurobiological Bases of Memory Formation: From Physiological Conditions to Psychopathology. *Psychopathology*, *47*(6), 347–356. <https://doi.org/10.1159/000363702>

- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, *232*(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bonora, M., & Pinton, P. (2014). The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death. *Frontiers in Oncology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00302>
- Boss, B. J. (1986). The Neuroanatomical and Neurophysiological Basis of Learning. *Journal of Neuroscience Nursing*, *18*(5), 256–264. <https://doi.org/10.1097/01376517-198610000-00004>
- Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*, *188*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.018>
- Carlson, N. R. (2005). *Fisiología de la conducta* (8th ed., Vol. 1). Pearson Educación S.A. www.librosite.net/carlsonwww.pearsoneducacion.com
- Davies, M. N., Secker, A., Halling-Brown, M., Moss, D. S., Freitas, A. A., Timmis, J., Clark, E., & Flower, D. R. (2008). GPCRTree: online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Research Notes*, *1*(1), 67. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-67>
- De Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (2003). Defensive burying in rodents: Ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1–3), 145–161. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01278-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01278-0)
- De Kloet, E. R., & Reul, J. M. H. M. (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: A concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*, *12*(2), 83–105. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(87\)90040-0](https://doi.org/10.1016/0306-4530(87)90040-0)
- Deliu, E., Sperow, M., Console-Bram, L., Carter, R. L., Tilley, D. G., Kalamarides, D. J., Kirby, L. G., Brailoiu, G. C., Brailoiu, E., Benamar, K., & Abood, M. E. (2015). The lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates pain perception in the periaqueductal gray. *Molecular Pharmacology*, *88*(2), 265–272. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099333>

- Divorcy, N., Mackenzie, A. E., Nicklin, S. A., & Milligan, G. (2015). G protein-coupled receptor 35: an emerging target in inflammatory and cardiovascular disease. *Frontiers in Pharmacology*, *6*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2015.00041>
- Falasca, M., & Ferro, R. (2016a). Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Advances in Biological Regulation*, *60*, 88–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.003>
- Falasca, M., & Ferro, R. (2016b). Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Advances in Biological Regulation*, *60*, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.003>
- Fink, G. (2016). *Fink G. Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety. In: Fink G, ed. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior, Volume 1 of the Handbook of Stress Series. San Diego: Elsevier Inc., 2016: 3-11.*
- Fotiadis, D., Jastrzebska, B., Philippsen, A., Müller, D. J., Palczewski, K., & Engel, A. (2006). Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 252–259). <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.013>
- Fricker, L. D., & Devi, L. A. (2018). Orphan neuropeptides and receptors: Novel therapeutic targets. *Pharmacology & Therapeutics*, *185*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.006>
- Fucich, E. A., & Morilak, D. A. (2018). Shock-probe Defensive Burying Test to Measure Active versus Passive Coping Style in Response to an Aversive Stimulus in Rats. *Bio-Protocol*, *8*(17), e2998. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2998>
- Ghasemi, M., Navidhamidi, M., Rezaei, F., Azizikia, A., & Mehranfard, N. (2022). Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. In *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience* (Vol. 22, Issue 3, pp. 431–449). Springer. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00973-y>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. In *Neuromethods* (Vol. 42, pp. 1–20). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1

- Graeff, F. G., Silveira, M. C. L., Nogueira, R. L., Audi, E. A., & Oliveira, R. M. W. (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, *58*(1), 123–131. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90097-A](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90097-A)
- Graves, A. R., Moore, S. J., Bloss, E. B., Mensh, B. D., Kath, W. L., & Spruston, N. (2012). Hippocampal Pyramidal Neurons Comprise Two Distinct Cell Types that Are Countermodulated by Metabotropic Receptors. *Neuron*, *76*(4), 776–789. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.036>
- Gulyás, M., Bencsik, N., Puzsai, S., Liliom, H., & Schlett, K. (2016). AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program. *Neuroinformatics*, *14*(4), 479–481. <https://doi.org/10.1007/s12021-016-9303-z>
- Guo, J., Williams, D. J., Puhl, H. L., & Ikeda, S. R. (2008). Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor, heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *324*(1), 342–351. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.127266>
- Guo, P., Tai, Y., Wang, M., Sun, H., Zhang, L., Wei, W., Xiang, Y. K., & Wang, Q. (2022). Gα12 and Gα13: Versatility in Physiology and Pathology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.809425>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Harmar, A. J. (2001). Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology*, *2*(12), reviews3013.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-12-reviews3013>
- Hasenoehrl, C., Feuersinger, D., Kienzl, M., & Schicho, R. (2019). GPR55-Mediated Effects in Colon Cancer Cell Lines. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, *2*(1), 22–28. <https://doi.org/10.1159/000496356>
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A. B., Ford, L. A., Ross, R. A., Waldhoer, M., & Irving, A. J. (2009). The GPR55 ligand L-α-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *The FASEB Journal*, *23*(1), 183–193. <https://doi.org/10.1096/fj.08-108670>

- Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Schröder, R., Kargl, J. K., Platzer, W., Martini, L., Arthur, S., Penman, J., Whistler, J. L., Kostenis, E., Waldhoer, M., & Irving, A. J. (2010). GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *British Journal of Pharmacology*, *160*(3), 604–614. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00625.x>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(2), 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hill, J. D., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Winfield, M., Sriram, U., Rom, S., & Persidsky, Y. (2019). Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *76*, 165–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.017>
- Horii, Y., McTaggart, I., & Kawaguchi, M. (2018). Testing animal anxiety in rats: Effects of open arm ledges and closed arm wall transparency in elevated plus maze test. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(136). <https://doi.org/10.3791/56428>
- Hu, G.-M., Mai, T.-L., & Chen, C.-M. (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Scientific Reports*, *7*(1), 15495. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15707-9>
- Kaldun, J. C., & Sprecher, S. G. (2019). Initiated by CREB: Resolving Gene Regulatory Programs in Learning and Memory: Switch in Cofactors and Transcription Regulators between Memory Consolidation and Maintenance Network. *BioEssays*, *41*(8). <https://doi.org/10.1002/bies.201900045>
- Kandel, E. R. (2013). *Principles of neural science* (5th ed.). McGraw-Hill Medical.
- Kang, M.-G., Chen, C.-C., Wakamori, M., Hara, Y., Mori, Y., & Campbell, K. P. (2006a). A functional AMPA receptor–calcium channel complex in the postsynaptic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 5561–5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601289103>
- Kang, M.-G., Chen, C.-C., Wakamori, M., Hara, Y., Mori, Y., & Campbell, K. P. (2006b). A functional AMPA receptor–calcium channel complex in the postsynaptic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 5561–5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601289103>

- Kargl, J., Brown, A. J., Andersen, L., Dorn, G., Schicho, R., Waldhoer, M., & Heinemann, A. (2013a). A Selective Antagonist Reveals a Potential Role of G Protein–Coupled Receptor 55 in Platelet and Endothelial Cell Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *346*(1), 54. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.204180>
- Kargl, J., Brown, A. J., Andersen, L., Dorn, G., Schicho, R., Waldhoer, M., & Heinemann, A. (2013b). A Selective Antagonist Reveals a Potential Role of G Protein–Coupled Receptor 55 in Platelet and Endothelial Cell Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *346*(1), 54–66. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.204180>
- Kaya, B., Melhem, H., & Niess, J. H. (2021). GPR35 in Intestinal Diseases: From Risk Gene to Function. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717392>
- Kesner, R. P., Lee, I., Gilbert, P., & Kesner, R. P. (2004a). A Behavioral Assessment of Hippocampal Function Based on a Subregional Analysis. In *Reviews in the Neurosciences* (Vol. 15).
- Kesner, R. P., Lee, I., Gilbert, P., & Kesner, R. P. (2004b). A Behavioral Assessment of Hippocampal Function Based on a Subregional Analysis. In *Reviews in the Neurosciences* (Vol. 15).
- Klaassen, C. D., & Watkins, J. B. (2019). *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (M. López, Ed.; 9th ed., Vol. 1). Mc Graw Hill.
- Koob, G. F., Arends, M. A., & Le Moal, M. (2014). Animal Models of Addiction. In *Drugs, Addiction, and the Brain* (pp. 65–91). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386937-1.00003-9>
- Kotsikorou, E., Madrigal, K. E., Hurst, D. P., Sharir, H., Lynch, D. L., Heynen-Genel, S., Milan, L. B., Chung, T. D. Y., Seltzman, H. H., Bai, Y., Caron, M. G., Barak, L., Abood, M. E., & Reggio, P. H. (2011). Identification of the GPR55 Agonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligands. *Biochemistry*, *50*(25), 5633–5647. <https://doi.org/10.1021/bi200010k>
- Kozieł, K., & Urbanska, E. M. (2023). Kynurenine Pathway in Diabetes Mellitus—Novel Pharmacological Target? *Cells*, *12*(3), 460. <https://doi.org/10.3390/cells12030460>
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1916, pp. 69–74). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4

- Li, H., Nguyen, H., Meda Venkata, S. P., Koh, J. Y., Kowluru, A., Li, L., Rossi, N. F., Chen, W., & Wang, J.-M. (2021). Novel Role of GPR35 (G-Protein–Coupled Receptor 35) in the Regulation of Endothelial Cell Function and Blood Pressure. *Hypertension*, *78*(3), 816–830. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15423>
- Li, Y., Liu, A., Liu, S., Yan, L., Yuan, Y., & Xu, Q. (2022). Involvement of CXCL17 and GPR35 in Gastric Cancer Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), 615. <https://doi.org/10.3390/ijms24010615>
- Low, M. J. (2016). Neuroendocrinology. In *Williams Textbook of Endocrinology* (pp. 109–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00007-1>
- MacKenzie, A. E., Lappin, J. E., Taylor, D. L., Nicklin, S. A., & Milligan, G. (2011). GPR35 as a novel therapeutic target. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 2, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00068>
- Mackenzie, A. E., & Milligan, G. (2017). The emerging pharmacology and function of GPR35 in the nervous system. *Neuropharmacology*, *113*, 661–671. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.035>
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., & Vingtdeux, V. (2009). Calcium signaling in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, *4*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-20>
- Maravillas-Montero, J. L., Burkhardt, A. M., Hevezi, P. A., Carnevale, C. D., Smit, M. J., & Zlotnik, A. (2015). Cutting Edge: GPR35/CXCR8 Is the Receptor of the Mucosal Chemokine CXCL17. *The Journal of Immunology*, *194*(1), 29–33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401704>
- Marshall, J., Dolan, B. M., Garcia, E. P., Sathe, S., Tang, X., Mao, Z., & Blair, L. A. C. (2003). Calcium Channel and NMDA Receptor Activities Differentially Regulate Nuclear C/EBP β Levels to Control Neuronal Survival. *Neuron*, *39*(4), 625–639. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00496-3)
- Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. In *Psychiatric Clinics of North America* (Vol. 32, Issue 3, pp. 549–575). <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004>

- Mateos-Aparicio, P., & Rodríguez-Moreno, A. (2019). The impact of studying brain plasticity. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00066>
- Minamihata, T., Takano, K., Moriyama, M., & Nakamura, Y. (2020). Lysophosphatidylinositol, an Endogenous Ligand for G Protein-Coupled Receptor 55, Has Anti-inflammatory Effects in Cultured Microglia. *Inflammation*, 43(5), 1971–1987. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01271-4>
- Moriconi #, A., Cerbara, I., Maccarrone, M., & Topai, A. (2010). GPR55: Current Knowledge and Future Perspectives of a Purported “Type-3” Cannabinoid Receptor. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 17).
- Mujawar, S., Patil, J., Chaudhari, B., & Saldanha, D. (2021). Memory: Neurobiological mechanisms and assessment. *Industrial Psychiatry Journal*, 30(1), 311–314.
- O’dowd, B. F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K. R., Heng, H. H. Q., Kolakowski, L. F., & George, S. R. (1998). *SHORT COMMUNICATION Discovery of Three Novel G-Protein-Coupled Receptor Genes*.
- Oh, S. W., & Han, S. Y. (2015). Loop diuretics in clinical practice. In *Electrolyte and Blood Pressure* (Vol. 13, Issue 1, pp. 17–21). Korean Society of Electrolyte and Blood Pressure Research. <https://doi.org/10.5049/EBP.2015.13.1.17>
- Oka, S., Ota, R., Shima, M., Yamashita, A., & Sugiura, T. (2010). GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(2), 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.169>
- Okada, T., Palczewski, K., Ernst, O. P., & Hofmann, K. P. (2001). Review. In *TRENDS in Biochemical Sciences* (Vol. 26, Issue 5). <http://tibs.trends.com0968>
- O’Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Clarendon Press. <http://hdl.handle.net/10150/620894>
- Pagano, E., Elias, J. E., Schneditz, G., Saveljeva, S., Holland, L. M., Borrelli, F., Karlsen, T. H., Kaser, A., & Kaneider, N. C. (2022). Activation of the GPR35 pathway drives angiogenesis in the tumour microenvironment. *Gut*, 71(3), 509. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323363>

- Palczewski, K. (2006). G Protein–Coupled Receptor Rhodopsin. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 743–767. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142743>
- Park, M., & Hong, J. (2016). Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*, 5(2), 15. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>
- Park, S. J., Lee, S. J., Nam, S. Y., & Im, D. S. (2018). GPR35 mediates Iodoxamide-induced migration inhibitory response but not CXCL17-induced migration stimulatory response in THP-1 cells; is GPR35 a receptor for CXCL17? *British Journal of Pharmacology*, 175(1), 154–161. <https://doi.org/10.1111/bph.14082>
- Park, S.-J., Lee, S.-J., Nam, S.-Y., & Im, D.-S. (2018). GPR35 mediates Iodoxamide-induced migration inhibitory response but not CXCL17-induced migration stimulatory response in THP-1 cells; is GPR35 a receptor for CXCL17? *British Journal of Pharmacology*, 175(1), 154–161. <https://doi.org/10.1111/bph.14082>
- Perez-Fernandez, C., Flores, P., & Sánchez-Santed, F. (2019). A Systematic Review on the Influences of Neurotoxicological Xenobiotic Compounds on Inhibitory Control. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 139. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00139>
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., & Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 588–631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004>
- Pitts, M. (2018). Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *BIO-PROTOCOL*, 8(5). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2744>
- Quon, T., Lin, L. C., Ganguly, A., Tobin, A. B., & Milligan, G. (2020). Therapeutic Opportunities and Challenges in Targeting the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. In *ACS Pharmacology and Translational Science* (Vol. 3, Issue 5, pp. 801–812). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsptsci.0c00079>
- Reggio, P. H., & Shore, D. M. (2015). The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00069>

- Ross, R. A. (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 30, Issue 3, pp. 156–163). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.004>
- Rozo, J. A., & Rodríguez-Moreno, A. (2015). Santiago Ramón y Cajal and Ivan Petrovic Pavlov: Their parallel scientific lives, schools and Nobel Prizes. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 9, Issue June). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00073>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007a). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, *152*(7), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007b). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, *152*(7), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Saliba, S. W., Jauch, H., Gargouri, B., Keil, A., Hurrell, T., Volz, N., Mohr, F., van der Stelt, M., Bräse, S., & Fiebich, B. L. (2018). Anti-neuroinflammatory effects of GPR55 antagonists in LPS-activated primary microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1362-7>
- Sandi, C. (2011). Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. *Trends in Neurosciences*, *34*(4), 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.01.006>
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. *Endocrine Reviews*, *21*(1), 55–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H. Q., George, S. R., & O’Dowd, B. F. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, Ψ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Library under Accession Nos. AF096784-AF096786, AF100789.1. *Molecular Brain Research*, *64*(2), 193–198. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00277-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00277-0)

- Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., & Weissmann, N. (2005). 8 - Prostanoids and Phosphodiesterase Inhibitors in Experimental Pulmonary Hypertension. In G. P. Schatten (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 67, pp. 251–284). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)67008-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)67008-1)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneditz, G., Elias, J. E., Pagano, E., Zaeem Cader, M., Saveljeva, S., Long, K., Mukhopadhyay, S., Arasteh, M., Lawley, T. D., Dougan, G., Bassett, A., Karlsen, T. H., Kaser, A., & Kaneider, N. C. (2019). GPR35 promotes glycolysis, proliferation, and oncogenic signaling by engaging with the sodium potassium pump. *Science Signaling*, *12*(562). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau9048>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, *96*. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Sharif, A. F., Kasemy, Z. A., Alshabibi, R. A., Almufleh, S. J., Abousamak, F. W., Alfrayan, A. A., Alshehri, M., Alemies, R. A., Almuhsen, A. S., AlNasser, S. N., & Al-Mulhim, K. A. (2023). Prognostic factors in acute poisoning with central nervous system xenobiotics: development of a nomogram predicting risk of intensive care unit admission. *Toxicology Research*, *12*(1), 62–75. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfac084>
- Sharma, S., Rakoczy, S., & Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. In *Life Sciences* (Vol. 87, Issues 17–18, pp. 521–536). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.004>
- Squire, L. R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. In *Neuron* (Vol. 61, Issue 1, pp. 6–9). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.023>
- Steckler, T., Kalin, N. H., & Reul, J. M. H. M. (2005). *Handbook of stress and the brain*. Elsevier.
- Steimer, T. (2002). The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *4*(3), 231–249. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.3/tsteimer>

- Sunyer, B., Patil, S., Höger, H., & Lubner, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.390>
- Thimm, D., Funke, M., Meyer, A., & Müller, C. E. (2013a). 6-Bromo-8-(4-[3H]methoxybenzamido)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic Acid: A Powerful Tool for Studying Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(17), 7084–7099. <https://doi.org/10.1021/jm4009373>
- Thimm, D., Funke, M., Meyer, A., & Müller, C. E. (2013b). 6-Bromo-8-(4-[3H]methoxybenzamido)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic Acid: A Powerful Tool for Studying Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(17), 7084–7099. <https://doi.org/10.1021/jm4009373>
- Tian, J., Cai, T., Yuan, Z., Wang, H., Liu, L., Haas, M., Maksimova, E., Huang, X.-Y., & Xie, Z.-J. (2006). Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase Forms a Functional Signaling Complex. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(1), 317–326. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-08-0735>
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide That Stimulates Secretion of Corticotropin and β -Endorphin. *Science*, *213*(4514), 1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.6267699>
- Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., Calvillo-Robledo, A., & Marichal-Cancino, B. A. (2021). Blockade of GPR55 in dorsal periaqueductal gray produces anxiety-like behaviors and evokes defensive aggressive responses in alcohol-pre-exposed rats. *Neuroscience Letters*, *764*, 136218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136218>
- Vogt, M. (1952). Plasma adrenaline and release of ACTH in normal and demedullated rats. *The Journal of Physiology*, *118*(4), 588–594. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004820>
- Wang, H., & Zhuo, M. (2012). Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *3* NOV. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00189>
- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., & Ling, L. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 22021–22028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200>

- Wen, A. Y., Sakamoto, K. M., & Miller, L. S. (2010). The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology*, *185*(11), 6413–6419. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001829>
- World Health Organization. (2017, November 16). *Depression and other common mental disorders: global health estimates*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>
- Yamashita, A., Oka, S., Tanikawa, T., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., & Sugiura, T. (2013). The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. In *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (Vol. 107, pp. 103–116). <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.05.004>
- Yao, H., Lv, Y., Bai, X., Yu, Z., & Liu, X. (2020). Prognostic value of CXCL17 and CXCR8 expression in patients with colon cancer. *Oncology Letters*, *20*(3), 2711–2720. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11819>
- Yaribeygi, H., Maleki, M., Butler, A. E., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2022). MOLECULAR MECHANISMS LINKING STRESS AND INSULIN RESISTANCE. *EXCLI Journal*, *21*, 317–334. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4382>
- Youn, D., Gerber, G., & Sather, W. A. (2013). Ionotropic Glutamate Receptors and Voltage-Gated Ca²⁺ Channels in Long-Term Potentiation of Spinal Dorsal Horn Synapses and Pain Hypersensitivity. *Neural Plasticity*, *2013*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2013/654257>
- Zhang, Z., Wang, M., Xue, S.-J., Liu, D.-H., & Tang, Y.-B. (2012). Simvastatin Ameliorates Angiotensin II-Induced Endothelial Dysfunction Through Restoration of Rho-BH4-eNOS-NO Pathway. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, *26*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1007/s10557-011-6351-3>
- Zlotnik, G., & Vansintjan, A. (2019). Memory: An Extended Definition. *Frontiers in Psychology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02523>

10 ANEXO

10.1 Fórmula para el coeficiente de enterramiento

$$C_e = \frac{\textit{T tiempo enterrando (s)}}{\textit{tiempo enterrando (s) + tiempo inmóvil (s)}}$$

