



# **“Efecto de la interacción de los receptores 5-HT<sub>2c</sub> y TRPV1 sobre las conductas del tipo ansiosas”**

Tesis entregada a  
LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia  
Facultad De Ciencias

Por  
**Valentina Alejandra Haro Acuña**

Marzo, 2024  
Dirigida por: Pablo Moya  
Co-Dirigida por: Andrés Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por:

VALENTINA ALEJANDRA HARO ACUÑA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_\_ de Marzo del 2024

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Pablo R. Moya Vera: \_\_\_\_\_ Tutor

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Andrés E Chávez Navarrete \_\_\_\_\_ Cotutor

COMISIÓN DE TESIS:

Dr. Agustín Martínez Carrasco: \_\_\_\_\_ Presidente

Dr. Elías Utreras Puratich: \_\_\_\_\_ Evaluador

Dr. Miguel Reyes Parada: \_\_\_\_\_ Evaluador

## **Financiamiento**

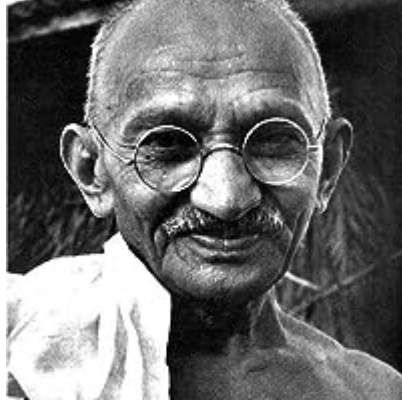
Esta tesis de Doctorado fue financiada por:

- Beca CONICYT Doctorado nacional 2014, Folio 21151021

- FONDECYT 1141272

- nuMIND NC 130011

- Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso Instituto Milenio (P09-022-F)



***“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”***

***Gandhi***

## ÍNDICE DE MATERIAS

Página

ÍNDICE DE MATERIAS.....	II
LISTA DE TABLAS .....	IV
TABLA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VI
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 Ansiedad.....	4
1.1.1. Modelos animales para el estudio de ansiedad .....	4
1.1.2 Circuitos Neuronales de la Ansiedad .....	5
1.2 Sistema serotoninérgico y su rol en la regulación de la ansiedad .....	8
1.2.1 Receptores de Serotonina.....	11
1.2.2 Receptores de Serotonina y ansiedad .....	13
1.3 Receptores 5-HT <sub>2C</sub> .....	14
1.2.3 El transportador de serotonina SERT .....	19
1.4 Receptor TRPV1.....	20
1.4.1 Características generales de TRPV1 .....	20
1.4.2 Estructura y modulación del TRPV1 .....	21
1.4.4 Farmacología.....	25
1.4.5 TRPV1 y ansiedad .....	28
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 Animales de experimentación .....	35
3.2 Estudios de Conducta.....	35
3.2.1 Prueba de campo abierto: .....	36
3.2.2 Laberinto Elevado en Cruz :.....	37
3.2.3 Caja de Luz Oscuridad.....	38
3.2.4 Test de interacción social de 3 cámaras .....	39
3.3 Tratamientos Farmacológicos .....	39
3.4 Diseño experimental .....	41
3.4.1 Evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad de ratones WT bajo tratamiento farmacológico .....	41
3.4.2 Evaluación del comportamiento de ratones TRPV1 KO. ....	43

3.4.3	Estudio del comportamiento de ratones TRPV1 KO bajo tratamiento farmacológico	43
3.4.4	Evaluación del comportamiento ansioso de ratones SERT doble het.....	44
3.4.5	Evaluación del comportamiento ansioso de ratones SERT KO con tratamiento farmacológico.....	44
3.5	Análisis estadístico .....	45
4.	RESULTADOS .....	46
4.1	Efecto de agonistas 5-HT <sub>2c</sub> R sobre las conductas del tipo ansiosas en ratones WT	46
	Figura 9. Los agonistas 5-HT <sub>2c</sub> R mCPP y MK212 producen un efecto ansiogénico. Trazos.....	52
4.2	Efecto del antagonista TRPV1 capsazepina (CPZ) sobre las conductas ansiosas mediadas por los 5-HT <sub>2c</sub> R.....	53
	Figura 10. El antagonista TRPV1 CPZ bloquea el efecto ansiogénico de mCPP y MK212 en ratones WT.....	55
4.3	Efecto de ausencia de TRPV1 en las conductas del tipo ansiosas y de sociabilización.	56
	Figura 11. Fenotipo conductual en animales WT y TRPV1 KO.....	57
	Figura 12. Test de interacción social en animales TRPV1 KO.....	58
4.4	Efecto de ausencia de TRPV1 sobre las conductas del tipo ansiosas mediadas por receptores 5-HT <sub>2c</sub> R.....	59
	Figura 13. Se requiere TRPV1 para el efecto ansiogénico de mCPP o MK212. ....	61
4.5	Efecto administración aguda de CPZ en ratones SERT KO. ....	62
	Figura 14. CPZ revierte las conductas del tiempo ansiosas en el ratón SERT KO en el test de campo abierto. ....	64
4.6	Evaluación del fenotipo conductual en ratones SERT het /TRPV1 het.....	65
5.	DISCUSIÓN .....	69
6.	CONCLUSIONES .....	82
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	83
8.	ANEXOS.....	114

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación y características de la familia de receptores de 5-HT. ....	12
Tabla 2: Efectos de los ligandos 5-HT <sub>2</sub> CR en la evaluación de comportamientos ansiosos.	17
Tabla 3: Modelos animales transgénicos 5-HT <sub>2c</sub> R y comportamientos ansiosos. ....	18
Tabla 4: Efectos de la modulación farmacológica/genética de TRPV1 en modelos animales de ansiedad.....	31
Tabla 5: Tratamientos farmacológicos usados. ....	40
Tabla 6: Número de ratones (n) usados por genotipo WT y grupo de tratamientos.....	41
Tabla 7: Número de ratones (n) usados por genotipo TRPV1 KO para evaluación de fenotipo. ....	42
Tabla 8: Número de ratones (n) usados por genotipo TRPV1 KO y grupo de tratamientos administrados vía I.P. ....	43
Tabla 9: Número de ratones (n) usados por genotipo TRPV1 het, SERT het y SERT het-TRPV1 het, para evaluación de fenotipo ansioso.....	44
Tabla 10 : Número de ratones (n) usados por genotipo SERT WT, SERT het y SERT KO y tratamiento con CPZ, para evaluación de fenotipo ansioso. ....	44

## TABLA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Circuitos neuronales implicados en ansiedad. ....	8
Figura 2. Sinapsis serotoninérgica. ....	11
Figura 3. Diagrama de la estructura y cascadas de señalización del receptor 5-HT <sub>2c</sub> . ....	16
Figura 4. Representación esquemática de la estructura del TRPV1. ....	23
Figura 5. Esquema del OFT. ....	36
Figura 6. Esquema del EPM. ....	37
Figura 7. Esquema del LDT. ....	38
Figura 8. Esquema del diseño experimental utilizado para la evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad en ratones WT. ....	42
Figura 9. Los agonistas 5-HT <sub>2c</sub> R mCPP y MK212 producen un efecto ansiogénico. ....	51
Figura 10. El antagonista TRPV1 CPZ bloquea el efecto ansiogénico de mCPP y MK212 en ratones WT. ....	54
Figura 11. Fenotipo conductual en animales WT y TRPV1 KO. ....	56
Figura 12. Test de interacción social en animales TRPV1 KO. ....	57
Figura 13. Se requiere TRPV1 para el efecto ansiogénico de mCPP o MK212. ....	60
Figura 14. CPZ revierte las conductas del tiempo ansiosas en el ratón SERT KO en el test de campo abierto. ....	63
Figura 15. Esquema generación ratón doble heterocigoto SERT het/TRPV1 het. ....	64
Figura 16. Fenotipo conductual en animales SERT het, TRPV1 het y SERT het/TRPV1 het. ....	67
Figura 17. Modelo propuesto para explicar la interacción funcional en la regulación del receptor 5-HT <sub>2c</sub> R sobre la activación del TRPV1. ....	76
Figura 18. La serotonina deprime la transmisión excitatoria en las neuronas piramidales de la capa II/III. A -B. ....	107
Figura 19. La administración local de CPZ en la amígdala revierte el efecto ansiogénico de MK212 de manera sistémica. ....	108



## LISTA DE ABREVIATURAS

**12-HPTE:** ácido hidroperoxieicosatetranoico

**15-HPTE:** ácido hidroperoxieicosatetranoico

**5-HT<sub>2A</sub>R:** Receptor de serotonina del subtipo 2A

**5-HT<sub>2B</sub>R:** Receptor de serotonina del subtipo 2B

**5-HT<sub>2C</sub> KO:** ratones deficientes para 5-HT<sub>2C</sub>R

**5-HT<sub>2C</sub>R:** Receptor de serotonina del subtipo 2C

**ACTH:** hormona adrenocorticotrópica

**AEA:** anandamida

**BLA:** amígdala basolateral

**BNST:** lecho de la estría terminal

**CeA:** amígdala central

**CPZ:** capsazepina

**DAG:** diacil glicerol

**DMSO:** dimetil sulfoxido

**EPM:** laberinto elevado en cruz

**FAAH:** hidrolasa de amida de ácidos grasos

**HPA:** hipotálamico pituitario adrenal

**HPC:** hipocampo

**HPCd:** hipocampo dorsal

**HPCv:** hipocampo ventral

**IC:** intra cerebral

**IL:** infralímbica

**IP:** intraperitoneal

**IP3:** inositol 1,4,5-trifosfato

**LDT:** caja de luz oscuridad

**mCPP:** 1-(3-clorofenil)piperazina

**MK212:** 6-cloro-2(1-piperazinil)-pirazina

**mPFC:** corteza prefrontal medial

**NADA:** N- Araquidonil Dopamina

**OFT:** test de campo abierto

**PIP2:** fosfatidilinositol (4,5)-bis-fosfato

**PL:** prelímbica

**PLA2:** fosfolipasa A2

**PLC:** fosfolipasa C

**PLD:** fosfolipasa D

**PVN:** núcleo paraventricular del hipotálamo

**s:** segundos

**SB242084:** 6-cloro-5 -metil-1-[2-(2metilpiridil-3-oxi)-pirida-5-il carbamoil] indolina

**SERT KO:** ratón deficiente de transportador de serotonina

**SERT:** transportador de serotonina

**TRPV1 KO:** ratones deficientes para TRPV1

**TRPV1:** Receptor vaniloide de potencial transitorio 1

**WT:** ratones wild type

## RESUMEN

El sistema serotoninérgico juega un papel clave en la patogénesis y tratamiento de los trastornos de ansiedad. Es sabido que la activación de los receptores de serotonina del subtipo 2C (5-HT<sub>2c</sub>R) genera conductas del tipo ansiosas en roedores. Por otra parte, existe evidencia que indica que la activación del receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1), un canal catiónico no selectivo activado por ligando podría estar regulando este tipo de conductas, ya que animales deficientes para este receptor muestran menores niveles de ansiedad. Los 5-HT<sub>2c</sub>R están acoplados a proteína Gq/11, cuya activación produce una amplia variedad de mediadores lipídicos como los endovanilloides/endocannabinoides, incluyendo a la anandamida que actúa como un agonista endógeno de TRPV1. Por lo tanto, sugerimos que la interacción de ambos receptores 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 podría regular los comportamientos ansiosos. Para comprobar esta hipótesis, primero evaluamos mediante una batería de paradigmas comportamentales como los ensayos de campo abierto, laberinto elevado en cruz y de luz/oscuridad, si la activación farmacológica *in vivo* de 5-HT<sub>2c</sub>R recapitula un efecto ansiogénico en ratones. Luego, evaluamos si el bloqueo selectivo de TRPV1 modifica los efectos ansiogénicos producidos por la activación de 5-HT<sub>2c</sub>R. Por último, evaluamos los efectos de la activación de los 5-HT<sub>2c</sub>R en ratones deficientes de TRPV1 (TRPV1 KO). Nuestros resultados indican que la administración sistémica de dos agonistas diferentes para 5-HT<sub>2c</sub>R, mCPP y MK212, producen un efecto ansiogénico que fue eliminado por el pretratamiento con el antagonista selectivo de 5-HT<sub>2c</sub>R SB242084. Mas importante aún, y en concordancia con nuestra hipótesis, estos efectos ansiogénicos son eliminados por la administración conjunta con el antagonista de los TRPV1 capzasepina (CPZ), y están ausentes en los ratones TRPV1 KO. Además, demostramos que el bloqueo de TRPV1 con CPZ rescató los comportamientos del tipo ansiosos, observados en ratones deficientes del transportador de serotonina (SERT KO), un modelo genético clásico de ansiedad.

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente una interacción entre los 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 para regular los comportamientos angiogénicos en ratones, abriendo nuevas posibilidades para la generación de nuevas herramientas farmacológicas para tratar este tipo de patologías.

## ABSTRACT

The serotonergic system plays a key role in the pathogenesis and treatment of anxiety disorders. Activation of serotonin receptor subtype 2C (5-HT<sub>2C</sub>R) induces anxiety-like behaviors in rodents. On the other hand, the activation of the transient receptor potential TRPV1, a ligand-gated non-selective cation channel, may be regulating anxiety-like behaviors, as animals deficient in this receptor show lower levels of anxiety. The 5-HT<sub>2C</sub>R is coupled to Gq/11 protein, whose activation produces a wide variety of lipid mediators, such as endovanilloids/endocannabinoids, including anandamide which acts as an endogenous agonist of TRPV1. Therefore, we suggest that the interaction of both 5-HT<sub>2C</sub>R and TRPV1 receptors may be regulating anxious behaviors. To test this hypothesis, we first evaluated using a battery of behavioral paradigms including open field, elevated plus maze, and light/dark test whether in vivo pharmacological activation of 5-HT<sub>2C</sub>R recapitulates an anxiogenic effect in mice. Then, we evaluated whether selective TRPV1 blockade modifies the anxiogenic effects produced by 5-HT<sub>2C</sub>R activation. Finally, we evaluated the effects of 5-HT<sub>2C</sub>R activation in TRPV1-deficient mice (TRPV1 KO). Our results indicate that systemic administration of two different agonists for 5-HT<sub>2C</sub>R, mCPP and MK212, produces an anxiogenic effect that was abolished by pre-treatment with the selective 5-HT<sub>2C</sub>R antagonist SB242084. More importantly, and consistent with our hypothesis, these anxiogenic effects were eliminated by co-administration with the TRPV1 antagonist capzasepine and are absent in TRPV1-deficient mice. Finally, we demonstrate that TRPV1 blockade with CPZ rescued the anxiety-like behaviors observed in serotonin transporter-deficient mice (SERT KO), a classic genetic model of anxiety. Together, these results strongly suggest an interaction between 5-HT<sub>2C</sub>R and TRPV1 to regulate anxiety-like behaviors in mice, opening new possibilities for the development of novel pharmacological tools to treat these types of pathologies.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Ansiedad

La ansiedad es una respuesta emocional común y conservada que tienen los mamíferos y es percibida como una señal anticipatoria de alerta que advierte de una posible amenaza, frecuentemente desconocida, lo que la distingue del miedo, en el cual el peligro es concreto y definido (Torales et al., 2015). Estos procesos anticipatorios tienen una función adaptativa cuando son proporcionales a la probabilidad y gravedad de la amenaza, por lo que individuos sanos pueden experimentar episodios esporádicos de ansiedad. Sin embargo, pueden volverse patológicos cuando son excesivos, perturbadores o desproporcionados con respecto al peligro real (Calhoun & Tye, 2015; Rosen & Schulkin, 1998).

El manual estadístico y de diagnóstico de trastornos mentales, Quinta Edición (DSM V), divide la ansiedad patológica en tres categorías principales de trastornos, incluidos los trastornos obsesivo-compulsivos y relacionados, los trastornos relacionados con el estrés y los trastornos de ansiedad (Regier et al., 2013).

La prevalencia de los trastornos de ansiedad se estima en un 16% entre los adultos, con una prevalencia en la vida de más del 28% (Comer et al., 2010). Sin embargo, una porción considerable de individuos patológicamente ansiosos no recibe un tratamiento adecuado (Dilbaz et al., 2011). A pesar de la universalidad de los trastornos de ansiedad, los tratamientos disponibles no son del todo efectivos, por lo que la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, y del mismo modo, la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos implicados en estos trastornos es un campo de investigación activo a la fecha.

### 1.1.1. Modelos animales para el estudio de ansiedad

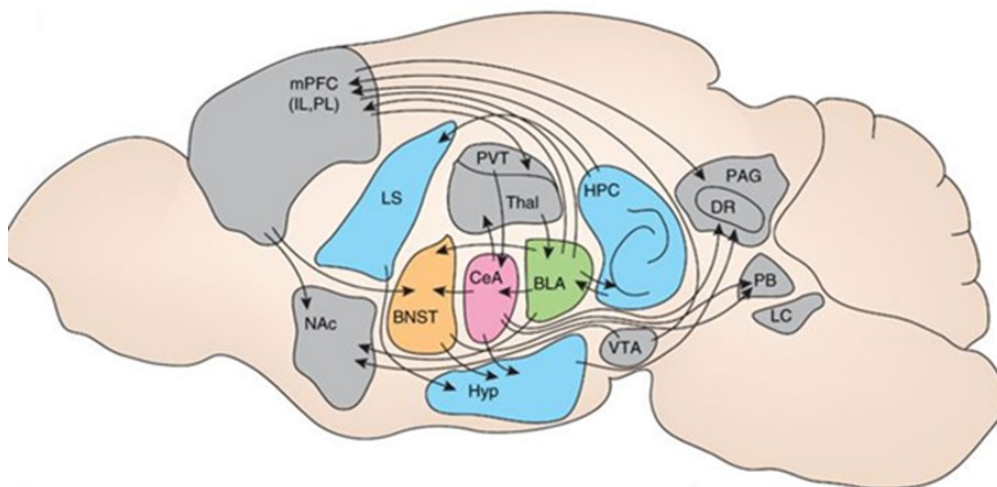
Al igual que en los humanos, la ansiedad y el miedo desempeñan un papel crucial al mediar las respuestas de lucha y huida en situaciones de peligro en diversas especies incluyendo los

roedores. Dado que los circuitos neuronales que median los procesos de miedo y ansiedad son similares entre roedores y humanos (Blanchard et al., 2011; Davis et al., 2010; Grupe & Nitschke, 2013; Sylvers et al., 2011), las respuestas asociadas a estos procesos son altamente conservada entre diferentes especies, proporcionando una base sólida para estudiar los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la ansiedad, así como para explorar posibles tratamientos farmacológicos en modelos animales (Carobrez & Bertoglio, 2005).

Las pruebas utilizadas para medir ansiedad en roedores tienen una base etológica (Carobrez & Bertoglio, 2005; Lister, 1990) y están basadas en los impulsos innatos para explorar nuevos espacios y en los conflictos de evitación a áreas abiertas, expuestas e iluminadas, donde podrían ser más vulnerables a las amenazas ambientales. En general, en las pruebas conductuales basadas en el conflicto de aproximación-evitación, los ratones que presentan un fenotipo ansioso tienden a pasar más tiempo en zonas cerradas o "seguras" del aparato de comportamiento. Algunas pruebas clásicas de comportamientos utilizadas para medir conductas ansiosas son el laberinto elevado en cruz (EPM, del inglés elevated plus maze), la prueba de campo abierto (OFT, del inglés open field test), la caja de luz oscuridad (LDT, del inglés light dark box test). Por ejemplo, los comportamientos del tipo ansiosos en el EPM se miden cuando los ratones ansiosos evitan los brazos abiertos del laberinto y prefieren los brazos cerrados (Walf & Frye, 2007). En el OFT, los animales ansiosos permanecen un mayor tiempo en el borde de la arena (Seibenhener & Wooten, 2015), mientras que, en el LDT el comportamiento relacionado con la ansiedad se mide como una propensión a permanecer en la zona oscura de la cámara (Bourin & Hascoët, 2003).

### **1.1.2 Circuitos Neuronales de la Ansiedad**

Distintas áreas del cerebro han sido implicadas en la regulación de los comportamientos del tipo ansioso. Se pueden dividir en áreas involucradas en generación de miedo y ansiedad, como la amígdala y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST), y en estructuras involucradas en la modulación de las respuestas del tipo ansiosas, entre las que podemos encontrar la corteza prefrontal medial (mPFC) y sus subdivisiones y el hipocampo (Robinson et al., 2019) ver figura 1.



**Figura 1. Circuitos neuronales implicados en ansiedad.** Vista sagital de cerebro de roedor, en donde se muestran de manera simplificada los circuitos implicados en las conductas del tipo ansiosas. Modificado de (Calhoun & Tye, 2015).

Amígdala: Los primeros trabajos sobre el condicionamiento al miedo en modelos animales destacaron los roles clave de dos núcleos de amígdala en la ansiedad, la amígdala basolateral (BLA) y el núcleo central de la amígdala (CeA). La BLA integra información sensorial del entorno y a través de sus proyecciones, excita al CeA. La amígdala posteriormente desencadena respuestas defensivas a través de proyecciones eferentes a regiones como la BNST, el hipocampo, el estriado ventral, la corteza orbitofrontal, la sustancia gris periacueductal y el hipotálamo (LeDoux, 2003). En humanos, estudios de imagenología funcional en pacientes con trastorno de ansiedad han demostrado hiperactividad en la amígdala (Duval et al., 2015). Además, estudios farmacológicos demostraron que la activación del BLA es ansiogénica, mientras que es su inhibición es ansiolítica. Asimismo, la activación farmacológica del CeA tiene un efecto ansiogénico, mientras que su inhibición es ansiolítica (Tom et al., 2019).

BNST: se ha propuesto que este núcleo está implicado en el mantenimiento de la ansiedad sostenida. El BNST es una parte de la “amígdala extendida”, que regula las respuestas ansiosas



a través de sus proyecciones GABAérgicas (ácido gamma-aminobutírico) hacia varias estructuras límbicas, corticales y al cerebro posterior (Linsambarth et al., 2017).

Hipocampo: El hipocampo (HPC) generalmente se subdivide en ventral (HPCv) y dorsal (HPCd). Hay una amplia gama de evidencia que muestra que ambas regiones del HPC son centrales en la regulación de la ansiedad (Fanselow & Dong, 2010; Strange et al., 2014). Este rol parece estar mediado por varias vías, incluida las entradas directas desde la amígdala y corteza prefrontal (PFC). Se ha reportado que las entradas directas de la BLA a HPCv pueden modular bidireccionalmente el comportamiento relacionado con la ansiedad (Felix-Ortiz et al., 2013), lo que sugiere que la conectividad funcional entre BLA y HPCv es fundamental para el mantenimiento de esta conducta.

Corteza prefrontal medial: La corteza prefrontal medial (mPFC) está implicada en el procesamiento de la atención y la información afectiva y, por lo tanto, también está involucrada en la regulación de las respuestas ansiosas (Hare & Duman, 2020). En roedores la mPFC está compuesta por varias subregiones que incluyen la corteza infralímbica (IL) y la prelímbica (PL), regiones densamente interconectadas con la amígdala. Estas estructuras juegan roles opuestos en los comportamientos defensivos, de modo que la corteza IL inhibe a la amígdala y los comportamientos defensivos mientras que la corteza PL la activa. La activación de la corteza PL es necesaria para el mantenimiento de las conductas ansiosas (Stern et al., 2010).

Hipotálamo: El hipotálamo es una estructura cerebral compleja ubicada en el piso del tercer ventrículo. Es el componente central del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), que es responsable de las respuestas neuroendocrinas y metabólicas al estrés (Terlevic et al., 2013).

Frente a una respuesta al estrés las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), liberan dos neurohormonas, el factor liberador de corticotropina (CRF) y la arginina vasopresina (AVP), las cuales estimulan la glándula pituitaria anterior para producir y secretar hormona adrenocorticotrópica (ACTH) hacia la circulación general. La ACTH, a su vez, induce la síntesis y liberación de glucocorticoides desde las glándulas suprarrenales. El principal glucocorticoide en

humanos es el cortisol; a su vez el principal glucocorticoide en roedores es la corticosterona (Stephens et al., 2012).

Cuando el eje HPA se activa, estimula la síntesis y liberación de cortisol en condiciones adaptativas normales del cuerpo. No obstante, la liberación crónica de cortisol es perjudicial y ha sido involucrada en algunos estados neuropatológicos como ansiedad y depresión, entre otros (Terlevic et al., 2013).

Además, el estrés activa no solo el eje HPA, sino también la actividad de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del rafe y aumenta los niveles extracelulares de serotonina en diversas regiones cerebrales inervadas por el rafe dorsal como la BLA, mPFC y el HPC (Waselus et al., 2011). En este sentido, se ha demostrado que la administración aguda de ligandos del receptor 5-HT<sub>2c</sub> aumenta los niveles plasmáticos de ACTH y cortisol tanto en animales como en humanos (Heisler et al., 2007a), lo que sugiere que el sistema serotoninérgico juega un rol importante en la regulación de los comportamientos ansiosos.

## **1.2 Sistema serotoninérgico y su rol en la regulación de la ansiedad**

La 5-hidroxitriptamina (serotonina; 5-HT) es un neuromodulador perteneciente al grupo de las monoaminas que desempeña un papel crucial en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos y conductuales tanto a nivel central como periférico, que incluyen el control del metabolismo, la función cardiovascular, el sueño, la regulación sensoriomotora, los procesos cognitivos, la respuesta al estrés y la regulación de los estados de ánimo, entre otros aspectos (Berger et al., 2009; Jenkins et al., 2016).

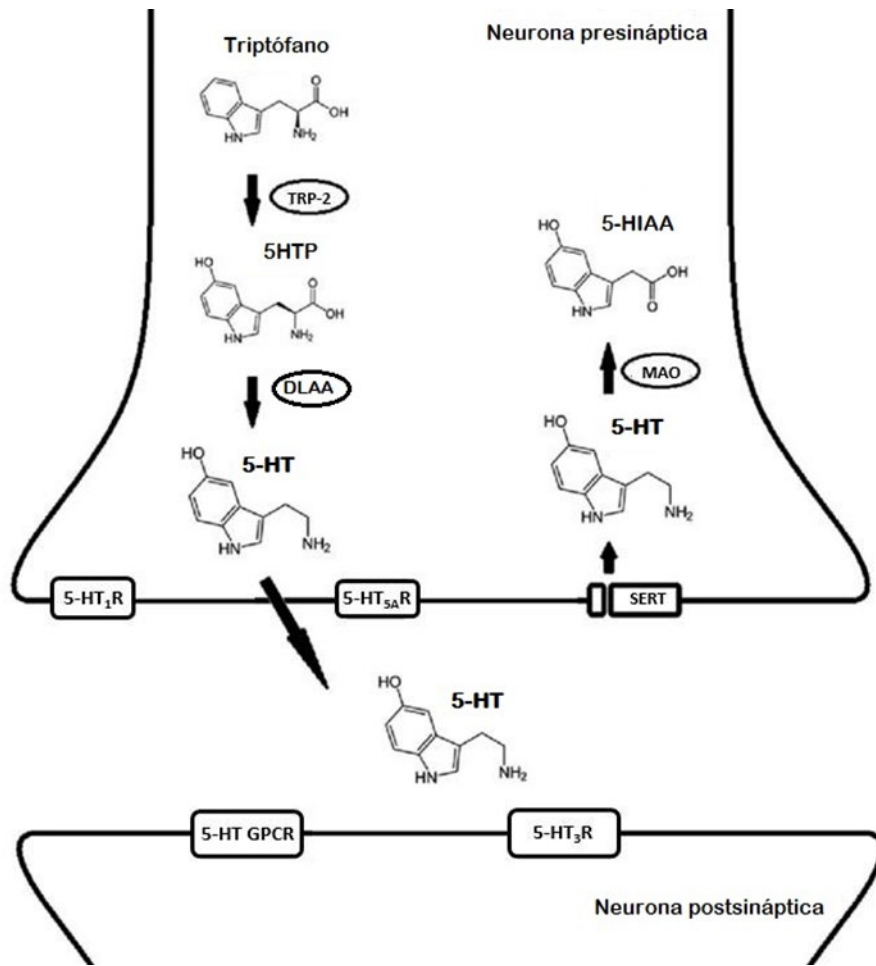
El descubrimiento inicial de la serotonina se remonta a su presencia en el suero sanguíneo, donde se observaron sus efectos tónicos en los vasos sanguíneos, lo cual dio origen a su nombre (Rapport et al., 1948). Sin embargo, con el paso del tiempo, se descubrió que esta misma sustancia también estaba presente en el cerebro, lo que llevó a su descripción como

neurotransmisor. Es importante destacar que solo alrededor del 5% de la serotonina total en el cuerpo se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), mientras que el 95% restante se sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en menor proporción se encuentra en las plaquetas (Mohammad-Zadeh et al., 2008). No obstante, se sabe que el sistema serotoninérgico juega un rol fundamental en la regulación del equilibrio emocional y el bienestar general. En este sentido, alteraciones en el funcionamiento del sistema serotoninérgico se han asociado con diversas condiciones y trastornos neuropsiquiátricos, como la depresión, la ansiedad, los trastornos del sueño y la esquizofrenia (Lopez-Ibor Jr, 1992; Naughton et al., 2000; Nordquist & Oreland, 2010). Por lo tanto, comprender la complejidad y la importancia del sistema serotoninérgico es esencial para avanzar en la comprensión de la fisiopatología de los trastornos de ansiedad.

El sistema serotoninérgico está compuesto por la serotonina, enzimas responsables de su síntesis y degradación, un transportador específico (SERT) y una amplia familia de receptores serotoninérgicos (Sharp & Barnes, 2020)(Figura 2). La síntesis de serotonina ocurre en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe ubicadas en el mesencéfalo (Hornung, 2003). Estos núcleos se clasifican en dos grupos, según la orientación de sus proyecciones. El grupo rostral contiene la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del cerebro y se proyectan principalmente al prosencéfalo, mientras que las pertenecientes al grupo caudal se proyectan principalmente al tronco del encéfalo y la médula (Hornung, 2010). Los principales núcleos del grupo rostral corresponden al núcleo dorsal (NDR) y al núcleo medial del rafe (NMR), ambos inervan regiones a lo largo de todo el cerebro. Mientras que el rafe caudal incluye el rafe pálido, el rafe oscuro y el rafe magnus (Hornung, 2003). El NDR inerva principalmente a la sustancia nigra, cuerpo estriado y núcleo accumbens, mientras que el NMR inerva, entre otras áreas, a la corteza cingulada y los núcleos del septum. La PFC, la amígdala y el HPC reciben proyecciones de ambos núcleos (Huang et al., 2019; Lee et al., 2011; Ren et al., 2019).

### 1.2.1 Síntesis y degradación de serotonina

El precursor de la síntesis de serotonina en neuronas serotoninérgicas es el aminoácido L-triptófano, que se obtiene principalmente de fuentes dietéticas (Leathwood, 1987). El L-triptófano es transportado desde la sangre a través de la barrera hematoencefálica hacia el cerebro (Curzon, 1981; Fernstrom, 1977), donde las neuronas serotoninérgicas lo convierten en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) a través de la enzima triptófano hidroxilasa 2 (TRP2), que es expresada específicamente en neuronas serotoninérgicas (a diferencia de su isoforma TPH1 que es expresada periféricamente) (Walther et al., 2003). Posteriormente, la enzima descarboxilasa de los L-aminoácidos aromáticos (DLAA), transforma el 5-HTP en serotonina que luego se almacena en vesículas sinápticas para su posterior liberación desde el terminal presináptico (Grahame-Smith, 1971). Una vez liberada al espacio sináptico, la serotonina se une a diferentes subtipos receptores específicos de serotonina (5-HTRs; Figura 2), y es recapturada mediante el transportador de serotonina SERT (del inglés serotonin transporter) presente en la membrana presináptica (Rudnick & Sandtner, 2019). Allí, la serotonina puede ser nuevamente almacenada en vesículas para su reutilización o metabolizada por la enzima monoaminoxidasa mitocondrial (MAO) para convertirse en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Bortolato et al., 2010).



**Figura 2. Sinapsis serotoninérgica.** En la neurona presináptica están presente las enzimas implicadas en la síntesis y catabolismo de la serotonina, su transportador y los autorreceptores serotoninérgicos. En la neurona postsináptica se encuentran los receptores serotoninérgicos acoplados a proteína G (5-HT GPCR) y el receptor ionotrópico 5-HT<sub>3</sub>R (Modificado de (Kulikov et al., 2018)).

### 1.2.1 Receptores de Serotonina

La serotonina ejerce efectos sobre la actividad neuronal, la liberación de neurotransmisores y otros procesos celulares actuando sobre 14 subtipos distintos de receptores serotoninérgicos que se agrupan en siete familias (Roth, 1994). A excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub>, que es un canal iónico activado por ligando, todos los demás receptores son receptores metabotrópicos de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs). Estos receptores ejercen sus efectos a través de la interacción con diferentes cascadas de segundos mensajeros (Barnes &

Sharp, 1999). Por ejemplo, las familias de receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>5</sub> se acoplan a proteínas Gi/o, inhibiendo a la adenilato ciclasa, mientras que los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> se acoplan a proteínas Gs, lo que activa a la adenilato ciclasa. Finalmente, la familia 5-HT<sub>2</sub> se acopla principalmente a proteínas Gq/11 que activa principalmente la vía de la fosfolipasa C (PLC), resultando en un aumento de la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), así como un incremento en los niveles de calcio intracelular (Hoyer et al., 2002; Sharp & Barnes, 2020). En la tabla 1 se describe en mayor detalle las características de cada subtipo de receptores.

<b>Subtipo de Receptor de 5-HT</b>	<b>Mecanismo de transducción</b>	<b>Transducción Alternativa</b>	<b>Región del cerebro humano</b>	<b>Interés clínico relacionado</b>
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	Gi/o – AC,PKA	ERK, Proteínas G pequeñas	Rafé dorsal y medio, hipocampo, cortex, núcleos septales.	CNS: inhibición neuronal. Efectos conductuales en sueño, alimentación, termoregulación, agresión y ansiedad.
<b>5-HT<sub>1B</sub></b>	Gi/o – AC,PKA	ERK, Proteínas G pequeñas	Ganglios basales y sustancia negra.	CNS: inhibición presináptica. Efectos conductuales. Vasoconstricción pulmonar.
<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	Gi/o – AC,PKA		Ganglios basales y sustancia negra.	CNS: locomoción, ansiedad, vasoconstricción
<b>5-HT<sub>1E</sub></b>	Gi/o – AC,PKA		Hipocampo, cortex entorrinal, subículo.	-----
<b>5-HT<sub>1F</sub></b>	Gi/o – AC,PKA		Globo palido, sustancia negra, núcleo espinal.	-----
<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	Gq/11-PLC	ERK, PLA <sub>2</sub> , PLD, Src/Akt	Cortex, neocortex, claustró.	CNS: excitación neuronal, efectos conductuales, aprendizaje, ansiedad, vasoconstricción, agregación plaquetaria.
<b>5-HT<sub>2B</sub></b>	Gq/11-PLC	ERK, PLA <sub>2</sub>	Colículo inferior, cóclea.	Contracción estomacal, válvulas cardiacas.
<b>5-HT<sub>2C</sub></b>	Gq/11-PLC	ERK, PLA <sub>2</sub> , PLD	Plexo coroideo. ce, NDR, Hipocampo, Amígdala, Hipotálamo, N. Accumbens, PFC	CNS: ansiedad, alimentación. Plexo coroideo: secreción de fluido cefalorraquídeo.

<b>5-HT<sub>3</sub></b>	Canal iónico activado por ligando K <sup>+</sup>		Núcleo espinal del nervio trigémino, área postrema, núcleo del tracto solitario.	SNC, SNP: excitación neuronal.
<b>5-HT<sub>4</sub></b>	Gs,AC,PKA	ERK	Hipocampo, tracto basal, cortex, sustancia negra.	CNS: excitación neuronal, aprendizaje, memoria.
<b>5-HT<sub>5A</sub></b>	Gi/o – AC,PKA		Bulbo olfatorio, habenua medial, neocortex.	
<b>5-HT<sub>6</sub></b>	Gs,AC,PKA	ERK, mTOR, Cdk5	Cuerpo estriado, cortex, núcleo accumbens.	Aprendizaje y memoria
<b>5-HT<sub>7</sub></b>	Gs,AC,PKA	ERK, Small G-proteins	Tálamo,hipotálamo, hipocampo, cortex	Control del ritmo circadiano, vasorrelajación

**Tabla 1.** Clasificación y características de la familia de receptores de serotonina.

Abreviaturas; Akt - serina/treonina proteína quinasa, AC - adenilato ciclasa, Cdk5 - quinasa dependiente de ciclina, ERK - quinasa regulada por señales extracelulares, mTOR - objetivo de la rapamicina en mamíferos (serina/treonina proteína quinasa), PKA - proteína quinasa A, PLC - fosfolipasa C, PLA2 - fosfolipasa A2, PLD - fosfolipasa D, modificado de (Sharp & Barnes, 2020).

### 1.2.2 Receptores de Serotonina y ansiedad

Dentro de los diferentes tipos de receptores de serotonina que han sido propuestos como actores clave en la fisiopatología y tratamiento de los trastornos de ansiedad se encuentran los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (Kahn et al., 2023; Maximino, 2012; Naughton et al., 2000). Por ejemplo, una menor disponibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1AR</sub>) se ha asociado con trastornos de ansiedad (Akimova et al., 2009; Paniccia & Rapaport, 1995). Estudios en ratones deficientes de 5-HT<sub>1AR</sub> han revelado un fenotipo ansioso, destacando la influencia de este receptor en diferentes etapas del desarrollo (Holmes, Yang, et al., 2003). La buspirona, un agonista parcial de 5-HT<sub>1AR</sub>, se ha utilizado como agente ansiolítico desde la década de 1990 (Loane & Politis, 2012). El receptor 5-HT<sub>1B</sub> también ha sido asociado a la regulación de la ansiedad, con estudios en ratones deficientes mostrando aumento de la ansiedad en ciertos contextos (Groenink et al., 2003; Zhuang et al., 1999) aunque en menor medida en comparación con el 5-HT<sub>1AR</sub> (Clark & Neumaier, 2001).

Por otra parte, el receptor 5-HT<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>R), también ha sido implicado en la regulación de la ansiedad, a través de estudios que identificaron relaciones entre la activación de este receptor con el nivel de neuroticismo en humanos, que es un rasgo de ansiedad (Gottschalk & Domschke, 2022; Hogsted et al., 2023). Además, ratones deficientes de 5-HT<sub>2A</sub>R muestran poca ansiedad, y esta característica se normaliza una vez que se restaura la expresión en corteza de estos receptores (Weisstaub et al., 2006). Aunque existen algunos estudios que han descrito que agonistas de 5-HT<sub>2A</sub>R, como psilocibina y LSD tienen efectos ansiogénicos, la literatura es controversial, particularmente respecto a su efecto en humanos (Barrett et al., 2016; Carbonaro et al., 2016).

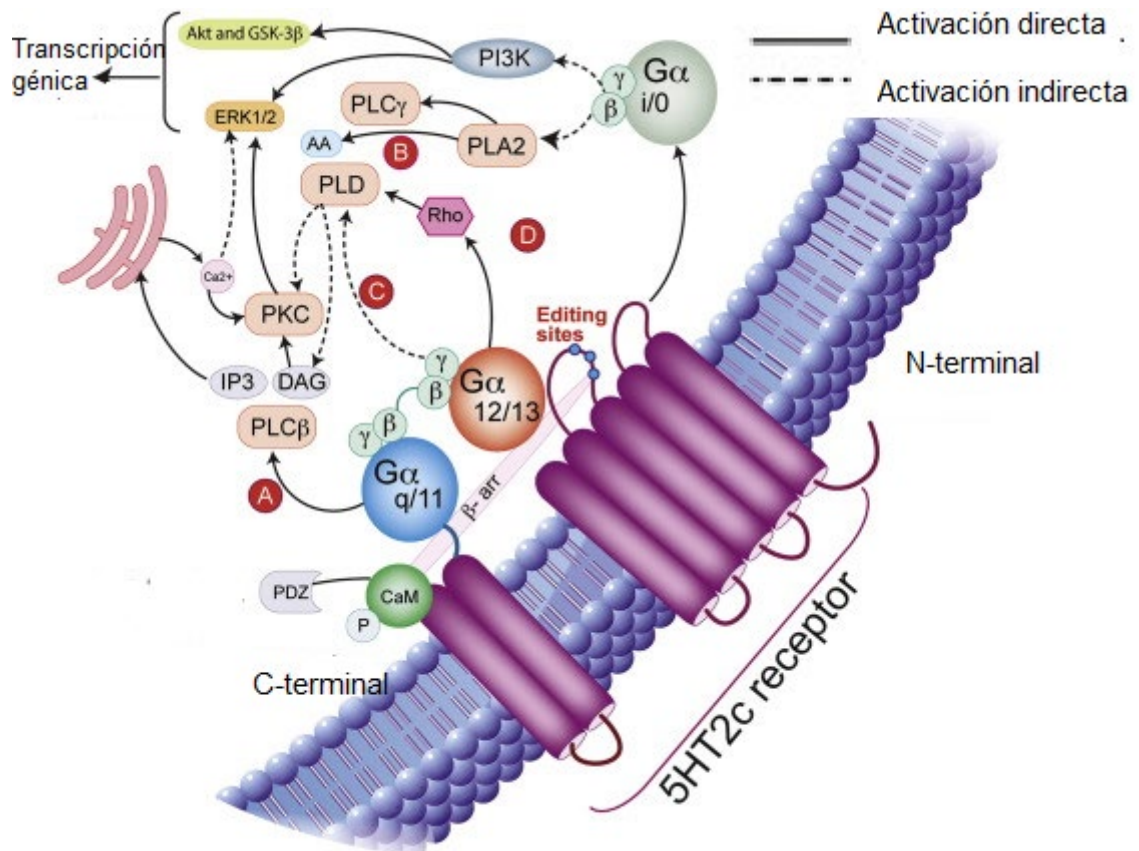
El 5-HT<sub>2B</sub>, de menor expresión cerebral, se asocia con funciones como comportamiento motor, ingesta de alimentos y percepción del dolor en (Devroye et al., 2018). Su función precisa en el sistema nervioso central aún requiere mayor comprensión debido a su baja expresión y falta de ligandos selectivos (Moutkine et al., 2019).

### **1.3 Receptores 5-HT<sub>2c</sub>**

Los 5-HT<sub>2c</sub>R son los receptores serotoninérgicos que más han sido relacionados en la fisiopatología de los trastornos de ansiedad (Chagraoui et al., 2016; De Deurwaerdère et al., 2020; Hill, 2011; Quesseveur et al., 2012). Este receptor, está codificado por el gen *HTR2C*, ubicado en el cromosoma X humano (Xq24). Su estructura cristalina se conoce desde 2018, la que muestra que, al igual que otros receptores GPCRs, el 5-HT<sub>2c</sub>R consta de siete segmentos transmembranales (TMI-TMVII), tres bucles extracelulares y tres intracelulares, un extremo carboxilo terminal y un extremo amino terminal (ver figura 3). Este receptor se acopla principalmente a la proteína Gq/11 (Hannon & Hoyer, 2002; Hoyer et al., 2002), cuyo efector principal es PLC $\beta$ , generando como segundos mensajeros el IP3 y el DAG (Chang et al., 2000; Wold et al., 2019). Tanto el aumento de los niveles de calcio intracelular inducidos por IP3 como el DAG mismo son capaces de activar a la diacilglicerol lipasa alfa (DAGLa), enzima que produce 2-araquidonil glycerol (2-AG), que es uno de los dos principales endocannabinoides que regulan



la función sináptica (Kano et al., 2009; Wold et al., 2019). Además de la señalización paralela vía PKC mediada por Gq/11, se han descrito señalizaciones vía  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha 12/13}$ , que regulan la activación de la fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) y fosfolipasa D, respectivamente (Burke & Dennis, 2009; McGrew et al., 2002). La activación de PLA<sub>2</sub> conduce a la liberación de ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos, y tanto el AA como sus metabolitos eicosanoides desempeñan un papel importante como segundos mensajeros (Berg et al., 1998; Felder et al., 1990). En cuanto a la activación de la PLD, esta converge hacia PKC, lo que da como resultado la liberación de  $G\beta$ - $\gamma$  y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) 1 y 2 (McGrew et al., 2002). Por último, el 5-HT<sub>2c</sub>R es único GPCR que a la fecha se ha descrito que se procesa por edición a nivel de RNA, fenómeno que genera diversas isoformas que difieren en su capacidad de activar cascadas de señalización y actividad



intrínseca (Moya et al., 2011).

### **Figura 3. Diagrama de la estructura y cascadas de señalización del receptor 5-HT<sub>2c</sub>.**

Modificado de Chagraoui et al., 2016

Los 5-HT<sub>2c</sub>Rs se expresan de manera casi exclusiva en el SNC (Di Giovanni & De Deurwaerdère, 2016) y en áreas cerebrales involucradas en la regulación de la ansiedad, como son la mPFC, la amígdala, el estriado dorsal, la sustancia gris periacueductal y los NDR (Li et al., 2012; Sant'Ana et al., 2019a). Una menor expresión de estos receptores se ha descrito en la corteza cingular, los ganglios basales, la amígdala, el hipocampo y el área tegmental ventral, así como en el sistema olfativo, epitálamo, tálamo y subtálamo (Li et al., 2004). Es importante mencionar, que su distribución no es exclusiva de un tipo neuronal, encontrándose en neuronas principales y en las interneuronas GABAérgicas (Giorgetti & Tecott, 2004).

Los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R desempeñan un papel crucial en la regulación del estado de ánimo, y su disfunción se ha vinculado con trastornos afectivos (Chagraoui et al., 2016; De Deurwaerdère et al., 2020; Hill, 2011; Quesseveur et al., 2012). El fenotipo ansiolítico descrito en ratones 5-HT<sub>2c</sub> KO se manifiesta por la disminución de la ansiedad en diversas tareas exploratorias, mostrando un mayor tiempo de actividad en los cuadrantes abiertos que en los cerrados en el EZM (del inglés elevated zero maze), una prueba similar al laberinto elevado en cruz (Tabla 3). Además, en la prueba OFT, pasan menos tiempo en el área central, consolidando la asociación entre la ausencia de los 5-HT<sub>2c</sub>R y comportamientos ansiolíticos (Heisler et al., 2007b). Sin embargo, recientemente se ha observado que estos animales muestran un efecto ansiolítico, pero no de manera consistente en todos los ensayos evaluados, incluido el OFT (Bouchekioua et al., 2022; Nebuka et al., 2020). Por otra lado, se ha demostrado que una ganancia de función de los 5-HT<sub>2c</sub>R (5-HT<sub>2c</sub> OE) se asocia con un aumento en el tiempo pasado en los brazos abiertos y una disminución en la actividad locomotora (Kimura et al., 2009).

Varios estudios farmacológicos han descrito el efecto ansiogénicos de los agonistas y a del 5-HT<sub>2c</sub>R, como agonista no selectivo de 5-HT<sub>2c/2B</sub>R 1-(m-clorofenil)-piperazina (mCPP) o agonistas más selectivos como MK212 y RO 60-0175 (Tabla 2; Higgins et al., 2001; Damjanoska et al.,

2003). Específicamente, la administración intraperitoneal (I.P.) de mCPP ha demostrado inducir ansiedad en diversas pruebas, como el LDT (Griebel et al., 1991), el test de interacción social (TIS) (Moya et al., 2011) y el EPM (Bert et al., 2005; Cornélio & Nunes-de-Souza, 2007; Fone et al., 1996; Rodgers et al., 1992). Del mismo modo, la infusión intracerebral (I.C.) de mCPP en la amígdala de ratones también ha demostrado inducir comportamientos ansiogénicos (Cornélio & Nunes-de-Souza, 2007), mientras la infusión de MK212, administrado tanto vía I.P (De Mello Cruz et al., 2005), como vía I.C en la amígdala BLA (Vicente & Zangrossi Jr, 2012) y en la región vHPC (Alves et al., 2004), ha mostrado efectos ansiogénicos en ratas. De manera similar, la administración de mianserina por vía I.P demostró un efecto ansiolítico en la prueba EPM (Rocha et al., 1994), mientras el antagonista selectivo SB242084, administrado tanto por vía I.P como mediante infusión en la BLA, exhibió propiedades ansiolíticas en el EPM (Martin et al., 2002; Vicente & Zangrossi, 2011). Finalmente, la administración I.P de SB-243213 un potente agonista inverso de 5-HT<sub>2c</sub>R mostró efectos ansiolíticos en prueba de SIT en (Wood et al., 2001). En su conjunto, todos estos hallazgos genéticos y farmacológicos respaldan la idea de que el 5-HT<sub>2c</sub>R desempeña un papel clave en la regulación de la ansiedad.

<b>Droga</b>	<b>Ruta de administración / región</b>	<b>Test/ efecto</b>	<b>especie</b>	<b>Referencia</b>
mCPP	I.P	LDT/ ansiogénico	Ratón	Griebel et al., 1991 (Griebel et al., 1991)
mCPP	I.P	TIS/ansiogénico	Ratón	Moya et al., 2011
mCPP	I.P	EPM/ansiogénico	Ratón	Rodgers et al., 1992
mCPP	I.P	oft/ansiogénico	Ratón	Bert et al., 2005
mCPP	I.P	EPM/ansiogénico	Rata	Fone et al., 1996
mCPP	I.C Amy	EPM/ansiogénico	Ratón	Cornelio & Nunes-de-Souza, 2007
MK212	I.P	EPM/ansiogénico	Rata	De Mello Cruz et al., 2005
MK212	I.C BLA	ETM/ansiogénico	Rata	Vicente & Zangrossi, 2011
MK212	I.C HPCv	EPM/ansiogénico	Rata	Alves et al., 2004

SB242084	I.P	ETM/ansiolítico	Rata	Martin et al., 2002
SB242084	I.C BLA	ETM/ansiolítico	Rata	Vicente & Zangrossi, 2011
SB-243213	I.P	TIS/ansiolítico	Rata	Wood et al. (2001)
Mianserina	I.P	EPM/ansiolítico	Rata	Rocha et al. (1994)
Agomelatina	I.P por 4 semanas	Modelo de corticosterona crónico	Ratón	Rainer et al., 2012
Agomelatina	Oral 25- 50 mg	GAD	Humano	Stein et al., 2008
Agomelatina	Oral 25- 50 mg	GAD	Humano	Stein et al., 2012
Agomelatina	Oral 25- 50 mg	GAD	Humano	Stein et al., 2014

**Tabla 2:** Efectos de los ligandos 5-HT<sub>2C</sub>R en la evaluación de comportamientos ansiosos. La tabla resume los efectos de los agonistas, antagonistas y agonistas inversos de 5-HT<sub>2C</sub>R. Adaptado de Quesseveur et al., 2012.

Modelo	Ruta de administración / región	Test/ efecto	Especie	Referencia
5-HT <sub>2C</sub> KO		EZM/Ansiolítico	Ratón	Heisler et al., 2007b
5-HT <sub>2C</sub> KO	Solo en ciertas condiciones, aumento actividad locomotora	Ansiolítico no en todos los test, solo OFT	Ratón	Nebuka et al., 2020
5-HT <sub>2C</sub> KO	Aumento actividad locomotora	EPM, Sin diferencias ansiedad	Ratón	Hill et al., 2010
5-HT <sub>2C</sub> OE CaMKII $\alpha$ promoter	Forebrain	EPM, Ansiogénico actividad locomotora disminuída	Ratón	Kimura et al., 2009

**Tabla 3:** Modelos animales transgénicos 5-HT<sub>2C</sub>R y comportamientos ansiosos. La tabla resume los efectos de los agonistas, antagonistas y agonistas inversos de 5-HT<sub>2C</sub>R.

### **1.2.3 El transportador de serotonina SERT**

Es importante destacar la relevancia del transportador de serotonina (SERT, por sus siglas en inglés, serotonin reuptake transporter) en el sistema serotoninérgico y su relación con los trastornos de ansiedad y depresión. El SERT juega un papel fundamental en la regulación de la neurotransmisión serotoninérgica al facilitar la recaptación de serotonina desde la hendidura sináptica (Moya, 2014). Este mecanismo permite controlar los niveles de serotonina disponible en el espacio sináptico y, por ende, la transmisión de señales serotoninérgicas en el cerebro.

Se ha descubierto un polimorfismo común en la región promotora del gen transportador de serotonina (5-HTTLPR), el cual presenta dos variantes distintas: el alelo corto (s) y el alelo largo (l). Se ha observado que el alelo s de 5-HTTLPR se asocia con un aumento en los comportamientos relacionados con la ansiedad y un mayor riesgo de desarrollar trastornos de ansiedad en individuos que portan este alelo, especialmente en situaciones estresantes de la vida. En contraste, se ha encontrado que los individuos homocigotos para la variante l presentan un menor riesgo de desarrollar ansiedad (Lesch et al., 1997; Lesch et al., 1996).

Además, el SERT es el objetivo terapéutico principal de varios fármacos utilizados en el tratamiento de diversos trastornos del estado de ánimo, especialmente trastornos depresivos y/o ansiosos. Los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (ISRS), como la fluoxetina, paroxetina, sertralina, citalopram y escitalopram, actúan bloqueando la función del SERT. Al inhibir la recaptura de serotonina, estos fármacos aumentan la disponibilidad de serotonina en el espacio sináptico, lo que mejora la sintomatología asociada con la ansiedad y/o la depresión (Baudry et al., 2019). Es importante destacar que un modelo animal ampliamente utilizado en la investigación de comportamientos ansiosos y relacionados con el estrés es el ratón deficiente del transportador de serotonina (SERT KO) (Murphy & Lesch, 2008).

El ratón SERT KO fue creado en 1998 y presenta una alteración significativa en la homeostasis serotoninérgica (Bengel et al., 1998). En este modelo de ratón, las concentraciones de serotonina tanto extracelulares como intracelulares están alteradas, lo que conduce a anomalías en el

desarrollo cortical y otros cambios neuroadaptativos compensatorios (Li, 2006). La falta de recaptura de serotonina conduce a una eliminación prolongada de esta molécula, lo que resulta en un aumento significativo de los niveles basales de serotonina extracelular (Dayer, 2014). En ratones SERT KO, se ha observado que los niveles basales de serotonina extracelular son aproximadamente nueve veces mayores en comparación con los ratones normales (Bengel et al., 1998). Además, en ratones SERT heterocigotos, se ha reportado un incremento de aproximadamente cinco veces en los niveles basales de 5-HT extracelular (Linsambarth et al., 2017).

Además, se ha evidenciado una respuesta compensatoria en estos ratones, la cual se manifiesta mediante una disminución en la expresión y/o función de algunos receptores de serotonina. Por ejemplo, se ha observado una reducción en la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>R y 5-HT<sub>2A</sub>R en ratones SERT KO (Ansorge et al., 2004; Holmes et al., 2003). Asimismo, se ha informado de una disminución en la función de los 5-HT<sub>2c</sub>R en ratones SERT KO (Li et al., 2003).

Si bien serotonina ciertamente juega un papel importante en la ansiedad, en este momento no está del todo esclarecido si el problema es un déficit o un exceso de este neurotransmisor o se trata de una alteración en la sensibilidad de los múltiples receptores serotoninérgicos pre y postsinápticos vinculados con la ansiedad, que al estar ubicados en distintas regiones del cerebro daría lugar a una variedad de alteraciones.

## **1.4 Receptor TRPV1**

### **1.4.1 Características generales de TRPV1**

El receptor TRPV1 (del inglés, Transient Receptor Potential Vanilloid-1) es un canal catiónico no selectivo ampliamente estudiado en el sistema nervioso periférico debido a su participación en la modulación del dolor (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000; Szallasi et al., 2007). Estos canales son promiscuos, ya que pueden ser activados por una variada gama de estímulos. Por ejemplo, estímulos físicos como la temperatura, protones, voltaje, radiación electromagnética. Ligandos

exógenos como la capsaicina, el ingrediente picante del ají o la resiniferatoxina (RTX) y por último, por diferentes ligandos endógenos pueden activar los TRPV1 incluidos la anandamida (AEA), N-araquidonil dopamina (NADA), productos de la lipooxigenasa como el 12-HPTE y 15-HPTE (ácido hidroperoxieicosatetranoico), óxido nítrico (NO) e incluso la actividad de neutrófilos (Brito et al., 2014; Caterina & Julius, 2001; Chávez et al., 2010; Ghazizadeh & Naziroğlu, 2014; Martins et al., 2014; Meseguer et al., 2014; Ross, 2003; Szallasi et al., 2007).

Interesantemente, durante las última décadas, múltiple evidencia nos indica que los TRPV1 también se encuentran expresados en el SNC pero en menor concentración que en el DRG (Cavanaugh et al., 2011; Han et al., 2013; Sanchez et al., 2001)(Mezey et al., 2000). Entre las áreas cerebrales donde la expresión de los TRPV1 ha sido descrita podemos mencionar el cerebelo, la corteza, el hipocampo, la amígdala e hipotálamo, entre otras (Cristino et al., 2006; Mezey et al., 2000; Tóth et al., 2005). Además, un estudio del 2011 analizó la expresión de TRPV1 en el SNC, a través de un nuevo enfoque, con mayor sensibilidad y especificidad, usando ratones reporteros para TRPV1 modificados genéticamente junto a varias estrategias complementarias, como hibridación in situ, RT-PCR, imágenes de calcio y registros electrofisiológicos, confirmando la expresión funcional de TRPV1 en las neuronas aferentes primarias y además demmostrando que existe expresión en hipotálamo, corteza entorrinal, hipocampo, bulbo olfatorio, núcleo del rafe rostral lineal y sustancia gris periacueductal (Cavanaugh et al., 2011). Dada su ubicación en múltiples áreas cerebrales, no es sorpresa que los canales de TRPV1 han sido fuertemente asociados a los trastornos de ansiedad utilizando animales deficientes para este canal, los cuales muestran menor ansiedad (Mezey et al., 2000).

#### **1.4.2 Estructura y modulación del TRPV1**

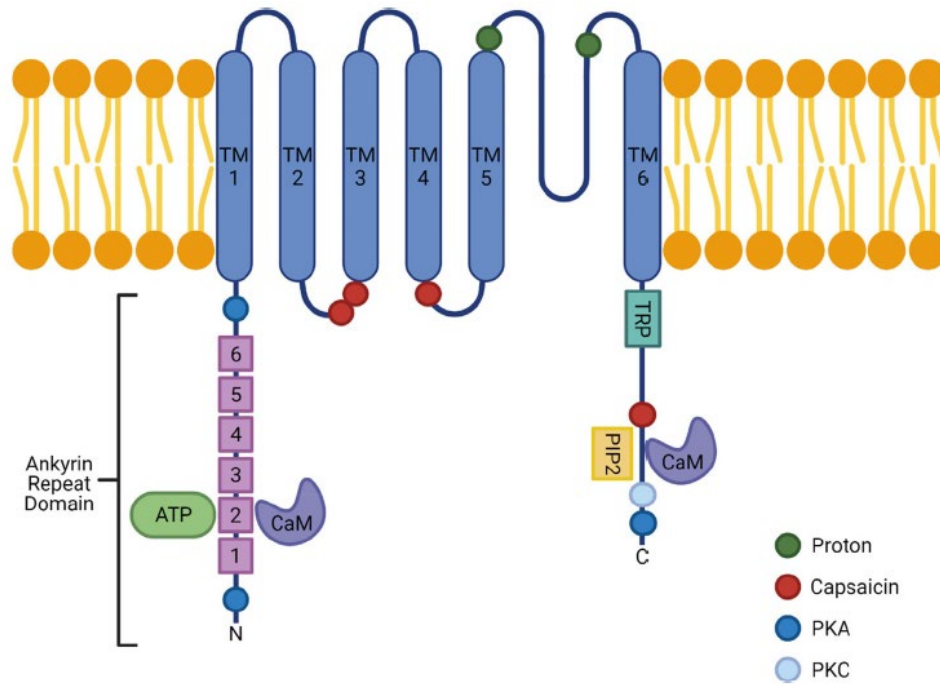
El TRPV1 presenta diversas características estructurales relevantes en su composición. Es una proteína de membrana de 839 aminoácidos de longitud en humanos y ratones, con una masa molecular de alrededor de 95 kDa (Caterina et al., 1997). Su estructura funcional es tetramérica,

similar a otros miembros de la familia TRP, compuesta por seis dominios transmembranales tipo  $\alpha$ -hélice (Tominaga & Tominaga, 2005). Ver figura 4.

En su extremo N-terminal, contiene seis dominios de anquirina, que desempeñan un papel en la agrupación de subunidades y en las interacciones con proteínas citosólicas y del citoesqueleto (Lishko et al., 2007). Además, en este dominio se encuentran sitios susceptibles a fosforilación por PKA y desfosforilación por calcineurina, que afectan la sensibilización del canal (Tominaga & Tominaga, 2005). En el extremo citosólico entre los segmentos TM2 y TM3 se halla un sitio de unión de capsaicina (Jordt & Julius, 2002) y lugares susceptibles de fosforilación por PKC y calcio calmodulina quinasa II. El extremo citosólico carboxilo terminal contiene el dominio TRP, esencial para la asociación de subunidades alrededor del poro y relacionada con la temperatura (García-Sanz et al., 2004). Se ha identificado un sitio de unión a PIP2 en esta región (Prescott & Julius, 2003), así como un motivo de unión a calmodulina (Grycova et al., 2008).

La fosforilación es crucial para regular el TRPV1, permitiendo respuestas rápidas a estímulos y aumentando su sensibilidad. La fosforilación de PKC en Ser800 revierte la desensibilización del canal causada por la exposición prolongada a capsaicina y lo hace más sensible a la unión de agonistas (Mandadi et al., 2006; Varga et al., 2006). Además, otras quinasas, como PKA, Src, CaMKII y PI3K, pueden fosforilar a TRPV1, lo que también incrementa su sensibilidad (Studer & McNaughton, 2010). Por otro lado, la desfosforilación por calcineurina/PP2B y los aumentos del calcio intracelular disminuyen la sensibilidad del canal (Koplas et al., 1997; Mohapatra & Nau, 2005).





**Figura 4. Representación esquemática de la estructura del TRPV1.** Adaptado de (Norzé & Maldonado-Vlaar, 2023).

Además, los TRPV1 pueden ser modulados a través de GPCRs. En respuesta a la inflamación, los TRPV1 se vuelven más activos, lo que resulta en una mayor excitabilidad neuronal (Salzer et al., 2019).

La sensibilización de los TRPV1 puede ocurrir a través de diferentes rutas:

- *Gαq* - La estimulación de un receptor acoplado a *Gαq* activa la PLC, que produce moléculas como IP3 y DAG. Estas moléculas desencadenan la liberación de calcio intracelular y activan la proteína quinasa C (PKC). Cada paso en esta cascada puede afectar la función de los TRPV1 (Rohacs, 2015a).

Entre estos receptores se encuentran:

Receptor de Bradicinina B2, que estimula la producción de DAG y activa PKC, aumentando la actividad de los TRPV1 (Tang et al., 2004).

Receptor de Serotonina 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>2c</sub>R, que activa DAGLa y PKC, lo que resulta en un aumento en la actividad de los TRPV1 (Ohta et al., 2006; Salzer et al., 2016; Sugiuar et al., 2004).

Receptor de Proteasas PAR2, PAR1 y PAR4, que activan PKC, incrementando la corriente a través de los TRPV1 (Amadesi et al., 2004; Dai et al., 2004; Vellani et al., 2010).

Endotelina-1 ETA, que estimula PKC, resultando en un aumento en la actividad de los TRPV1 (Plant et al., 2007).

- *G $\alpha$ s* - La estimulación de un receptor acoplado a *G $\alpha$ s* activa la adenilil ciclasa, que produce monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Esto, a su vez, activa la proteína quinasa A (PKA), que aumenta la sensibilidad de los TRPV1 a sus agonistas y reduce la desensibilización mediada por el calcio (Salzer et al., 2019).

Ejemplo de receptor *G $\alpha$ s*: Receptor 5-HT<sub>4</sub>, que influye en la actividad de los TRPV1 a través de la vía *G $\alpha$ s* (Sugiuar et al., 2004).

- PIP2: El fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) es esencial para regular la actividad de receptores TRP, incluido el TRPV1 (Huang et al., 2006). PIP2 puede activar directa o indirectamente a TRPV1 mediante la acción de PLC, que produce señales como IP3 y DAG (Lukacs et al., 2007). La activación de la PKC por DAG resulta en la fosforilación y activación del TRPV1. Aunque algunos estudios sugieren que el PIP2 endógeno podría reducir la actividad de TRPV1, en general, la presencia de PIP2 activa, en lugar de inhibir, este canal (Rohacs, 2015a). La estimulación de las vías de PLC lleva a la eliminación de PIP2 del extremo C-terminal de TRPV1, lo que potencia la corriente de TRPV1 durante la estimulación por calor, capsaicina y pH. La eliminación de este sitio de unión de PIP2 aumenta la tasa de fosforilación y activación del canal, facilitando su inserción en la membrana plasmática. En resumen, el PIP2 tiene un rol clave en la activación del TRPV1 (Rohacs, 2015b).

#### 1.4.4 Farmacología

TRPV1 posee una gran diversidad de agonistas y antagonistas, que incluye tanto compuestos endógenos como exógenos, capaces de modular su actividad. Este receptor polimodal presenta varios sitios de unión que interactúan con una variedad de ligandos. Su capacidad para actuar como integrador molecular frente a numerosos estímulos, junto con la evidencia de que distintas regiones del receptor participan en la activación por diversas moléculas, destaca la complejidad y dinámica inherentes a la activación de TRPV1 (Ho et al., 2012; Martins et al., 2014).

##### Agonistas Exógenos

Dentro de los agonistas exógenos más estudiados de TRPV1 está la capsaicina, una molécula vaniloide presente en los frutos de algunas especies del género *Capsicum*, siendo el componente picante del ají (Govindarajan & Sathyanarayana, 1991; Szolcsányi, 2004). Considerada un agonista selectivo y específico de TRPV1, la capsaicina tiene una concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>) de aproximadamente 700 nM en este canal iónico (Caterina et al., 1997). Su capacidad para aumentar la probabilidad de apertura del canal iónico y el flujo catiónico resulta en la sensación de ardor característica de los pimientos picantes (Szallasi & Blumberg, 1999).

Siguiendo la línea de los vaniloides, la resiniferatoxina (RTX), proveniente de la planta *Euphorbia resinifera*, destaca como un agonista más potente que la capsaicina, capaz de producir respuestas biológicas mediadas por TRPV1 (Szallasi & Blumberg, 1990; Vennekens et al., 2008). La RTX, un diterpeno relacionado con los forbolos, es más potente (con una EC<sub>50</sub> de ~40 nM) que la capsaicina en producir efectos biológicos mediados por TRPV1 (Szallasi & Blumberg, 1990). Aunque ambos agentes provocan desensibilización, la RTX induce una despolarización prolongada, generando menos potenciales de acción que la capsaicina a una misma extensión de despolarización debido a su cinética más lenta en activar TRPV1 (Caterina et al., 1997; Raisinghani et al., 2005).

Otras moléculas derivadas de plantas, incluidas la piperina y la piperinoil-piperidina que son los alcaloides presentes en la pimienta negra o blanca; el eugenol, un fenol derivado del aceite de las hojas de clavo y canela y los gingeroles, que son los compuestos fenólicos del jengibre, también poseen el motivo vanilloide y pueden activar TRPV1 con diversas eficacias y potencias (Holzer & Izzo, 2014; Izzo & Ernst, 2001; Roufogalis & Mandadi, 2008).

Además, hay agonistas sintéticos como el Olvanil, que presenta una CE50 de 0,7 nM, por lo que es 10 veces más potente que la capsaicina. Además, Olvanil tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, permitiéndole actuar tanto sobre los TRPV1 periféricos como centrales (Hoffmann et al., 2012).

#### Agonistas endógenos

Los endovaniloides son ligandos endógenos capaz de activar al TRPV1. Estos compuestos están formados por una cadena de ácidos grasos insaturados con una longitud de 18 a 20 átomos de carbono, como por ejemplo el ácido oleico o araquidónico, unidas a moléculas como el glicerol, la etanolamina o dopamina (Starowicz et al., 2007; Van Der Stelt & Di Marzo, 2004).

Entre estos ligandos endógenos podemos encontrar a AEA (Zygmunt et al., 1999), NADA (Huang et al., 2002), la N-oleoildopamina (OLDA) (Chu et al., 2003), los productos de la lipoxigenasa, como el 12- y 15-(S)-HPETE (Hwang et al., 2000), y las N-aciletanolaminas (NAEs) insaturadas de 18 carbonos (Movahed et al., 2005).

La AEA, fue caracterizada originalmente como un agonista endógeno del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) (Van Der Stelt & Di Marzo, 2004). Posteriormente, fue la primera molécula endógena en ser identificada como un activador endógeno de TRPV1 (Ross, 2003; Zygmunt et al., 1999). Se caracteriza por unirse también al bolsillo vanilloide, al igual que lo hace la capsaicina.

En la síntesis de AEA participan distintas vías de señalización intracelular que producen este ligando de manera dependiente o independiente de calcio (Liu et al., 2008; Okamoto et al., 2007; Sun et al., 2004). La AEA se sintetiza a partir de la hidrólisis del precursor N-araquidonil

fosfatidiletanolamina (NAPE) mediante la fosfolipasa D dependiente de NAPE (NAPE-PLD), el NAPE es producido a partir del fosfolípido fosfatidiletanolamina y ácido araquidónico vía una N-acetiltransferasa inespecífica (NAT)(Liu et al., 2008).

La degradación de AEA ocurre principalmente por la acción de la hidrolasa de amida de ácidos grasos (FAAH), que la hidroliza en ácido araquidónico y etanolamina. Además, otros procesos metabólicos y enzimáticos también pueden contribuir a su degradación (Biringer, 2021).

#### Antagonistas de TRPV1

Los antagonistas de TRPV1 están recibiendo mucha atención debido a su importancia en el manejo de trastornos neuropsiquiátricos y ansiedad, en contraste con el enfoque más clásico centrado en el manejo del dolor crónico, migrañas y trastornos gastrointestinales (Escelsior et al., 2020; Iglesias et al., 2022).

La capsazepina (CPZ), un análogo de la capsaicina, fue el primer antagonista competitivo sintético de TRPV1 (Bevan et al., 1992). CPZ inhibe competitivamente los efectos farmacológicos de la capsaicina y la RTX con potencia moderada en una variedad de bioensayos in vitro e in vivo (Dickenson & Dray, 1991; Tominaga & Julius, 2000; Walpole et al., 1994). Además, CPZ tiene potenciales efectos terapéuticos contra diversos tipos de cáncer y trastornos como colitis, pancreatitis, malaria y epilepsia (Yang et al., 2019); también se ha observado un efecto ansiolítico administrado en ratones tanto de manera sistémica como local (Aguiar et al., 2009; Kasckow et al., 2004).

Otro antagonista sintético la 5-yodoresiniferatoxina (5'-IRTX) pertenece a la clase de derivados yodados de vanililo. Como RTX es un agonista ultrapotente de TRPV1, la introducción de un átomo de yodo orto al hidroxilo fenólico de la porción homovanililo revierte y genera el potente antagonista 5'-IRTX (Wahl et al., 2001)

Los antagonistas endógenos de TRPV1 son escasos y no tan abundantes como los agonistas (Vriens et al., 2009). Recientemente, se descubrió que el inhibidor endógeno de la amida

hidrolasa de ácido graso N-araquidonil serotonina (AA-5-HT) bloquea directamente TRPV1 e inhibe la generación de (Maione et al., 2007).

Además, existen antagonistas no competitivos interactúan con sitios distintos al sitio de unión del agonista (bloqueadores del poro) como el rojo de rutenio (RR), que interactúa presumiblemente no solo con el sitio de unión de ligandos de TRPV1, sino que también bloquea su poro acuoso. RR se une a TRPV1 con alta potencia de manera dependiente del voltaje (García-Martínez et al., 2002).

#### **1.4.5 TRPV1 y ansiedad**

En las últimas dos décadas, la relación de TRPV1 con trastornos neuropsiquiátricos ha generado interés en el ámbito de la neurofarmacología, especialmente después de estudios que sugieren su expresión y función en regiones cerebrales asociadas con la regulación de la ansiedad, el estado de ánimo, la recompensa y la motivación (Escelsior et al., 2020; Iglesias et al., 2022; Martins et al., 2014; Naziroglu & Demirdas, 2015). (Kasckow et al., 2004; Marsch et al., 2007; Terzian et al., 2014; Li et al., 2008; Manna & Umathe, 2011; Wang et al., 2017; You et al., 2012). (Aguiar et al., 2009; Kasckow et al., 2004; Marsch et al., 2007; Micale et al., 2009; Rubino et al., 2008; Santos et al., 2008; Terzian et al., 2014).

Respecto a evidencias genéticas, se ha demostrado que el ratón deficiente de TRPV1 (TRPV1 KO) presenta un fenotipo ansiolítico cuando es sometido a paradigmas clásicos como el EPM (Marsch et al., 2007; Rossi et al., 2012) y en el LDT (Marsch et al., 2007). Además, los ratones TRPV1 KO mostraron una menor latencia para alimentarse en comparación con los ratones WT en la prueba de alimentación suprimida por novedad (NSFT) (Wang et al., 2017; You et al., 2012).

Por otro lado, la inyección de antagonistas de TRPV1 de manera sistémica también han mostrado tener un efecto ansiolítico en roedores (Micale et al., 2009; Santos et al., 2008); ver tabla 3). Por ejemplo, la inyección I.P del antagonista SB366791 disminuye las visitas a los brazos abiertos en comparación con la inyección de salino en el EPM (Terzian et al., 2009), mientras que la

administración I.P de olvanil, un agonista de este receptor disminuye el tiempo que el ratón pasa en los brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz, indicando que la activación de TRPV1 induce comportamientos ansiogénicos (Kasckow et al., 2004).

Dirigirse a regiones cerebrales específicas ha sido útil para determinar las bases neuroanatómicas de la modulación de la ansiedad por TRPV1. La administración de CPZ en el hipocampo ventral de ratas produjo un efecto ansiolítico, ya que pasaron más tiempo en los brazos abiertos en el EPM en comparación con el grupo control (Santos et al., 2008). Del mismo modo, la inhibición de TRPV1 en la corteza prefrontal medial de ratas mediante la infusión del antagonista CPZ aumenta el tiempo de exploración en el EPM y el número de lamidas en el ensayo de conflicto de Vogel, indicando que la administración de antagonistas de TRPV1 estarían produciendo un efecto ansiolítico (Aguiar et al., 2009; Fogaça et al., 2012). Del mismo modo, cuando se considera el papel de la sustancia gris periacueductal (dPAG) en la ansiedad (Aguiar et al., 2014), se ha demostrado que la administración local de capzasepina en la dPAG indujo efectos ansiolíticos en ratas expuestas a la prueba EPM y la prueba de conflicto de Vogel (Terzian et al., 2009). En concordancia con estos resultados, la activación de TRPV1 mediante la microinyección de capsaicina en la dPAG indujo efectos ansiogénicos en ratones expuestos al EPM (Mascarenhas et al., 2013).

Por otra parte, la microinyección en bajas dosis de metanandamida (mAEA), un análogo no hidrolizable de anandamida, en corteza prefrontal, produce un efecto ansiolítico debido a la activación de receptores CB1, mientras que, a altas dosis, al activar a TRPV1, produce un efecto ansiogénico (Rubino et al. 2008). El efecto ansiogénico fue bloqueado mediante aplicación de capzasepina. Además el aumento de anandamida endógeno producido mediante la administración de URB597, un inhibidor selectivo de la FAAH, tuvo un efecto ansiogénico también (Rubino et al., 2008). Siguiendo con esta misma línea, se ha demostrado que el inhibidor dual de FAAH/TRPV1, AA-5-HT tiene efectos sobre los comportamientos ansiosos. Estos efectos conductuales probablemente se deben a un aumento de los niveles AEA mediante el bloqueo de

FAAH y a la inhibición o desensibilización de los TRPV1. AA-5-HT al ser administrado por vía I.P, en la mPFC o en la BLA de roedores, redujo los comportamientos del tipo ansioso (John & Currie, 2012; Micale et al., 2009), y las respuestas al estrés (Sartim et al., 2017).

Por otra parte, es importante mencionar, el papel de TRPV1 en la mediación de comportamientos relacionados con el estrés. Li y colaboradores en el 2008, demostraron que la activación de TRPV1 es necesaria para mejorar la recuperación de la memoria espacial en respuesta al estrés. El estrés agudo usualmente suprime la potenciación a largo plazo (LTP) y activa la depresión a largo plazo (LTD), pero la capsaicina, un agonista de TRPV1, previene estos efectos. La administración intrahipocampal o intragástrica de capsaicina eliminó los déficits de memoria espacial asociados con el estrés en la prueba de nado forzado. Estos hallazgos sugieren que TRPV1 puede desempeñar un papel protector en la memoria a corto plazo después de eventos estresantes (Li et al., 2008). Además, Wang et al. demostraron que los ratones TRPV1 KO eran más resistentes al estrés en comparación con los animales de control (Wang et al., 2017).

En cuanto a la modulación de comportamientos depresivos, existen evidencias que TRPV1 regula este tipo de conductas, ya que la ausencia de este receptor produce un efecto antidepresivo en roedores (Manna & Umathe, 2011; You et al., 2012). En la prueba de nado forzado, los ratones TRPV1 KO muestran una disminución significativa de la movilidad y tiempos de latencia reducidos en comparación con los ratones WT (You et al., 2012). Por el contrario, la activación de TRPV1 promueve comportamientos depresivos, como la inmovilidad, que se revierten con antidepresivos (Abdelhamid et al., 2014). La administración de CPZ intracerebrovascular disminuye la inmovilidad en ratones en el ensayo de nado forzado, mientras que olvanil, un agonista de TRPV1, reduce los tiempos de inmovilidad en ratas en la misma prueba (Kasckow et al., 2004; Manna & Umathe, 2011). En su conjunto, toda esta evidencia sugiere fuertemente que los canales de TRPV1 son un importante regulador de los estados de ansiedad.



<b>Droga y dosis</b>	<b>Acción o modelo</b>	<b>Ruta de administración / región</b>	<b>Test/ efecto</b>	<b>especie</b>	<b>Referencia</b>
Olvanil 0.2-5.0 mg/Kg	agonista TRPV1	I.P	EPM/ ansiogénico	Rata	Kasckow et al., 2004
Capsazepina 1-10 µg/Kg	Antagonista TRPV1	I.P	EPM/ ansiolítico	Rata	Kasckow et al., 2004
Capsazepina	Antagonista TRPV1	I.C / mPFC	EPM y CVT / ansiolítico	Rata	Aguiar et al., 2009
Meta anadamida Capsaicina	Agonistas TRPV1	I.C	EPM ansiogénico	Rata	Rubino et al., 2008
AA-5-HT	Bloqueador dual FAHH/TRPV1	I.C BLA	EPM/ ansiolítico	Rata	(John &Currie, 2012)
AA-5-HT	Bloqueador dual FAHH/TRPV1				Freels et al., 2019
Capsaicina	agonista TRPV1	I.C HPCd	EPM/ ansiogénico	Rata	(Hakimizadeh et al., 2012)
Capsazepina	Antagonista TRPV1	I.C HPCv	EPM/ansiolítico	Rata	Santos et al., 2008
Capsaicina	agonista TRPV1	I.C dPAG	EPM/ansiogénico	Ratón	(Mascarenhas et al., 2013)
Capsaicina	agonista TRPV1	I.C dPAG	EPM y CVT/ ansiolítico	Rata	Terzian 2009
Capsazepina	Antagonista TRPV1	I.C mPFC	Condicionamiento al miedo/ Disminución en la respuesta	Rata	Terzian 2014
Capsaicina 1-10µg and 1nmol	agonista TRPV1	I.C mPFC	Condicionamiento al miedo/ Aumento en la respuesta	Rata	Terzian 2014
Capsazepina (60 nmol/0.2 µl)	Antagonista TRPV1	I.C dPAG	Exposición a depredadores /Disminución de la respuesta al miedo	Rata	Aguiar 2015
Capsazepina	Antagonista TRPV1	I.C HPCv	EPM/ansiolítico	Rata	Santos et al., 2008

Capsaicina	agonista TRPV1	I.C dPAG	EPM/ansiológico	Ratón	(Mascarenhas et al., 2013)
Capsaicina	agonista TRPV1	I.C dPAG	EPM y CVT/ansiológico	Rata	Terzian 2009
Capsazepina	Antagonista TRPV1	I.C mPFC	Condicionamiento al miedo/ Disminución en la respuesta	Rata	Terzian 2014
Capsaicina 1-10µg and 1nmol	agonista TRPV1	I.C mPCF	Condicionamiento al miedo/ Aumento en la respuesta	Rata	Terzian 2014
Capsazepina (60 nmol/0.2 µl)	Antagonista TRPV1	I.C dPAG	Exposición a depredadores /Disminución de la respuesta al miedo	Rata	Aguiar 2015
-	TRPV1 KO	-	EPM/ansiológico	Ratón	Marsch et al., 2007
-	TRPV1 KO	-	EPM/ansiológico	Ratón	Rossi et al. (2012)
-	TRPV1 KO	-	NSFT/ansiológico	Ratón	Wang et al 2017
-	TRPV1 KO	-	NSFT/ansiológico	Ratón	You et al., 2012

**Tabla 4:** Efectos de la modulación farmacológica/genética de TRPV1 en modelos animales de ansiedad. Modificado de Iglesias et al., 2022.

En síntesis, los antecedentes expuestos sugieren que el sistema serotoninérgico podría desempeñar un papel crucial en la modulación de los comportamientos relacionados con la ansiedad y el estrés mediados por el receptor TRPV1. Aunque se ha establecido una conexión entre los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 (Ohta et al., 2006; Salzer et al., 2016; Sugiuar et al., 2004), el mecanismo subyacente aún no se comprende completamente. Es posible que la activación de estos receptores tenga un punto de convergencia en sus cascadas de señalización, y su interacción podría ser un regulador clave de los comportamientos ansiosos.

*De todos los antecedentes presentados, los aspectos más destacados incluyen:*

- La participación del sistema serotoninérgico en los comportamientos de ansiedad.

- La relevancia específica de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R en los comportamientos ansiosos, respaldada por el fenotipo ansiolítico de los ratones 5-HT<sub>2c</sub>R KO
- La inducción de comportamientos ansiosos mediante la activación farmacológica del 5-HT<sub>2c</sub>R.
- El papel del TRPV1 en los comportamientos ansiosos, evidenciado por el fenotipo ansiolítico en ratones TRPV1 KO.

Por lo tanto, surge la posibilidad de que la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 esté interconectada, sugiriendo que su interacción puede ser un factor regulador clave de los comportamientos ansiosos. Estos hallazgos resaltan la complejidad de la interacción entre estos sistemas y ofrecen perspectivas importantes para futuras investigaciones.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

TRPV1 es necesario para la manifestación de las conductas del tipo ansiosas mediadas por la activación del receptor 5-HT<sub>2c</sub>R.

### **OBJETIVO GENERAL**

Investigar a nivel conductual como 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 regulan las conductas del tipo ansiosas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar si la activación farmacológica in vivo de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R induce un efecto ansiogénico en ratones WT, utilizando los paradigmas comportamentales OFT, EPM y LDT.
2. Investigar si el bloqueo selectivo de los receptores TRPV1 modifica los efectos ansiogénicos inducidos por la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R utilizando el OFT y EPM.
3. Evaluar los efectos de la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R en TRPV1 KO en relación con comportamientos ansiosos.
4. Estudiar cómo el bloqueo de los receptores TRPV1 con CPZ rescata los comportamientos ansiosos observados en ratones SERT KO, un modelo genético de ansiedad reconocido.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Animales de experimentación**

Se emplearon ratones macho y hembra de la cepa C57B/6J wild-type (WT), así como de las líneas SERT KO, TRPV1 KO y SERT-het/TRPV1-het con edades comprendidas entre 3 y 6 meses y un peso aproximado de 25 a 30 gramos. Los ratones TRPV1 KO fueron gentilmente donados por el Dr. Rodolfo Madrid de la Universidad de Santiago. Todos los animales se alojaron en el bioterio de transgénicos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

Estos ratones se mantuvieron en una sala con temperatura controlada ( $21 \pm 2$  °C) y humedad entre 40-70%, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (7 AM: 7 PM). Fueron agrupados en jaulas de 4 a 5 animales, con acceso ad libitum a alimento (LabDiet RMH 3000) y agua. Todos los procedimientos se llevaron a cabo conforme a los protocolos del Comité de Biotética de la Universidad de Valparaíso (ACTA BEA 016-2013).

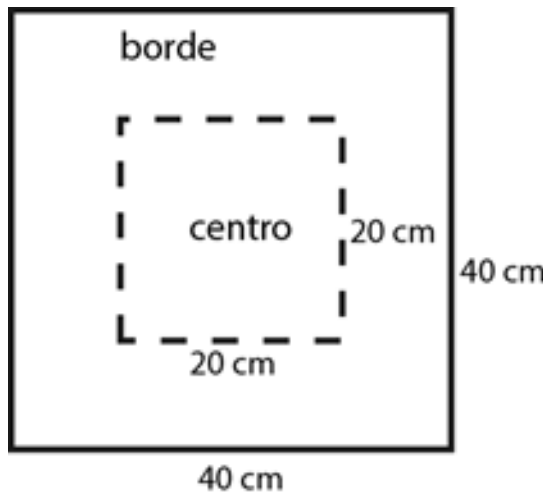
#### **3.2 Estudios de Conducta**

Todos los experimentos fueron realizados en una sala de conducta acondicionada especialmente para tal efecto, aislada de ruidos externos y olores que pudieran producir estrés a los animales para no interferir en las conductas. Las pruebas conductuales fueron realizadas durante la fase clara preferentemente, entre las 9:00 AM y 5:00 PM, para evitar interferencias con el ciclo circadiano. La intensidad de la luz se mantuvo a 5 lux como máximo, usando una luz de baja intensidad de color rojo. La sala se mantuvo a una temperatura constante entre los 20° C- 22°C y a una humedad controlada. Los ratones fueron habituados durante al menos 30 minutos a estas condiciones, antes de comenzar las pruebas conductuales. Después de finalizar cada paradigma los aparatos fueron limpiados con una solución de etanol al 5% para eliminar señales olfatorias que pudieran interferir en los siguientes experimentos.

### 3.2.1 Prueba de campo abierto:

Esta prueba permite evaluar simultáneamente actividad locomotora y conductas del tipo ansiosas. El OFT se realizó en una caja cuadrada de acrílico blanco (40 cm x 40 cm x 35 cm de alto). Los animales fueron puestos en el centro de la arena (20 X 20 cm) y se registró la actividad horizontal durante los primeros 5 minutos.

Se delimitaron de manera virtual dos zonas de análisis (ver figura 5): zona 1 correspondiente al borde de la arena y zona 2 correspondiente al centro de la arena.

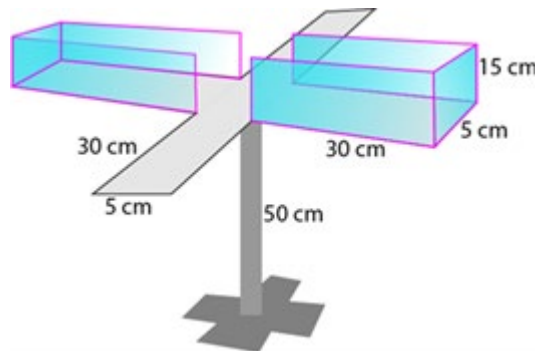


**Figura 5. Esquema del OFT.** Cada individuo se introduce al centro de la arena (40 cm x 40 cm, rodeada de una pared de 36 cm de altura). Durante 5 minutos se registró la conducta exploratoria de cada individuo, la distancia recorrida total (cm), la velocidad promedio (cm/s), el tiempo (s) de permanencia o exploración en el borde de la arena o en el centro (20 cm x 20 cm).

Se tomaron como parámetros para medir la ansiedad, el tiempo de permanencia de los animales por el centro de la arena y la frecuencia en el centro. Todos estos parámetros fueron registrados y analizados mediante el sistema de seguimiento por video Noldus Ethovision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

### 3.2.2 Laberinto Elevado en Cruz :

Este paradigma está basado en la aversión que siente el animal por los espacios desprotegidos y a las alturas (Lister, 1987). El laberinto consiste en una cruz hecha de plexiglás formada por 2 brazos abiertos y 2 brazos cerrados (30 x 5 cm) que están conectados por una plataforma central (5 x 5 cm), elevado a 40 cm del suelo. Se delimitaron de manera virtual dos zonas de análisis (ver Figura 6): zona 1 correspondiente al brazos abiertos y zona 2 correspondiente a los brazos cerrados y zona 3 que corresponde al centro.



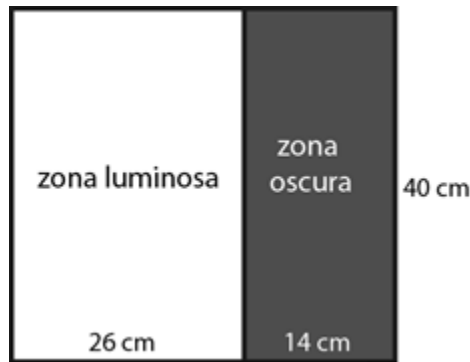
**Figura 6. Esquema del EPM.** Cada individuo se introduce en la zona central (5 cm x 5 cm) del laberinto, de 50 cm de altura. Durante 5 minutos se registró el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%), la frecuencia de entrada a los brazos abiertos y la distancia recorrida (cm).

Todo el test se realizó con una iluminación neutral de 5 lux aproximadamente, sin estímulos aversivos adicionales. Los animales fueron puestos en el centro del laberinto mirando hacia el brazo abierto al inicio de cada prueba y se registró el movimiento del ratón durante los primeros 5 minutos. Para determinar el grado de ansiedad se determinaron los parámetros tiempo y frecuencia en los brazos abiertos. Para determinar la actividad locomotora se calculó la distancia recorrida. La actividad fue registrada con Noldus Ethovision.

### 3.2.3 Caja de Luz Oscuridad

Este test se fundamenta en la preferencia etológica de los roedores por los lugares oscuros y la aversión por ambientes iluminados (Bourin et al., 2003, Bilkei-Gorzó et al., 1998).

La caja está formada por dos compartimentos, uno abierto iluminado (26 x 39 cm) y otro oscuro (13 x 39 cm) con tapa. Ambos están comunicados mediante una compuerta que permite el paso del ratón entre un espacio y otro. El lado claro debe estar iluminado entre 200-400 lux, como un estímulo aversivo para el animal.



**Figura 7. Esquema del LDT.** Cada individuo se introduce en la zona luminosa (200-400 lux), y durante 5 minutos se registró la latencia de ingreso a la zona oscura (menor a 5 lux) y el tiempo de permanencia en cada área.

El ratón se colocó en el lado claro, de espaldas a la compuerta, y se registró su actividad durante los primeros 5 minutos. El nivel de ansiedad se evaluó mediante la “latencia de entrada compartimento claro, el “número total de entradas al lado claro.

Se escogieron estas condiciones de iluminación y de posición inicial del ratón según el estudio de (Serchov et al., 2016).

Los ratones se colocaron en el lado claro para que pudieran ser detectados por la cámara y los ratones se dejaron libremente explorar durante 5 minutos. Se midió el tiempo en ambos lados (oscuro y claro) y la latencia utilizando el software Ethovision TX (Noldus).



### 3.2.4 Test de interacción social de 3 cámaras

Se utilizó un aparato rectangular de acrílico transparente con tres cámaras para evaluar la sociabilidad. Cada una de las tres cámaras medía 20 cm (longitud) × 40 cm (ancho) × 22 cm (altura), separadas por paredes transparentes, conectadas con pequeñas aberturas que tenían puertas extraíbles controladas por el experimentador para regular el acceso a las cámaras. La iluminación se ajustó manteniendo una luz roja tenue (~5 lux) uniforme durante toda la prueba. Los ratones objetivo (no familiar, utilizados como novedad social) fueron entrenados en un recipiente invertido de alambre dentro de una cámara lateral del laberinto. Antes de la prueba, se habituó a los ratones en la cámara central durante 10 minutos. Después, se les permitió explorar libremente todas las cámaras durante 10 minutos. Completado el período de habituación, se encerró al ratón de prueba en la cámara central y al ratón no familiar (novedad social) en una de las dos cámaras, dentro de un recipiente de metal con aberturas que permiten el reconocimiento visual y olfativo, pero evitando el contacto directo. En la cámara lateral contraria, se introdujo un recipiente de metal vacío. Se abrieron las puertas de la cámara central y se registraron durante 10 minutos los tiempos de interacción del ratón de prueba con la rejilla que contenía al ratón objetivo usado como novedad social y con la rejilla vacía (prueba de interacción social) ( Yang et al., 2011). Los olores y las heces de los ratones se limpiaron con etanol al 70% entre las pruebas.

### 3.3 Tratamientos Farmacológicos

Las siguientes drogas fueron usadas:

(I) 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP agonista 5-HT<sub>2C/2B</sub>, 1mg/Kg/ 0.2μL) (Sigma Aldrich, St Louis USA); (II) 6-cloro-2(1-piperazinil)-pirazina (MK212 agonista selectivo 5-HT<sub>2C</sub> 1mg/Kg/ 0.2μL); (III) 6-cloro-5 -metil-1-[2-(2metilpiridil-3-oxi)-pirida-5-il carbamoil] indolina (SB242084 antagonista selectivo 5-HT<sub>2C</sub>, 1 mg/Kg/0.2μL) (Tocris Bioscience, Ellisville, USA) y (IV) capsazepina (N-[2- (4-clorofenil) etil]-1, 3, 4, 5-tetrahidro7, 8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-

carbotoamida) (CPZ, antagonista competitivo TRPV1, 2 mg/Kg/ 0.3  $\mu$ L ) (Tocris Bioscience, Bristol, UK). Las dos primeras fueron disueltas en salino, mientras que las dos últimas se disolvieron en dimetil sulfoxido 2% (DMSO; Sigma-Aldrich, Germany) + salino. Todas las soluciones fueron preparadas frescas. Todos los animales recibieron inyecciones vía I.P, ver tabla 4.

La dosis de mCPP fue elegida basada en estudios previos, que demostraban que los efectos conductuales se veían en una dosis de 1 mg/kg en conductas del tipo ansiosas en ratones (Martin et al., 2002; Rodgers et al., 1992). MK212 fue usado en una dosis de 1 mg/kg, y es considerablemente más potente que el mCPP e induce hipolocomoción (Lucki et al., 1989). La dosis de 1 mg/kg de SB242084 fue elegida ya que bloquea la hipoactividad que induce el MK212 (1 mg/kg) (Martin et al., 2002).

Droga	Forma de Administración /volumen ( $\mu$ L)	Dosis mg/kg	Tiempo de administración antes de la prueba
<b>Agonistas 5-HT<sub>2</sub>CRs</b>			
mCPP	I.P/200	1	30/60 min
MK212	I.P/ 200	1	30/60 min
Vehículo (salino)	I.P/ 200	–	–
<b>Antagonista 5-HT<sub>2</sub>CRs</b>			
SB242084	I.P/ 200	1	60min
Vehículo (DMSO 2% v/v)	I.P/ 200	-	–

<b>Antagonista TRPV1</b>			
Capsazepina CPZ	I.P/ 300	2	60min
Vehículo (DMSO 2% v/v)	I.P/ 300	-	–

**Tabla 5:** *Tratamientos farmacológicos usados.*

### **3.4 Diseño experimental**

El diseño experimental está detallado en las tablas 5 a la 8, e incluye información sobre tratamiento, genotipo y el número (n) de ratones en cada grupo.

#### **3.4.1 Evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad de ratones WT bajo tratamiento farmacológico**

La secuencia de pruebas incluyó el OFT, el EPM a un cohorte de animales y el LDT se realizó con un cohorte distinto de animales. Los detalles de los parámetros analizados se encuentran descritos en el apartado 3.3 de esta sección. Se evaluó el efecto del tratamiento farmacológico con agonistas y antagonistas del 5-HT<sub>2c</sub>R y con un antagonista TRPV1, sobre el comportamiento relacionado con la ansiedad. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en los distintos grupos experimentales y se le aplicó una dosis de vehículo, agonista o antagonista según corresponda (ver tabla 5). Luego del tratamiento farmacológico agudo los ratones fueron sometidos a las pruebas comportamentales correspondientes.

Las pruebas OFT y EPM se llevaron a cabo con un intervalo de 30 minutos entre ellas (figura 8A), mientras que el LDT se realizó con un conjunto diferente de animales (figura 8 B). Para los tratamientos de los grupos IV y V se siguió el esquema de las figuras 8 C y 8 D. Este orden específico se seleccionó estratégicamente para minimizar posibles efectos residuales de las pruebas anteriores, siguiendo la recomendación de estudios previos (McIlwain et al., 2001; Lad et al., 2010). En particular, se optó por comenzar con el OFT seguido del EPM, priorizando la realización de la prueba que genera menos estrés a los animales primero, de manera que su influencia en las pruebas subsiguientes sea mitigada.

Diseño experimental 1			
Tratamiento	WT cohorte 1		WT cohorte 2
	OFT	EPM	LDT
Veh <b>(grupo I)</b>	n=11	n=11	n=8
mCPP <b>(grupo II)</b>	n=10	n=10	n=8
MK212 <b>(grupo III)</b>	n=10	n=10	n=7
SB242084 + MK212 <b>(grupo IV)</b>	n=9	n=9	n=8
SB242084+vehículo <b>(grupo V)</b>	n=13	n=13	n=9
CPZ <b>(grupo VI)</b>	n=11	n=11	–
CPZ+mCPP <b>Grupo VII</b>	n=10	n=10	–
CPZ+ MK212 <b>Grupo VIII</b>	n=10	n=10	–

Tabla 6: Número de ratones (n) usados por genotipo WT y grupo de tratamientos.

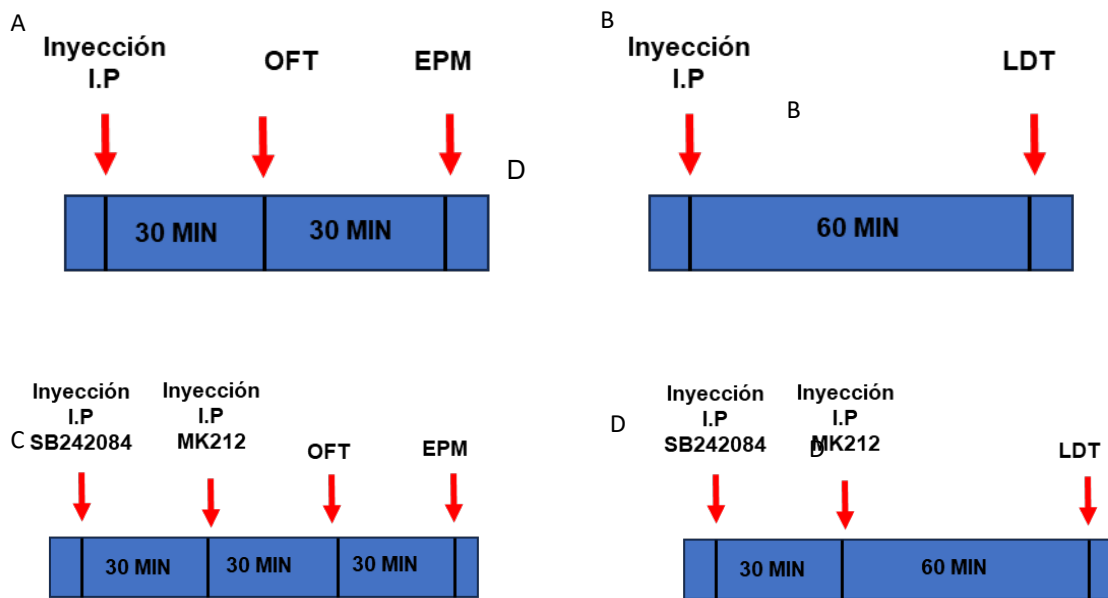


Figura 8. Esquema del diseño experimental utilizado para la evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad en ratones WT. Línea de tiempo correspondiente a la realización de las pruebas OFT y EPM (A y C, según corresponda). Esquema experimental utilizado el LDT (B y D, según corresponda).

### 3.4.2 Evaluación del comportamiento de ratones TRPV1 KO.

Se evaluó el fenotipo relacionado con la ansiedad y las interacciones sociales en ratones TRPV1 KO adultos. Con el objetivo de explorar la influencia de TRPV1 en las conductas ansiosas, los animales TRPV1 KO fueron sometidos a diversas pruebas comportamentales diseñadas para evaluar el comportamiento ansioso. Además, se aplicó el test de interacción social para evaluar la contribución de estos receptores en las interacciones sociales. Los tratamientos utilizados se detallan en la tabla 6, y la línea de tiempo de los experimentos se presenta en las figuras 8 A y 8 B según corresponda.

Diseño experimental 3				
Genotipo	TRPV1 KO cohorte 1			
	OFT	EPM	LDT	TIS
TRPV1 WT	6	6	3	3
TRPV1 KO	10	10	7	6

**Tabla 7:** Número de ratones (*n*) usados por genotipo TRPV1 KO para evaluación de fenotipo.

### 3.4.3 Estudio del comportamiento de ratones TRPV1 KO bajo tratamiento farmacológico

Con el objetivo de investigar la influencia de TRPV1 en las conductas ansiosas mediadas por los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R, se sometieron los animales TRPV1 KO a diversas pruebas comportamentales destinadas a evaluar el comportamiento ansioso. Asimismo, se les aplicó un tratamiento farmacológico utilizando los agonistas 5-HT<sub>2c</sub>R, con el propósito de determinar la contribución de estos receptores. Los tratamientos utilizados aparecen en la tabla 7 y la línea de tiempo de los experimentos en la figura 8 A y 8 B según corresponda.

Diseño experimental 2			
Tratamiento	TRPV1 KO cohorte 1		TRPV1 KO cohorte 2
	OFT	EPM	LDT
Veh (grupo I)	10	10	8
mCPP (grupo II)	10	10	3
MK212 (grupo III)	10	10	9

**Tabla 8:** Número de ratones (*n*) usados por genotipo TRPV1 KO y grupo de tratamientos administrados vía I.P.

#### 3.4.4 Evaluación del comportamiento ansioso de ratones SERT doble het

Para la evaluación del fenotipo conductual SERT-het/TRPV1-het, se usaron como animales control los animales SERT het y TRPV1 het. A estos 3 grupos de animales, se les realizó las 3 pruebas clásicas para medir ansiedad el OFT, el EPM y el LDT en días diferentes. Los n utilizados se pueden ver en la tabla 9.

Diseño experimental 4			
Genotipo	SERT doble het		
	OFT	EPM	LDT
SERT het	13	13	7
TRPV1 het	6	6	9
SERT-het TRPV1-het	14	14	5

**Tabla 9:** Número de ratones (n) usados por genotipo TRPV1 het, SERT het y SERT het-TRPV1 het, para evaluación de fenotipo ansioso.

#### 3.4.5 Evaluación del comportamiento ansioso de ratones SERT KO con tratamiento farmacológico

Además, se usaron animales con genotipos SERT het y SERT KO, para evaluar el fenotipo ansioso, y junto al grupo control de animales SERT WT y se les administró el antagonista TRPV1 CPZ en una dosis de 2 mg/Kg de manera I.P. En otra cohorte de animales de los mismos genotipos se les administró vehículo (VEH). El OFT se realizó a los 30 minutos post inyección.

Diseño experimental 5		
Genotipo	SERT KO GRUPOS	
	OFT (VEH)	OFT (CPZ)
SERT WT	11	11
SERT het	10	12
SERT KO	11	11

**Tabla 10 :** Número de ratones (n) usados por genotipo SERT WT, SERT het y SERT KO y tratamiento con CPZ, para evaluación de fenotipo ansioso.

### **3.5 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos y la generación de los gráficos fueron realizados con el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) y los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Para los datos de comportamiento, la significación estadística entre el control y los grupos tratados con agonistas y/o antagonistas, se evaluó mediante la prueba ANOVA de una vía. Se realizaron comparaciones post hoc utilizando la prueba de Tukey y se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efecto de agonistas 5-HT<sub>2c</sub>R sobre las conductas del tipo ansiosas en ratones WT

Primero, se evaluó si la administración I.P aguda de mCPP y MK212, un agonista no selectivo y otro selectivo de 5-HT<sub>2c</sub>R, respectivamente, a dosis de 1 mg/kg, tenían generan un impacto sobre las conductas del tipo-ansiosas en ratones WT mediante la batería de pruebas comportamentales que incluyeron el OFT, el EPM y el LDT.

- **OFT**

En el OFT, se observaron diferencias significativas al comparar los ratones WT de control con los tratados con mCPP. Estos últimos pasaron significativamente menos tiempo en el centro de la arena en comparación con el grupo de control (figura 9B izquierda, WT vehículo 19.1% ± 3.5 vs WT mCPP 6.9% ± 1.1, p= 0.0114). Además, el número de veces que este grupo de animales visitó el centro fue significativamente menor en comparación con el grupo de control (figura 9B centro, WT vehículo 22.8 ± 2.3 vs WT mCPP 12.3 ± 1.9, p=0.0398). En cuanto a la actividad locomotora, no se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos (figura 9B derecha, WT vehículo 1911 ± 98.8 cm vs WT mCPP 1718 ± 163.5 cm, p= 0.8746). La Figura 9A muestra trazos representativos de esta prueba.

Los ratones del grupo III, tratados con MK212, pasaron significativamente menos tiempo en el área central de la arena en comparación al grupo control (figura 9B izquierda, WT vehículo 19.1 % ± 3.5 vs WT MK212 7.6 % ± 1.7, p=0.0188). Además, visitaron significativamente menos veces el área central de la arena en comparación al grupo salino (figura 9B centro, WT vehículo 22.8 ± 2.3 vs WT MK212 12.2 ± 2.1, p=0.0305). Respecto a la actividad locomotora, al ser comparada con el control salino, no se observaron diferencias significativas (figura 9B derecha, WT vehículo 1911 cm ± 98.8 vs WT MK212 1825 cm ± 110.4, p= 0.9914).



Los ratones al ser pretratados con el antagonista selectivo de 5-HT<sub>2c</sub>R SB242084, el efecto ansiogénico de MK212 (grupo IV) no fue observado, por lo que no se detectaron diferencias significativas respecto al grupo control, en los parámetros de tiempo en el centro (figura 9B izquierda, WT vehículo 19.1 % ± 3.5 vs WT MK212+SB242084 22.7% ± 3.3, p=0.8564). Respecto a la frecuencia en el centro de la arena, se observaron diferencias estadísticamente significativas ya que los ratones tratados con MK212 y SB242084 entraron un mayor número de veces al centro (figura 9B centro, WT vehículo 22.8 ± 2.3 vs WT MK212+SB242084 38.6 ± 3.3, p=0.0005), por lo que el efecto ansiogénico de MK212 no se observa. En cuanto a la actividad locomotora se observaron diferencias estadísticamente significativas (figura 9B derecha, WT vehículo 1911 cm ± 98.8 vs WT MK212+SB242084 2563.0 cm ± 189.6, p=0.015). Por otro lado, se observaron diferencias significativas cuando se comparó el grupo IV con los ratones tratados con mCPP (WT MK212+SB242084 22.7 % ± 3.3 vs WT mCPP 6.9% ± 1.1, p=0.0011) y con MK212 (WT MK212+SB242084 22.7 % ± 3.3 vs WT MK212 7.6% ± 1.7 p=0.0019) en el tiempo que pasaban en el centro, indicando la efectividad del pretratamiento con SB242084 en revertir los efectos ansiogénicos de MK212 y mCPP.

Finalmente, los ratones pretratados con SB242084 y posterior inyección intraperitoneal de vehículo (grupo V) no mostraron diferencias significativas respecto a su grupo control, en los parámetros de tiempo en el centro (figura 9C izquierda, WT vehículo 19.1 % ± 3.5 vs WT SB242084 15.4 % ± 2.5, p=0.8616). Por el contrario, si mostraron diferencias en la frecuencia en el centro (figura 9B centro, WT vehículo 22.8 ± 2.3 vs WT SB242084 33.9 ± 2.9, p=0.0284) y también en la distancia recorrida (figura 9B derecha, WT vehículo 1911 cm ± 98.8 vs WT MK212+SB242084 2693.0 cm ± 165.5, p=0.0034).

- **EPM**

En el EPM los animales del grupo II (mCPP) permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos comparados con los animales control (figura 9 C izquierda, WT vehículo 26.1 % ± 3.4 vs WT mCPP 13.1 % ± 2.2, p= 0.1008), pero la diferencia no llegó a ser significativa. En cuanto al número

de visitas a los brazos abiertos (figura 9C centro, WT vehículo  $18 \pm 1.2$  vs WT mCPP  $17.7 \pm 3.2$ ,  $p > 0.9999$ ) y a la actividad locomotora (WT vehículo  $1493 \pm 189$  vs WT mCPP  $1123 \pm 134$ ,  $p=0.2434$ ), los animales del grupo II no tuvieron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el control ( $p > 0.05$ ). En la figura 9 A podemos ver los trazos representativos de esta prueba.

Los animales del grupo III (WT MK212) pasaron significativamente menos tiempo en los brazos abiertos que los animales control (WT vehículo  $26.1 \% \pm 3.4$  vs WT MK212  $11.4 \% \pm 2.8$ ,  $p=0.0321$ ). El número de visitas a los brazos abiertos (WT vehículo  $18 \pm 1.3$  vs WT MK212  $11.4 \pm 1.5$ ,  $p=0.2354$ ) no fue distinto al grupo control ni al resto de los grupos con otros tratamientos ( $p > 0.05$ ). La actividad locomotora no cambió significativamente al ser comparada con el control (WT vehículo  $1493 \pm 189$  vs WT MK212  $1037 \pm 70.8$ ,  $p=0.0942$ ).

El grupo IV, el cual fue pretratado con el antagonista selectivo de 5-HT<sub>2c</sub>R SB242084 30 minutos antes de una dosis aguda de MK212, mostró un tiempo de exploración en los brazos abiertos similar al grupo I (vehículo), es decir, se perdió el efecto ansiogénico del MK212 ( $p > 0.05$ ) (ver figura 9C izquierda, WT vehículo  $26.1 \% \pm 3.4$  vs WT MK212+SB242084  $23.7\% \pm 3.1$ ,  $p=0.9896$ ). Respecto a la frecuencia de entrada a los brazos abiertos, los animales tratados con MK212 + SB22084, no presentaron diferencias significativas al ser comparados con el grupo control (ver figura 9C centro, WT vehículo  $18 \pm 1.3$  vs WT MK212+SB242084  $20.6 \pm 1.9$ ,  $p=0.9373$ ). Del mismo modo, la distancia recorrida tampoco cambió significativamente al comparar el grupo control (ver figura 9C derecha, WT vehículo  $1493 \pm 189$  vs WT MK212+SB242084  $1692 \pm 91.5$ ,  $p=0.8092$ ). Por el contrario, al compararlos con el grupo de ratones tratados con mCPP, si se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida (figura 9C derecha, WT mCPP  $1123 \pm 134$  vs WT MK212+SB242084  $1692.0 \pm 91.5$ ,  $p=0.0252$ ). También se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comprar el grupo IV con los ratones tratados con MK212 (figura 9C derecha, WT MK212  $1037 \pm 70.8$  vs WT MK212+SB242084  $1692 \pm 91.5$ ,  $p=0.0071$ ).

El grupo V (SB242084+vehículo) mostró un mayor tiempo en los brazos abiertos en comparación con el grupo tratado con mCPP (WT SB242084 33.9 %  $\pm$ 5.7 vs WT mCPP 13.1 %  $\pm$ 2.2,  $p=0.0026$ ). Del mismo modo, el grupo V presentó diferencias significativas con el grupo tratado con MK212 (WT SB242084 33.9 %  $\pm$ 5.7 vs WT MK212 11.4 %  $\pm$ 2.8,  $p= 0.0005$ ). En cambio, al compararlo con el grupo control (figura 9C izquierda, WT SB242084 33.9 %  $\pm$ 5.7 vs WT salino 26.1 %  $\pm$  3.4,  $p=0.5424$ ), no se observaron diferencias significativas.

En cuanto a la frecuencia de entradas a los brazos abiertos, no se observaron diferencias significativas al comparar el grupo WT SB22084 con el grupo control (figura 9C centro, WT vehículo 18  $\pm$  1.3 vs WT SB242084 18.8  $\pm$  3.5,  $p = 0.9995$ ), tampoco se detectaron diferencias significativas con el resto de los grupos.

En relación con la actividad locomotora del grupo V (WT SB242084), no se observó significancia estadística al compararla con el control (figura 9C derecha, WT vehículo 1493  $\pm$  189 vs WT SB242084 1535.0  $\pm$  113.4  $p = 0.9994$ ), y tampoco presentó diferencias significativas con respecto a los demás grupos.

- **LDT**

Durante la prueba de exploración LDT, los animales tratados con mCPP (grupo II) pasaron significativamente menos tiempo en el compartimento iluminado (ver figura 9D izquierda, WT vehículo 168 s  $\pm$  11,3 s vs WT mCPP 80.1 s  $\pm$  20.6,  $p=0.0006$ ) y significativamente más tiempo en el compartimento oscuro (figura 9D centro, WT vehículo 132 s  $\pm$  11.3 vs WT mCPP 221 s  $\pm$  21,  $p=0.0006$ ), al ser comparado con el grupo control, lo que indica un efecto ansiogénico de la droga.

Respecto a la actividad locomotora registrada en la cámara iluminada, los ratones tratados con mCPP no se observaron diferencias significativas al compararlos con el grupo control (ver figura 9D derecha, WT vehículo 1232 cm  $\pm$  86 vs WT mCPP 780.8 cm  $\pm$  192.5,  $p=0.1057$ ).

En cambio, recorrieron una distancia significativamente menor (WT mCPP 780.8 cm  $\pm$  192.5 vs WT MK212+ SB242084 1356 cm  $\pm$  148, p=0.028) al ser comparado con el grupo IV, tratado con SB242084 y posterior dosis aguda de MK212 y con el grupo V, inyectados con SB242084 y posteriormente vehículo) (WT mCPP 780.8 cm  $\pm$  192.5 vs WT SB242084 1412 cm  $\pm$  81.6, p= 0.0073).

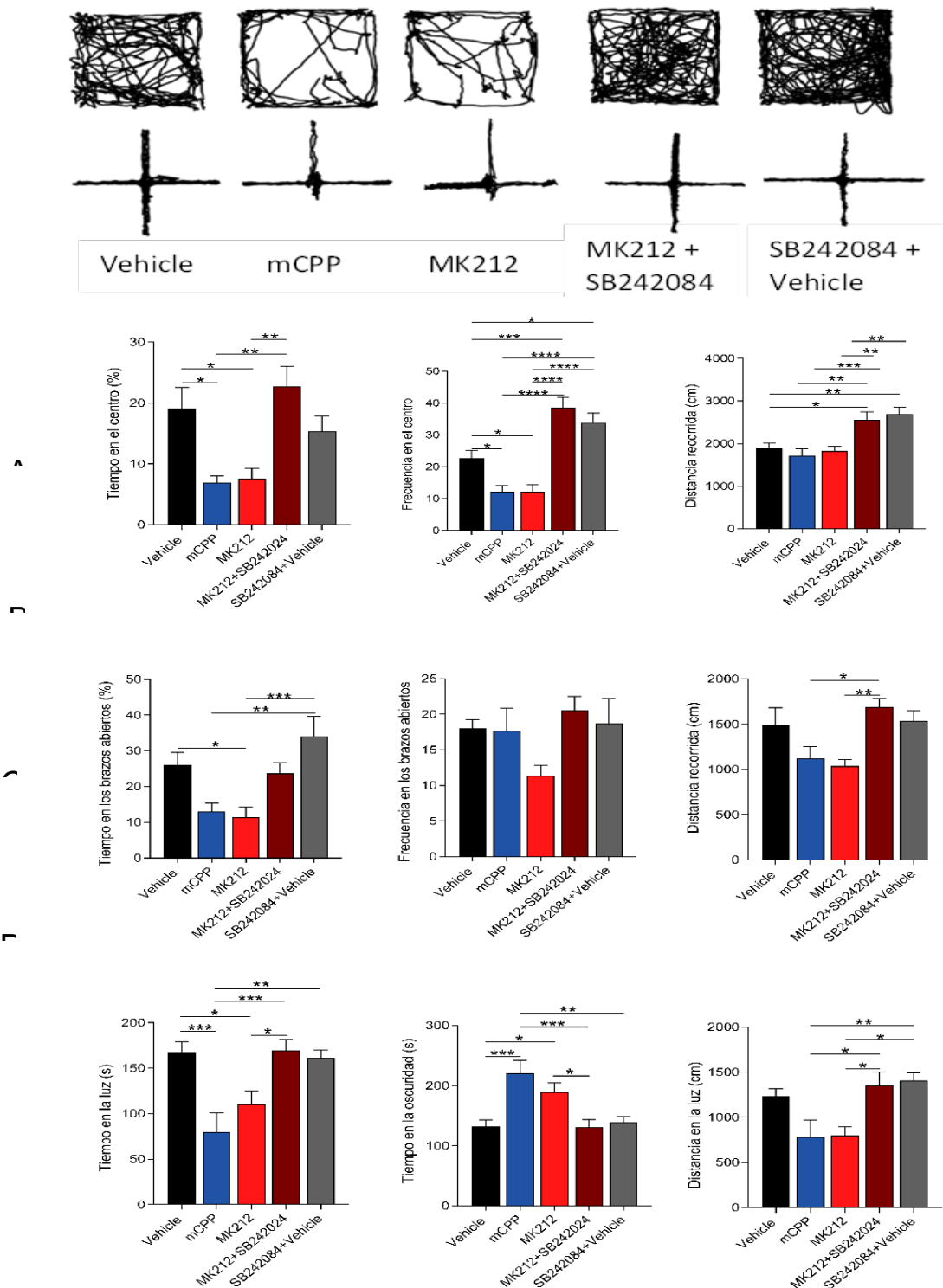
Los animales tratados con MK212 pasaron significativamente menos tiempo en el lado iluminado (WT vehículo 168.0 s  $\pm$  11,3 vs WT MK212 110.4 s  $\pm$  14.6, p=0.0402) y más tiempo en el lado oscuro que el grupo control (WT vehículo 132.0 s  $\pm$  11.3 vs WT MK212 189.6 cm  $\pm$  14.6, p= 0.0433), lo que demuestra el efecto ansiogénico del MK212.

Respecto a la distancia recorrida en el lado iluminado, los animales del grupo III, tratados con MK212, no se observaron diferencias significativas (WT vehículo 1232 cm  $\pm$  86 vs 797.0 cm  $\pm$  98.8, p= 0.1501).

En cambio, existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los animales del grupo IV tratados con SB242084 + MK212 con el grupo de MK212 (WT MK212 797  $\pm$  98.8 vs 1356.0 cm  $\pm$  148.1, p=0.0435) y con los del grupo V, tratados con SB242084 y posterior inyección de vehículo (WT MK212 797 cm  $\pm$  98.8 vs 1412 cm  $\pm$  81.6, p= 0.013).

Por el contrario, el efecto ansiogénico del MK212 se pierde con el pretratamiento del antagonista selectivo de 5-HT<sub>2c</sub>R SB242084, ya que los animales pasaron un tiempo significativamente mayor en la cámara iluminada de la caja de luz/oscuridad (WT salino 168 s  $\pm$  11.3 vs WT SB242084+MK212 169.4 s  $\pm$  12.6, p>0.999) y un menor tiempo en el lado oscuro (WT salino 132.0 s  $\pm$  11.3 vs 130.9 s  $\pm$  14.6, p>0.999). Respecto a la distancia recorrida en el lado iluminado, el grupo IV recorrió una distancia significativamente mayor (WT MK212 + SB242084 1356.0 cm  $\pm$  148.1) comparado con los grupos tratados con mCPP (780.8 cm  $\pm$  192.5, p=0.028) y con MK212 (797.0 cm  $\pm$  98.8, p=0.0435. Al comprar con el control no se observaron diferencias (WT salino 1232  $\pm$  86 cm vs WT MK212 + SB242084 1356.0  $\pm$  148.1 , p=0.9612).

En cuanto a los animales tratados con SB242084 + vehículo (WT SB242084), no se observan diferencias significativas en cuanto al tiempo en el lado claro al ser comparados con el grupo control (figura 9D, WT vehículo  $168.0 \text{ s} \pm 11.3$  vs WT SB242084  $161.1 \pm 8.9$ ,  $p= 0.9952$ ) ni a la distancia recorrida en el lado claro (WT vehículo  $1232.0 \text{ cm} \pm 86.0$  vs WT SB242084  $1412.0 \text{ cm} \pm 81.6$ ,  $p= 0.8359$ ). Por el contrario, si se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida en el lado iluminado al comparar los animales tratados con SB242084 + vehículo con el grupo tratado con mCPP (WT mCPP  $780.8 \text{ cm} \pm 192.5$  vs WT SB242084  $1412.0 \text{ cm} \pm 81.6$ ,  $p= 0.0073$ ) y con MK212 (WT MK212  $797.0 \text{ cm} \pm 98.8$  vs WT SB242084  $1412.0 \text{ cm} \pm 81.6$ ,  $p= 0.013$ ).



**Figura 9. Los agonistas 5-HT<sub>2c</sub>R mCPP y MK212 producen un efecto ansiogénico.** Trazos representativos del OFT (arriba) y del EPM (abajo) (A). Los ratones WT fueron evaluados en la prueba de campo abierto (B), laberinto elevado en cruz (C) y caja de luz oscuridad (D). La administración intraperitoneal de mCPP o MK212 produce un efecto ansiogénico. El tratamiento previo con el antagonista 5-HT<sub>2c</sub>R SB242084 o la administración conjunta con CPZ restauró el comportamiento. Las barras representan la media ± SEM. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, ANOVA de una vía, seguido de una prueba post hoc de Tukey (Vehículo n=8-11, mCPP n=8-10, MK212 n=7-10, MK212+SB242084 n=8-9, SB242084+vehículo n=9-13).

#### **4.2 Efecto del antagonista TRPV1 CPZ sobre las conductas ansiosas mediadas por los 5-HT<sub>2c</sub>R.**

Con el fin de evaluar la contribución que tiene TRPV1 sobre las respuestas ansiosas mediadas por el 5-HT<sub>2c</sub>R, se administró a ratones WT el antagonista competitivo de TRPV1 CPZ junto al agonista del 5-HT<sub>2c</sub>R MK212 y al agonista 5-HT<sub>2c/β</sub>R mCPP y se realizó la batería de test conductuales para medir niveles de ansiedad.

- **OFT**

En el OFT, la frecuencia de entrada de los animales WT tratados con CPZ (2 mg/kg) a la región central de la arena fue significativamente mayor que el grupo control (figura 10 B centro, WT vehículo  $22.8 \pm 2.3$  vs WT CPZ  $34.4 \pm 1.7$   $p=0.0343$ ), lo que significa que CPZ tuvo un efecto ansiolítico. Además, cuando CPZ fue coadministrada junto con mCPP, el efecto ansiogénico de mCPP se perdió, (figura 10 B centro WT vehículo  $22.8 \pm 2.3$  vs WT CPZ+mCPP  $21.1 \pm 3.5$ ,  $p=0.9688$ ). La coadministración de CPZ junto a MK212, también eliminó el efecto ansiogénico de MK212, dejándolo en niveles similares al grupo WT inyectado con salino (figura 10 B centro, WT vehículo  $22.8 \pm 2.3$  vs WT CPZ+MK212  $19.4 \pm 2.9$ ,  $p=0.8052$ ).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas respecto al tiempo en el área central de la arena de OFT entre los animales WT tratados con CPZ (2 mg/kg) y su respectivo grupo control (figura 9B izquierda, WT vehículo  $19.1 \pm 3.5$  vs WT CPZ  $15.8 \pm 2.2$ ,  $p=0.8004$ ), ni con el grupo de individuos tratados con la coadministración de CPZ junto a los agonistas mCPP (figura 10 B izquierda WT vehículo  $19.1 \pm 3.5$  vs WT CPZ+mCPP  $15.5 \pm 2.0$ ,  $p=0.7677$ ) y MK212 (figura 10 B izquierda WT vehículo  $19.1 \pm 3.5$  vs WT CPZ+MK212  $14.2 \pm 2.2$ ,  $p=0.5453$ ) respectivamente.

Además, se observó un aumento significativo en la actividad locomotora basal al comparar al grupo control con el grupo inyectado con CPZ (figura 10 B derecha, WT vehículo  $1911.0 \pm 98.8$  vs WT CPZ  $2514 \pm 86.9$ ,  $p=0.0136$ ). Así mismo, se observó un aumento significativo de la distancia recorrida al comparar los ratones inyectados con CPZ vs los WT CPZ+ mCPP (WT CPZ  $2514.0 \pm 86.9$  vs CPZ+mCPP  $1891.0 \pm 203.1$ ,  $p=0.0126$ ). Sin embargo, no se detectaron

diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (WT vehículo  $1911.0 \pm 98.8$  vs WT mCPP+CPZ  $1891.0 \pm 203.1$   $p= 0.9996$  figura 9B derecha) ni (WT vehículo  $1911.0 \pm 98.8$  vs WT MK212+ CPZ  $2406.0 \pm 130.2$   $p= 0.0954$ ).

- **EPM**

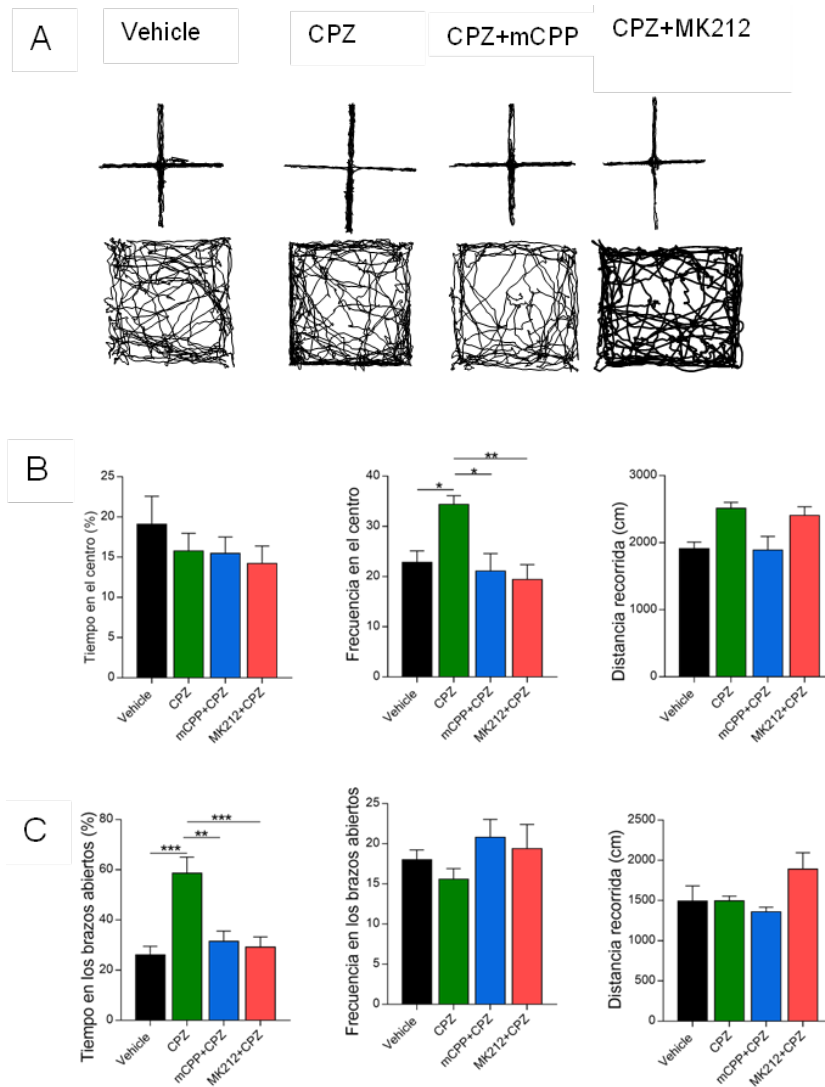
En el EPM al grupo de animales a los cuales se les administró CPZ, pasó un tiempo significativamente mayor en los brazos abiertos en comparación al grupo control (figura 10 C izquierda, WT vehículo  $26.1 \pm 3.4$  vs WT CPZ  $58.6 \pm 6.4$ ,  $p=0.0002$ ), es decir tuvo un efecto ansiolítico. Por el contrario, al coadministrar CPZ junto con mCPP, el efecto ansiogénico de mCPP no fue observado. Lo mismo cuando se codministró junto con MK212. Al comparar el grupo CPZ con al grupo al cual se les coadministró CPZ junto a mCPP (figura 10 C izquierda, WT CPZ  $58.6 \pm 6.4$  vs WT CPZ+ mCPP  $31.5 \pm 4.1$   $p=0.0011$ ) y al grupo coinyectado con MK212 (WT CPZ  $58.6 \pm 6.4$  vs WT MK212 + CPZ  $29.1 \pm 4.1$ ,  $p=0.0004$ ). Esto indica que, al igual que en el OFT, el efecto ansiogénico de ambos agonistas 5-HT<sub>2c</sub>R se pierde en presencia de la administración del antagonista de TRPV1.

Respecto al número de entradas a los brazos abiertos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (figura 10 C centro, WT vehículo  $18.0 \pm 1.3$  vs WT CPZ  $15.6 \pm 1.3$ ,  $p= 0.8449$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar WT mCPP  $20.8 \pm 2.3$  con WT CPZ  $15.6 \pm 1.3$  ( $p= 0.7750$ ) ni entre WT vehículo y WT MK212 + CPZ  $19.4 \pm 2.9$  ( $p=0.9635$ ).

En relación con la distancia recorrida en el EPM, no se observaron diferencias significativas al comparar todos los grupos. Las comparaciones entre los grupos, ya sea entre los grupos vehículo y CPZ ( figura 10 C derecha, WT vehículo  $1493 \text{ cm} \pm 189$  vs WT CPZ  $1496.0 \text{ cm} \pm 58.3$  ,  $p > 0.9999$ ), con el vehículo y mCPP+CPZ ( WT vehículo  $1493 \text{ cm} \pm 189$  vs WT mCPP+CPZ  $1362 \text{ cm} \pm 56$ ,  $p = 0.9179$ ), con el vehículo y MK212+CPZ (WT vehículo  $1493 \text{ cm} \pm 189$  vs WT MK212 + CPZ  $1891.0 \text{ cm} \pm 203.1$  ,  $p = 0.2277$ ), mCPP+CPZ ( WT CPZ  $1496.0 \text{ cm} \pm 58.3$  vs  $1362 \text{ cm} \pm 56$  vs ,  $p = 0.9128$ ), CPZ y MK212+CPZ (WT CPZ  $1496.0 \text{ cm} \pm 189 \text{ cm}$  vs WT MK212 + CPZ  $1891.0 \text{ cm} \pm 203.1$ ,  $p = 0.2336$ ), y mCPP+CPZ y MK212+CPZ (WT MK212 + CPZ  $1891.0 \text{ cm} \pm$



203.1 vs WT mCPP + CPZ 1362 cm  $\pm$  1891 cm,  $p = 0.0636$ ), no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en la distancia recorrida ( $p > 0.05$  en todas las comparaciones). Estos resultados indican que, en términos de actividad locomotora medida por la distancia recorrida, los diferentes tratamientos no afectaron de manera significativa el comportamiento de los ratones en el EPM.



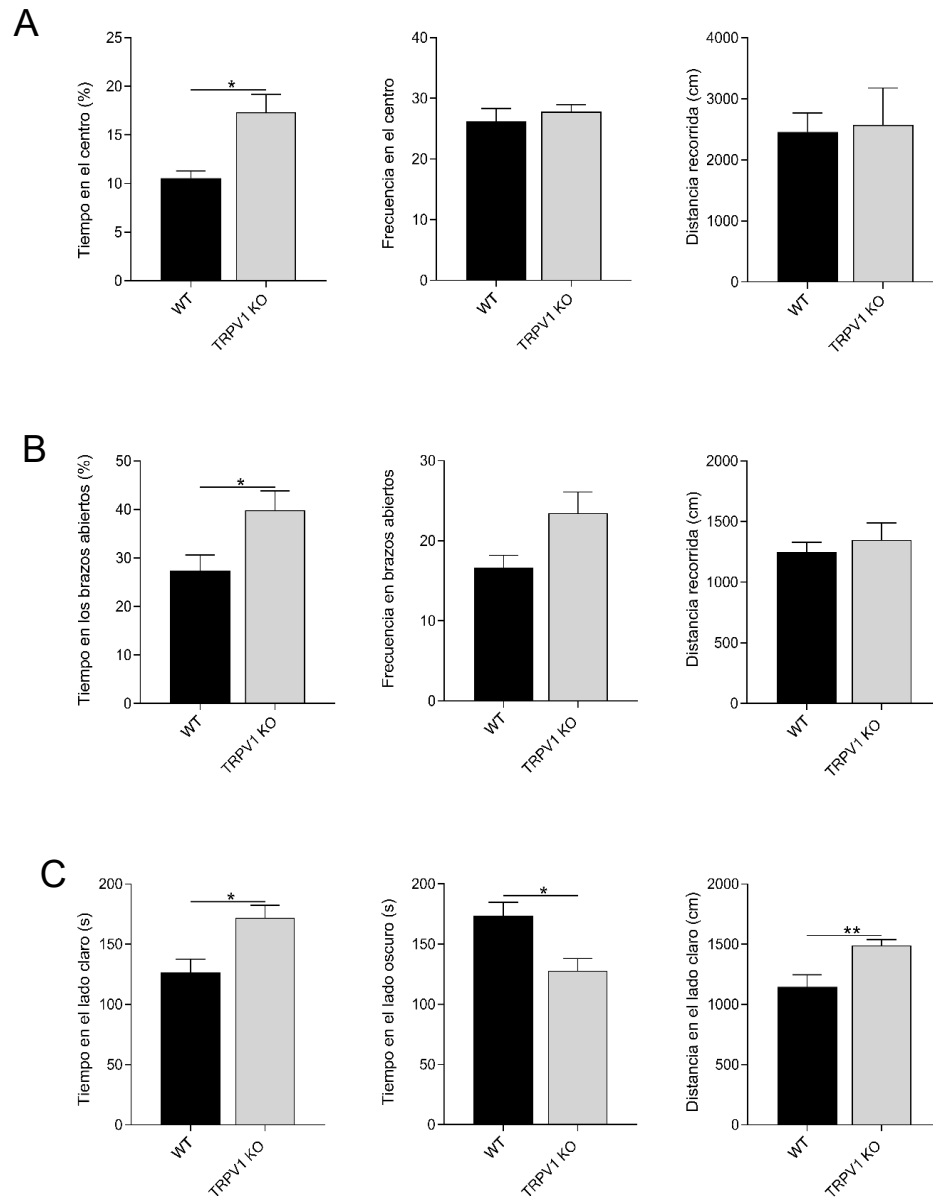
**Figura 10. El antagonista TRPV1 CPZ bloquea el efecto ansiogénico de mCPP y MK212 en ratones WT.** Trazos representativos (A). Los ratones WT fueron evaluados en la prueba de campo abierto (B) y en el laberinto elevado en cruz (C). Barras representan la media  $\pm$  SEM (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ANOVA de una vía, seguido del test post hoc de tukey (vehículo  $n=11$ , CPZ  $n=11$ , mCPP+CPZ  $n=10$ , MK212+CPZ  $n=10$ ).

#### **4.3 Efecto de ausencia de TRPV1 en las conductas del tipo ansiosas y de sociabilización.**

Para evaluar las conductas ansiosas, en OFT, se compararon dos grupos de ratones, WT (grupo de control) y TRPV1 KO. Los ratones TRPV1 KO exhibieron un tiempo significativamente mayor en el centro del campo abierto en comparación con los ratones WT (ver figura 11 A, WT  $10.6 \% \pm 0.8$  vs TRPV1 KO  $17.3 \% \pm 1.8$ ,  $p = 0.0147$ ), indicando un comportamiento ansiolítico. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia con la que los ratones visitaron el centro (WT  $26.2 \pm 2.2$  vs TRPV1 KO  $27.8 \pm 1.2$ ,  $p = 0.4787$ ) ni en la actividad locomotora basal (WT  $2457.0 \text{ cm} \pm 313.6$  vs TRPV1 KO  $2575.0 \text{ cm} \pm 602.9$ ,  $p = 0.8834$ ) entre ambos grupos. Estos resultados sugieren que los ratones TRPV1 KO pueden presentar una exploración menos ansiosa en el entorno del campo abierto en comparación con los ratones WT.

En el EPM, los ratones TRPV1 KO pasaron un mayor tiempo en los brazos abiertos en comparación con los ratones control (ver figura 11 B, WT  $27.4 \% \pm 0.7417$  vs TRPV1 KO  $39.9 \% \pm 3.9$ ,  $p = 0.0352$ ), indicando un comportamiento ansiolítico. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de entrada a los brazos abiertos (TRPV1 WT  $16.7 \pm 1.5$  vs TRPV1 KO  $23.5 \pm 2.6$ ,  $p = 0.0923$ ) ni en la distancia recorrida entre ambos grupos (TRPV1 WT  $1251 \text{ cm} \pm 77.4$  vs TRPV1 KO  $1349.0 \text{ cm} \pm 139.1$ ,  $p = 0.5454$ ). Estos resultados sugieren que los ratones TRPV1 KO pueden exhibir una menor aversión al espacio abierto en el Laberinto Elevado en Cruz en comparación con los ratones WT.

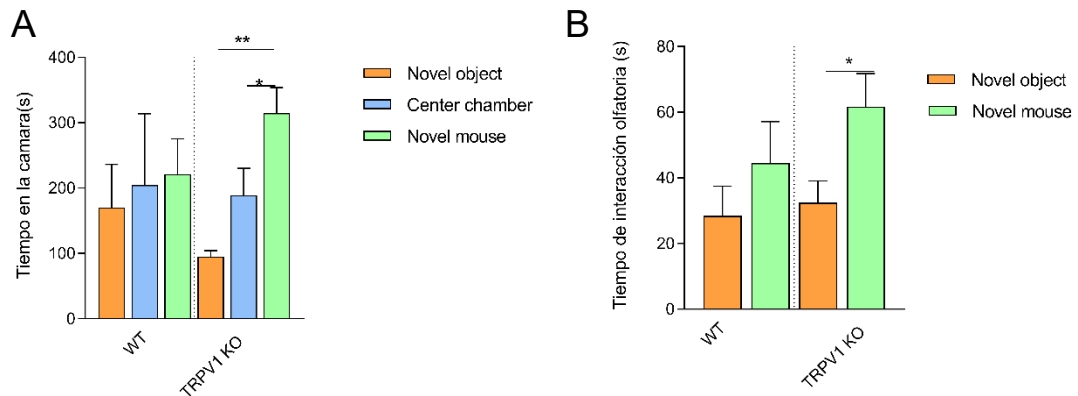
En la Caja de luz oscuridad, se observaron diferencias significativas en el tiempo pasado en el lado iluminado, siendo significativamente mayor en los ratones TRPV1 KO en comparación con el grupo control (ver figura 11 C, WT  $126.6 \text{ s} \pm 10.9 \text{ s}$  vs TRPV1 KO  $172.1 \text{ s} \pm 10.2 \text{ s}$ ,  $p = 0.0342$ ). Además, la distancia recorrida en el lado claro fue significativamente mayor en los ratones TRPV1 KO en comparación con los ratones control (WT  $1146 \text{ cm} \pm 100$  vs TRPV1 KO  $1492 \text{ cm} \pm 47.2$ ,  $p = 0.0058$ ). Estos resultados sugieren que los ratones TRPV1 KO pueden mostrar una mayor exploración y menor aversión al área iluminada en el LDT en comparación con los ratones control.



**Figura 11. Fenotipo conductual en animales WT y TRPV1 KO.** Ratones WT y TRPV1 KO fueron evaluados en el test de campo abierto (A), laberinto elevado en cruz (B) y en el test de luz oscuridad (C). Barras representan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , T-Student (WT n=3-6, TRPV1 KO n=6-10).

### Efecto de la ausencia de TRPV1 en conducta social

En la prueba de interacción social no se observaron diferencias significativas en el tiempo de exploración en las tres cámaras en los ratones WT (Figura 12A izquierda, objeto 170.3 s  $\pm$  65.9, centro 204.7 s  $\pm$  109.2 y social 221.1 s  $\pm$  54.4,  $p= 0.9021$ ). Por otra parte, los ratones TRPV1 KO mostraron mayor preferencia a la cámara con el ratón social objetivo que a la cámara con el objeto solo (Figura 12A derecha, objeto 95.3 s  $\pm$  8.8 vs social 314.9 s  $\pm$  38.8,  $p= 0.0013$ ). Además del tiempo de exploración en cada cámara, se evaluó el tiempo de conducta olfatoria al objeto vacío y al objeto con el ratón social objetivo dentro. Se pudo observar que los ratones WT no tuvieron preferencia por el ratón social objetivo respecto al objeto vacío (Figura 12B izquierda, objeto 28.5 s  $\pm$  9.1 vs social 44.6 s  $\pm$  12.6,  $p= 0.3571$ ). Sin embargo, los ratones TRPV1 KO presentaron una preferencia mayor en olfatear al ratón social objetivo (Figura 12B derecha, objeto 32.4 s  $\pm$  6.6 vs social 61.7 s  $\pm$  10.06,  $p= 0.0410$ ).



**Figura 12. Test de interacción social en animales TRPV1 KO.** Ratones WT y TRPV1 KO fueron evaluados en el test de sociabilidad de tres cámaras, y se obtuvo el tiempo de exploración en cada cámara (A) y el tiempo de interacción con el objeto vacío y el objeto con el ratón objetivo adentro (B). Barras representan la media  $\pm$  SEM (WT n=3-6, TRPV1 KO n=6-10).

#### **4.4 Efecto de ausencia de TRPV1 sobre las conductas del tipo ansiosas mediadas por receptores 5-HT<sub>2c</sub>R.**

Para determinar si TRPV1 era un efector necesario para mediar las conductas dependientes de 5-HT<sub>2c</sub>R, se usaron ratones TRPV1 KO y se les administró los agonistas 5-HT<sub>2c</sub>R y se realizaron las tres pruebas para evaluar ansiedad (ver figura 13 A trazos representativos).

- **OFT**

El grupo de animales TRPV1 KO administrados con mCPP, no arrojó diferencias significativas al ser comparados con el grupo control en los parámetros evaluados para medir ansiedad como tiempo en el área central (figura 13 B izquierda, TRPV1 KO vehículo 17.3 % ± 1.8 vs TRPV1 KO mCPP 15.9 % ± 2.7, p=0.9107), ni con el grupo tratado con el agonista selectivo MK212 (TRPV1 KO vehículo 17.3 % ± 1.8 vs TRPV1 KO MK212 16.8 % ± 2.8, p=0.9755). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la frecuencia con que visitaban el centro al comparar los grupos de animales TRPV1 KO control con los TRPV1 KO tratados con mCPP (figura 13 B centro, TRPV1 KO vehículo 27.8 ± 1.2 vs TRPV1 KO mCPP 24.4 ± 2.1, p=0.3151) ni tampoco con los animales TRPV1 KO tratados con MK212 (TRPV1 KO vehículo 27.8 ± 1.2 vs TRPV1 KO MK212 27.5 ± 1.5, p=0.9898). Finalmente, no se observaron cambios en la actividad locomotora al comparar entre los grupos (figura 13 B derecha, TRPV1 KO vehículo 1891.0 cm ± 123.4 vs TRPV1 KO mCPP 2285.0 cm ± 243.3, p=0.2826) ni (TRPV1 KO vehículo 1891.0 cm ± 123.4 vs TRPV1 KO MK212 2292.0 cm ± 149.2, p=0.2720).

- **EPM**

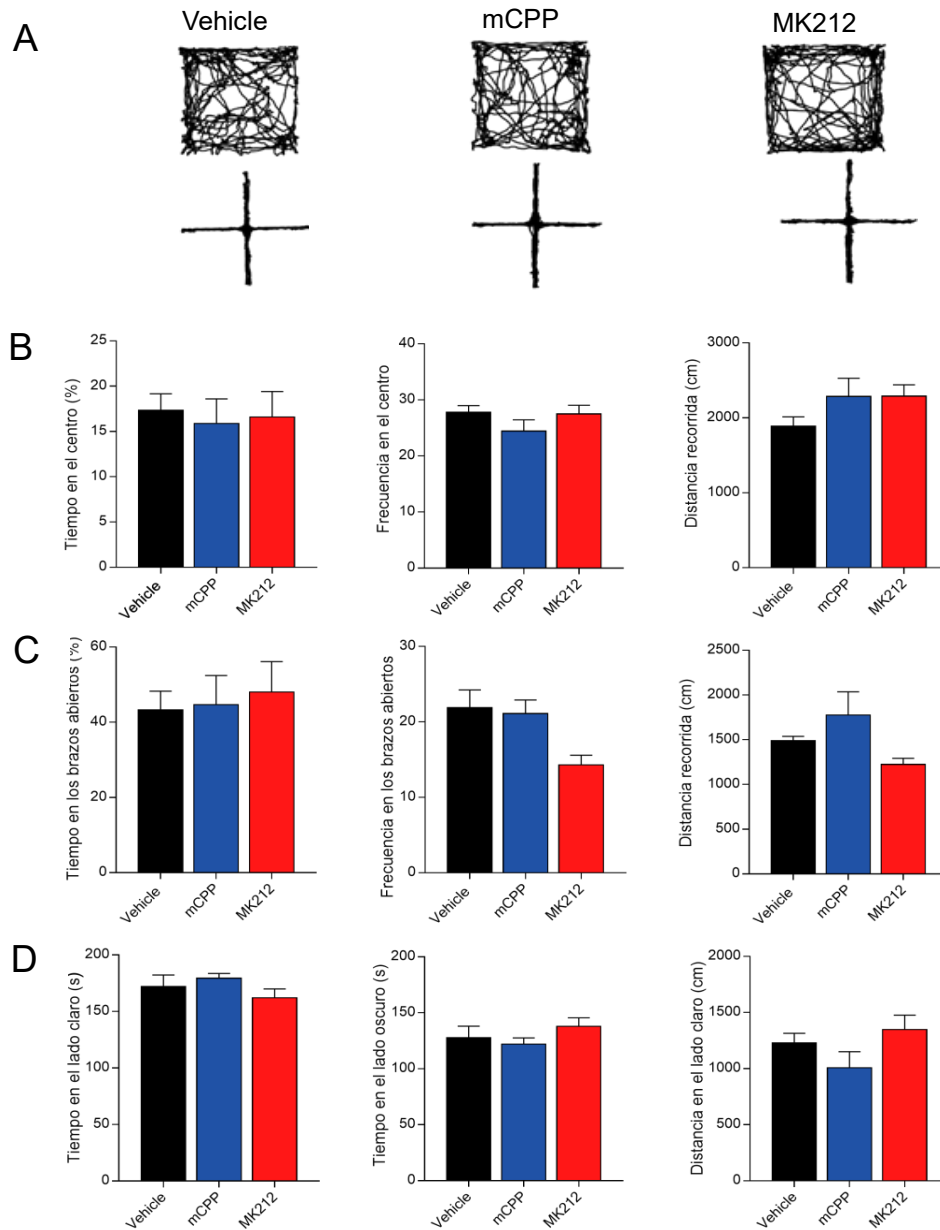
El grupo de animales TRPV1 KO tratados con mCPP no exhibió diferencias significativas en comparación con el grupo de control en los parámetros evaluados en el laberinto elevado en cruz para medir la ansiedad. En cuanto al tiempo en los brazos abiertos, no se observaron diferencias significativas entre el grupo TRPV1 KO vehículo y el grupo TRPV1 KO mCPP (figura 13 C izquierda, 43.3 % ± 4.9 vs 44.7 % ± 7.8, p=0.9903), ni con el grupo tratado con el agonista selectivo MK212 (43.3 % ± 4.9 vs 48.0 % ± 8.1, p=0.8871).

De manera similar, la frecuencia de entrada a los brazos abiertos no mostró diferencias significativas entre los grupos TRPV1 KO vehículo y TRPV1 KO mCPP (figura 13 C centro,  $21.9 \pm 2.4$  vs  $21.1 \pm 1.8$ ,  $p=0.9557$ ), ni con el grupo tratado con MK212 ( $21.9 \pm 2.4$  vs  $16.0 \pm 1.7$ ,  $p=0.1054$ ). Respecto a la distancia recorrida, no se detectaron diferencias significativas entre el grupo TRPV1 KO vehículo y TRPV1 KO mCPP (figura 13 C derecha,  $1492.0 \pm 47.2$  vs  $1776.0 \pm 259.3$ ,  $p=0.9903$ ), ni con el grupo tratado con MK212 ( $1492.0 \pm 47.2$  vs  $1224.0 \pm 68.1$ ,  $p=0.8871$ ).

Además, al comparar directamente los grupos TRPV1 KO mCPP y TRPV1 KO MK212, tampoco se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida (TRPV1 KO mCPP  $1776.0 \text{ cm} \pm 259.3$  vs TRPV1 KO MK212  $1224.0 \text{ cm} \pm 68.1$ ,  $p=0.0772$ ). Asimismo, no se detectaron diferencias significativas al comparar TRPV1 KO vehículo  $1492.0 \text{ cm} \pm 47.2$  con TRPV1 KO mCPP  $1776.0 \text{ cm} \pm 259.3$  ( $p=0.9903$ ) ni entre TRPV1 KO vehículo  $1492.0 \text{ cm} \pm 47.2$  y TRPV1 KO MK212  $1224.0 \text{ cm} \pm 68.1$  ( $p=0.8871$ ).

- **LDT**

Los animales TRPV1 KO tratados tanto con mCPP como con MK212 no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo de control (TRPV1 KO vehículo) en los parámetros analizados en la caja de luz oscuridad para medir la ansiedad. Con relación al tiempo en el lado iluminado, no se observaron diferencias significativas entre el grupo TRPV1 KO vehículo y el grupo TRPV1 KO mCPP (figura 13 D izquierda,  $172.1 \text{ s} \pm 10.2$  vs  $179.3 \text{ s} \pm 4.3$ ,  $p=0.9903$ ), ni con el grupo tratado con el agonista selectivo TRPV1 KO MK212 ( $172.1 \text{ s} \pm 10.2$  vs  $162.2 \text{ s} \pm 7.7$ ,  $p=0.8871$ ). De manera similar, la distancia recorrida en el lado claro no mostró diferencias significativas entre los grupos TRPV1 KO vehículo y TRPV1 KO mCPP (figura 13 D derecha,  $1230.0 \text{ cm} \pm 83.7$  vs  $1008.0 \text{ cm} \pm 143.8$ ,  $p=0.5634$ ), ni con el grupo tratado con TRPV1 KO MK212 ( $1230.0 \text{ cm} \pm 83.7$  vs  $1347.0 \text{ cm} \pm 127.8$ ,  $p=0.7277$ ). Además, al comparar directamente los grupos TRPV1 KO mCPP y TRPV1 KO MK212, tampoco se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida en el lado claro ( $1008.0 \text{ cm} \pm 143.8$  vs  $1347.0 \text{ cm} \pm 127.8$ ,  $p=0.2670$ ).



**Figura 13. Se requiere TRPV1 para el efecto ansiogénico de mCPP o MK212.** Trazos representativos (A). Los ratones TRPV1 KO fueron evaluados en las pruebas de campo abierto (B), laberinto elevado en cruz (C) y en la caja de luz oscuridad (D). La administración intraperitoneal de mCPP o MK212 no tiene efecto ansiogénico. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey (vehículo n=8-10, mCPP n=3-10, MK212 n=9-10).

#### 4.5 Efecto administración aguda de CPZ en ratones SERT KO.

Para determinar si se rescata el fenotipo ansioso del ratón SERT KO con una administración aguda de CPZ, en los 3 genotipos SERT KO, SERT het y SERT WT, se evaluaron las conductas del tipo ansiosas a través de la prueba OFT.

- **OFT**

Los tres grupos de animales SERT KO, SERT het y SERT WT fueron inyectados con salino y con CPZ (grupos de animales distintos). Al analizar la influencia del genotipo en un gráfico por separado, se ve claramente el fenotipo ansioso del ratón SERT KO. Los animales SERT KO inyectados con salino pasan significativamente menos tiempo en el centro cuando se les compara con los animales WT (figura 14 A izquierda, SERT WT  $10.4\% \pm 1.3$  vs SERT KO  $3.6\% \pm 0.6$ ,  $p=0.0009$ ), al igual que los animales SERT het inyectados con salino (figura 14 A, SERT WT  $10.4 \pm 1.3$  vs SERT het  $5.4 \pm 1.4$ ,  $p=0.0146$ ). No se observaron diferencias significativas en el tiempo que pasaron los animales en el centro cuando se compararon los animales SERT het vs SERT KO (figura 14 A, SERT het  $5.4 \pm 1.481$  vs SERT KO  $3.6 \pm 0.5973$ ,  $p=0.5419$ ).

En cuanto a la frecuencia en el centro, los animales SERT WT visitaron un número significativamente mayor de veces el área central de la arena en comparación a los animales SERT het (figura 14 A centro, SERT WT  $18.3 \pm 2.13$  vs SERT het  $10.0 \pm 1.7$ ,  $p= 0.0052$ ) y a los SERT KO (figura 14 A centro, SERT WT  $18.3 \pm 2.13$  vs SERT KO  $7.9 \pm 1.1$ ,  $p= 0.0004$ ). No se registraron diferencias significativas en la frecuencia con la que los ratones SERT het y SERT KO visitaron el centro (figura 14 A centro, SERT het  $10.0 \pm 1.7$  vs SERT KO  $7.9 \pm 1.1$ ,  $p= 0.6548$ ).

Finalmente, en lo que respecta a la actividad locomotora no se observaron diferencias significativas entre los 3 genotipos (figura 14 A derecha, SERT WT  $1694.0 \text{ cm} \pm 106.4$   $p= 0.7965$ , SERT het  $1386.0 \text{ cm} \pm 108.9$ ,  $p= 0.1022$ , SERT KO  $1482.0 \text{ cm} \pm 91.3$ ,  $p= 0.3212$ ).

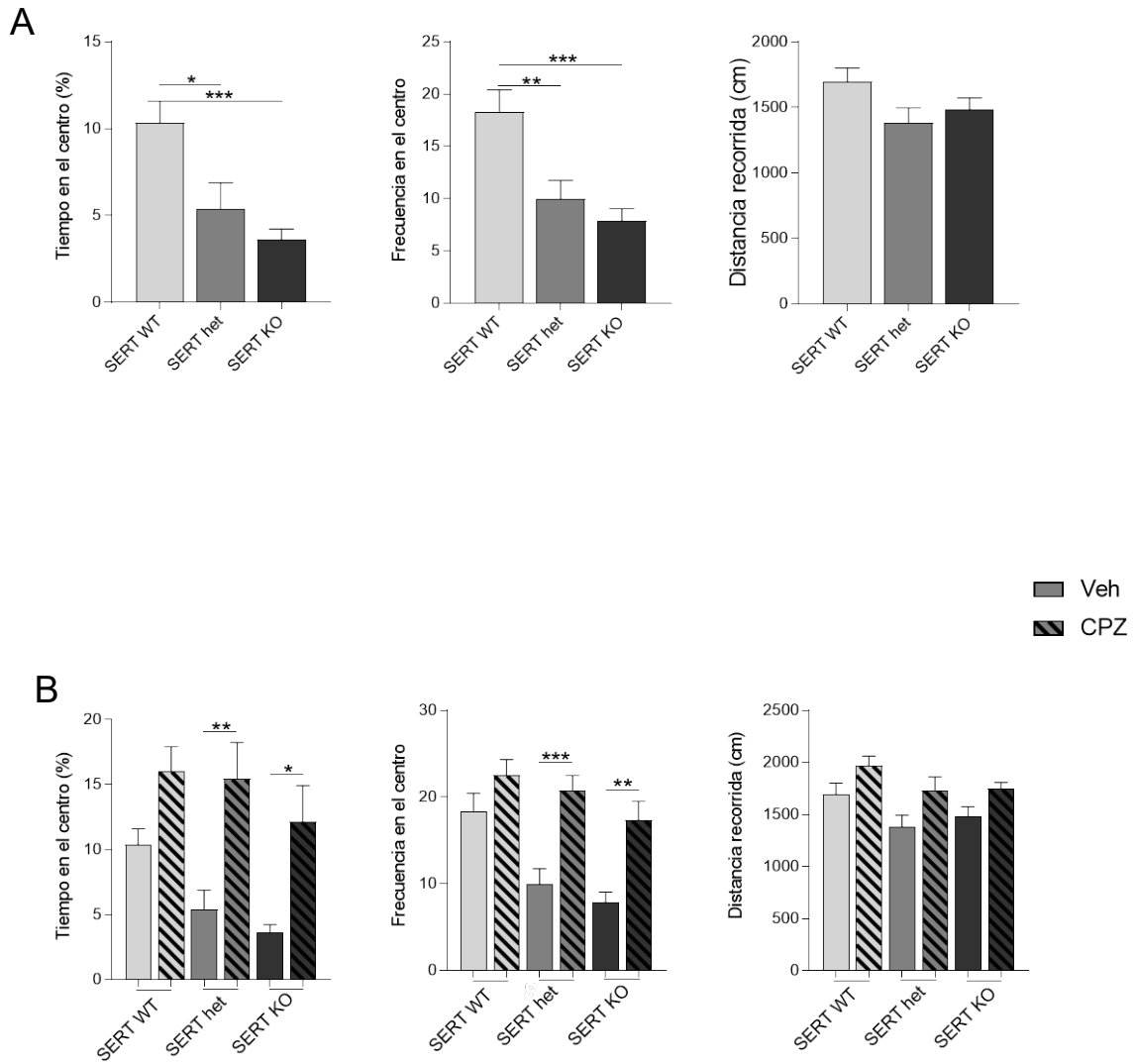
Al comparar los animales SERT WT inyectados con salino respecto a los SERT WT inyectados con CPZ, no se observaron diferencias significativas al comparar ambos tratamientos en cuanto



al tiempo en el centro (figura 14 B izquierda,  $10.4 \% \pm 1.3$  vs  $16.0 \% \pm 1.9$ ,  $p=0.436$ ), frecuencia en el centro (figura 14 B centro,  $18.3 \pm 2.13$  vs  $22.6 \pm 1.8$ ,  $p=0.8061$ ) y distancia recorrida (figura 14 B derecha,  $1694.0 \text{ cm} \pm 106.4$  vs  $1971.0 \text{ cm} \pm 88.9$ ,  $p=0.5010$ ).

En cuanto a los animales SERT het inyectados con CPZ visitaron un número de veces significativamente mayor el centro que los animales SERT het a los que se les administró salino ( $10.0 \pm 1.7$  vs  $20.8 \pm 1.7$ ,  $p= 0.001$ ). En cuanto al tiempo que pasaron en el centro de la arena ( $5.4 \% \pm 1.5$  vs  $15.4 \% \pm 2.8$ ,  $p=0.098$ ) finalmente respecto a la distancia recorrida no se observan diferencias entre los grupos ( $138.06 \text{ cm} \pm 108.9$  vs  $1737.0 \text{ cm} \pm 124.2$ ,  $p= 0.2204$ )

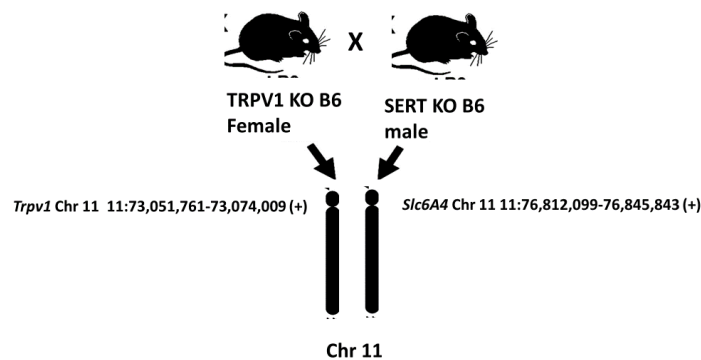
Finalmente, los animales SERT KO que recibieron CPZ de manera intraperitoneal, éstos pasaron un tiempo significativamente mayor en el área central del OFT respecto a los animales SERT KO que recibieron salino ( $3.6 \% \pm 0.6$  vs  $12.2 \% \pm 2.7$ ,  $p=0.0477$ ), en cuanto a la frecuencia en el centro, la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ( $7.9 \pm 1.1$  vs  $17.4 \pm 2.1$ ,  $p=0.0056$ ). No se observaron diferencias en cuanto a la distancia recorrida ( $1482.0 \text{ cm} \pm 91.3$  vs  $1747.0 \text{ cm} \pm 59.2$ ,  $p=0.6439$ ).



**Figura 14. CPZ revierte las conductas del tiempo ansiosas en el ratón SERT KO en el test de campo abierto.** Los ratones SERT WT, SERT het y SERT KO fueron evaluados en la prueba de campo abierto (A). La administración I.P de CPZ produce un efecto ansiolítico en los ratones SERT het y SERT KO (B). Barras representan la media  $\pm$  SEM.  $p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ , two way ANOVA (SERT WT vehículo  $n=11$ , SERT WT CPZ  $n=11$ , SERT het vehículo  $n=10$ , SERT het CPZ  $n=12$ , SERT KO vehículo  $n=11$ , SERT KO CPZ  $n=11$ ).

#### 4.6 Evaluación del fenotipo conductual en ratones SERT het /TRPV1 het.

Con el objetivo de evaluar si la ausencia de TRPV1 afectaba la generación conductas ansiosas, en un modelo de ansiedad específicamente el ratón SERT KO, se intentó generar el ratón doble KO SERT y TRPV1, pero solo fue posible llevarlo a nivel de doble heterocigoto, ya que ambos genes se encuentran en loci muy cercanos en el cromosoma 11 (ver figura 13). La tasa de éxito por simple recombinación es muy baja, lo que dificulta obtener el doble KO en esas condiciones. En consecuencia, se logró llegar únicamente a nivel de doble heterocigoto SERT het/TRPV1 het.



**Figura 15.** Esquema generación ratón doble heterocigoto SERT het/TRPV1 het.

A este nuevo ratón SERT het/TRPV1 het se le evaluó conductualmente a través del test de campo abierto, laberinto elevado en cruz y la caja de luz oscuridad. Los controles usados fueron el ratón SERT het y el TRPV1 het.

- **OFT**

Los animales SERT het/ TRPV1 het presentaron un fenotipo ansiolítico en esta prueba. Se observaron diferencias significativas respecto al tiempo en que los animales visitaron el centro de la arena al compararlo con los animales SERT het (Figura 16 A izquierda, SERT het  $8.2\% \pm 1.3$  vs SERT het-TRPV1 het  $17.4\% \pm 2.2$ ,  $p=0.008$ ). En cuanto a los animales TRPV1 het no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 16 A izquierda, TRPV1 het  $14.7\% \pm 3.3$  vs SERT het/TRPV1 het  $17.4\% \pm 2.2$ ,  $p=0.7398$ ), ni al comparar entre los grupos

TRPV1 het y SERT het (figura 16 A izquierda, TRPV1 het  $14.7\% \pm 3.3$  vs SERT het  $8.2\% \pm 1.3$ ,  $p=0.2151$ ).

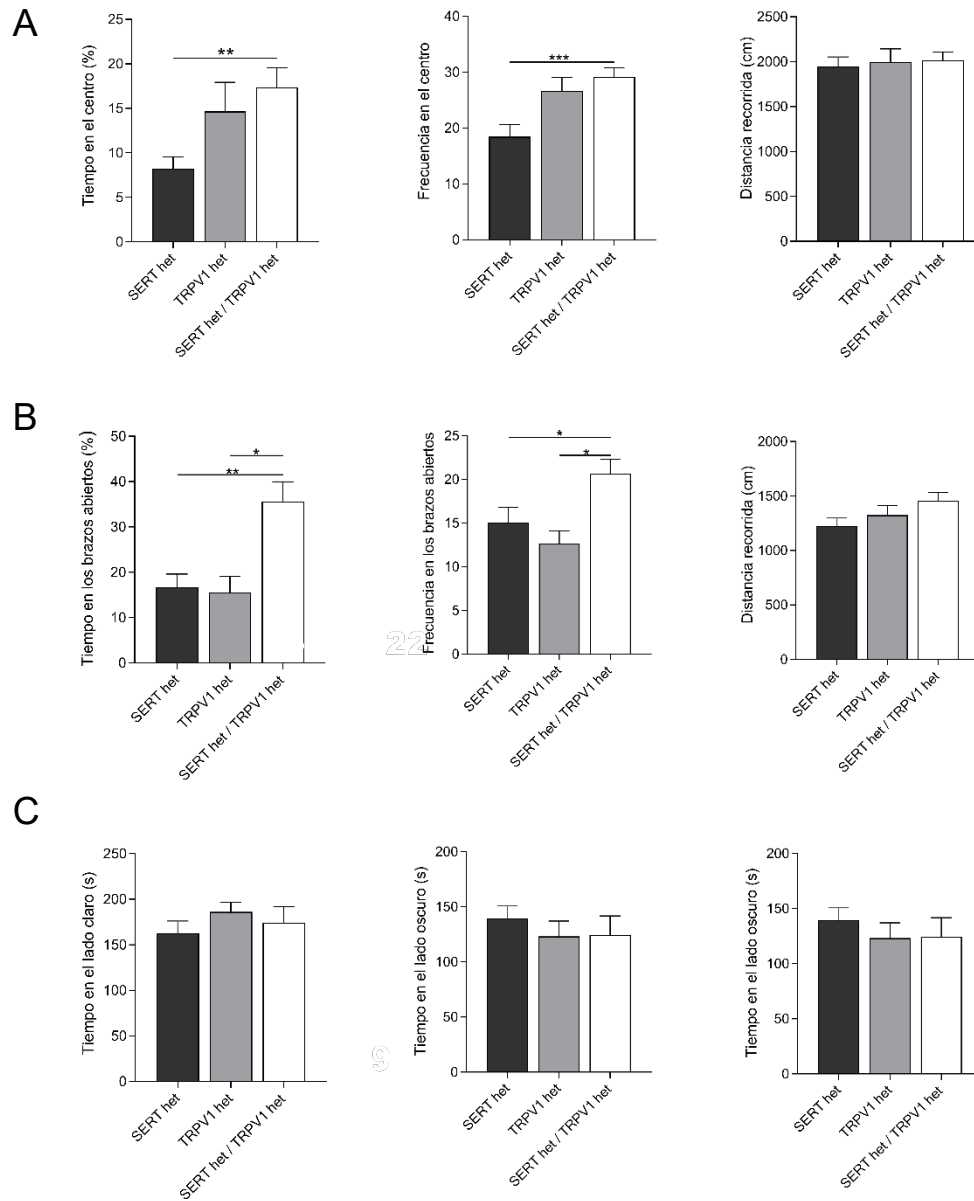
Respecto a la frecuencia en el centro, los animales SERT het/TRPV1 het visitaron un número de veces significativamente mayor al compararlo con los animales SERT het (figura 16 A centro, SERT het  $18.5 \pm 2.2$  vs SERT het/TRPV1 het  $29.1 \pm 1.6$ ,  $p=0.0009$ ), respecto a los animales TRPV1 het no se detectaron diferencias significativas (figura 16 A centro , TRPV1 het  $26.7 \pm 2.4$  vs SERT het/TRPV1 het  $29.1 \pm 1.6$ ,  $p=0.7396$ ), ni tampoco al comparar a los grupos TRPV1 het y SERT het entre si (figura 16 A centro , SERT het  $18.5 \pm 2.2$  vs TRPV1 het  $26.7 \pm 2.4$   $p=0.0532$ ).

En cuanto a la actividad locomotora basal esta no arrojó diferencias significativas entre los tres genotipos evaluados (figura 16 A derecha, SERT het  $1945.0 \text{ cm} \pm 107.2$   $p= 0.9567$ , TRPV1 het  $1995.0 \text{ cm} \pm 147.8$   $p= 0.0709$ , SERT het TRPV1 het  $2017.0 \text{ cm} \pm 90.5$ ,  $p= 0.5591$ ).

- **EPM**

En la prueba laberinto elevado en cruz, los animales SERT het/ TRPV1 het, pasaron un mayor tiempo en los brazos abiertos en comparación al grupo SERT het (figura 16 B izquierda, SERT het  $16.7\% \pm 2.8\%$  vs SERT het/ TRPV1 het  $35.6\% \pm 4.4\%$ ,  $p=0.0025$ ) y al grupo de animales TRPV1 het, (figura 16 B, TRPV1 het vs  $15.6\% \pm 3.5$  vs  $35.6\% \pm 4.4$ ,  $p=0.0122$ ). En cambio, no se observaron diferencias entre los genotipos SERT het y TRPV1 het (figura 16 B, SERT het  $16.7\% \pm 2.8\%$  vs TRPV1 het,  $p= 15.6\% \pm 3.5\%$ ,  $p=0.9835$ ).

No se observaron diferencias significativas en el número de entradas a los brazos abiertos entre los grupos TRPV1 het y SERT het (figura 16 B centro, SERT het  $15.1 \pm 1.7$  vs TRPV1 het  $12.7 \pm 1.4$ ,  $p=0.6918$ ). Por el contrario, entraron un mayor número de veces a los brazos abiertos al ser comparados con ambos controles, SERT het (figura 16 B, SERT het  $15.1 \pm 1.7$  vs SERT het/ TRPV1 het  $20.7 \pm 1.661$ ,  $p=0.0474$ ) y con los animales TRPV1 het (figura 16 B, TRPV1 het  $12.7 \pm 1.4$  vs SERT het TRPV1 het  $20.7 \pm 1.7$ ,  $p=0.0236$ ).



**Figura 16. Fenotipo conductual en animales SERT het, TRPV1 het y SERT het/TRPV1 het.** Los animales fueron evaluados en el test de campo abierto (A), laberinto elevado en cruz (B) y en el test de luz oscuridad (C). Barras representan la media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ANOVA de 1 vía, seguido del test posthoc Tukey (SERT het  $n = 7-13$ , TRPV1 het  $n = 6-9$ , SERT het- TRPV1 het  $n = 5-14$ ).

En cuanto a la distancia recorrida, no se detectaron diferencias significativas al comparar los tres grupos (figura 16 B derecha, SERT het 1226.0 cm  $\pm$  73.5 p= 0.7375, TRPV1 het 1325.0 cm  $\pm$  88.5 p= 0.0709, SERT het TRPV1 het 1459.0 cm  $\pm$  74.0 p= 0.5591).

- **LDT**

En la Caja luz oscuridad, no se observaron diferencias significativas al comparar los tres grupos en el tiempo pasado en el lado iluminado (figura 16 C izquierda, SERT het 162.8 s  $\pm$  13.3, p=0.5540, TRPV1 het 186.2 s  $\pm$  10.4, p= 0.8356, SERT het TRPV1 het 174.5 s  $\pm$  17.3 p= 0.8494). De igual modo, no se encontraron diferencias significativas en la distancia recorrida en el lado claro entre los tres grupos (figura 16 C derecha, SERT het 1205.0 cm  $\pm$  73.2 p= 0.9976, TRPV1 het 1214.0 cm  $\pm$  82.4 p= 0.3533, SERT het TRPV1 het 1032.0 cm  $\pm$  99,6 p= 0.3547).

## 5. DISCUSIÓN

El presente estudio aporta nueva evidencia de que el receptor 5-HT<sub>2c</sub>R regula la activación del TRPV1, contribuyendo así a la comprensión de los mecanismos moleculares detrás de las conductas ansiosas en ratones. La relevancia de comprender con mayor profundidad y detalle la etiología de los trastornos de ansiedad radica principalmente en la elevada prevalencia que tiene hoy en día en nuestra sociedad (Bandelow & Michaelis, 2015).

En primer lugar, cabe recordar que la ansiedad representa un estado de elevado *arousal* (activación cerebral, vigilia) que resulta en una aumentada vigilancia en ausencia de una amenaza (Davis et al., 2010). Pese a que individuos sanos pueden experimentar ansiedad esporádicamente, la ansiedad puede considerarse un trastorno cuando es persistente, debilitante, e interfiere negativamente en las labores diarias de un individuo (Robinson et al., 2019).

En este trabajo, utilizamos paradigmas conductuales que evalúan conductas tipo-ansiosas, las cuales se basan en la etología de los ratones. Estas pruebas enfrentan al roedor a un conflicto innato, el cual consiste en explorar nuevos ambientes o evitar espacios abiertos, donde podrían ser más vulnerables a amenazas ambientales. En las pruebas conductuales que evalúan conductas tipo-ansiosas, los ratones con fenotipo ansioso tienden a estar más tiempo explorando o detenidos en las zonas seguras del aparato conductual (File et al., 2004; Prut & Belzung, 2003).

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan evidencia que sugiere que la activación simultánea e indirecta de los 5-HT<sub>2c</sub>R y los receptores TRPV1 puede generar acciones de tipo ansiogénicas en ratones. Esto es consistente con la literatura existente, que respalda la participación de ambos receptores en la regulación de las conductas ansiosas (Aguiar et al., 2009; Casarotto et al., 2012; Heisler et al., 2007b; Kimura et al., 2009; Rubino et al., 2008; Terzian et al., 2014) indicando la posible implicación del sistema endocanabinoide.

La presencia de endovanilloides/endocannabinoides, como la anandamida que actúa como agonista de TRPV1, sugiere la probabilidad de que ambos receptores, 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1, interactúen para regular los comportamientos ansiosos (ver con más detalle en apartado 6.2).

Si bien la mayoría de los estudios han examinado las funciones del 5-HT<sub>2c</sub>R y del TRPV1 por separado, hay indicios que sugieren su posible participación conjunta en la modulación de las respuestas conductuales. La presencia de estos receptores en áreas relacionadas con la ansiedad, como la corteza prefrontal, el complejo amigdaloides y el hipocampo, sugiere la posibilidad de modular las reacciones de ansiedad (Abramowski et al., 1995; Cavanaugh et al., 2011; Clemett et al., 2000; Cristino et al., 2006; Kimura et al., 2009). Además, su coexpresión en el trigémino puede aportar nuevos conocimientos sobre la conexión entre estos receptores y la percepción del dolor, contribuyendo a una comprensión más completa de sus funciones en el contexto de la ansiedad (Loyd et al., 2011).

#### 5.1 Activación de 5-HT<sub>2c</sub>R y angiogénesis

El primer hallazgo significativo de este estudio fue demostrar que la activación farmacológica de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R, a través de la administración sistémica de mCPP y el MK212, induce comportamientos ansiogénicos en ratones WT en el OFT, EPM y LDT. Estos efectos fueron bloqueados con la administración del antagonista SB244084, también de manera sistémica.

Estos hallazgos coinciden con lo descrito en la literatura, que ha documentado consistentemente la asociación entre la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R y las respuestas conductuales ansiosas en roedores (Cornélio & Nunes-de-Souza, 2007; De Mello Cruz et al., 2005; Griebel et al., 1991; Kennett & Curzon, 1988; Nunes-de-Souza et al., 2008) y humanos (Benjamin et al., 1997; Charney et al., 1987; Lowy & Meltzer, 1988).

En modelos animales utilizados para testear ansiedad, se ha descrito que la administración sistémica de mCPP está asociada con una disminución de la actividad locomotora, según se documenta en la literatura (Fone et al., 1998; Lucki, 1991), en donde se ha demostrado que es



debido a que se reducen los niveles de dopamina en el estriado y N acc (Aloyo et al., 2009). Si bien en nuestros datos no se observaron diferencias significativas en la actividad locomotora entre los grupos WT y aquellos tratados tanto con MK212 como con mCPP. Estos efectos observados sobre la ansiedad no pueden atribuirse a un efecto inespecífico de las drogas sobre la actividad motora, ya que ninguno de los dos compuestos probados en nuestro caso afectó a la locomoción en la prueba de campo abierto, lo cual coincide con lo observado en otros estudios previos (Sant'Ana et al., 2019b).

Resulta crucial considerar que los resultados de la administración sistémica de los ligandos en nuestro estudio indican la necesidad de comprender las áreas específicas del cerebro donde estos compuestos ejercen sus efectos. La literatura respalda el hecho de que la activación de los 5-HT<sub>2C</sub>R localizados en la amígdala es esencial para desencadenar comportamientos ansiosos. Investigaciones anteriores han demostrado que la infusión local de mCPP en la amígdala induce respuestas ansiosas, a diferencia de cuando se infunde en el hipocampo dorsal o ventral (Cornélio & Nunes-de-Souza, 2007). Contrariamente, puede tener un efecto ansiolítico cuando se microinyecta en el dPAG (Nunes-de-Souza et al., 2008).

Estudios adicionales han señalado que la activación de los 5-HT<sub>2C</sub>R por MK212, tanto de manera sistémica como en la BLA, genera respuestas ansiosas en ratas, según se evidenció en el OF y el EPM (De Mello Cruz et al., 2005). Investigaciones más recientes han bloqueado 5-HT<sub>2C</sub>R localmente en la amígdala y estimulado neuronas serotoninérgicas, revelando el efecto ansiogénico producido por la estimulación de la actividad serotoninérgica en el LDT, efecto que se bloquea con el antagonismo 5-HT<sub>2C</sub> en la amígdala (Matthiesen et al., 2020). Por otro lado, bloquear los 5-HT<sub>2C</sub>R localmente en la PAG dorsal no atenuó la respuesta ansiogénica inducida por la administración aguda de fluoxetina o imipramina, proporcionando evidencia indirecta sobre el papel del 5-HT<sub>2C</sub>R en la amígdala (Vilela-Costa et al., 2021).

El pretratamiento con el antagonista selectivo SB242084 revirtió los comportamientos ansiosos en ratones WT, este resultado es consistente con la literatura que sugiere que los antagonistas

tienen un efecto ansiolítico (Martin et al., 2002). Sin embargo, se observaron aumentos en la actividad locomotora en los grupos tratados con el antagonista SB242084, coherente con hallazgos previos (Jensen et al., 2010; Millan, 2005).

Es importante destacar que el SB-242084 demostró un efecto ansiolítico cuando se administró de manera independiente. Esto sugiere que los 5-HT<sub>2c</sub>R están estimulados de manera tónica por la serotonina endógena o presentan actividad constitutiva, favoreciendo así la generación de comportamientos asociados con la ansiedad (Navailles et al., 2013).

Una limitación que debemos destacar en nuestro estudio es la ausencia de la utilización de un agonista inverso. Como se expuso en la introducción, es ampliamente reconocido que los 5-HT<sub>2c</sub>R exhiben niveles significativos de actividad constitutiva, es decir, tienen la capacidad de activar la señalización intracelular sin la presencia del agonista endógeno (Aloyo et al., 2009; De Deurwaerdère, Bharatiya, et al., 2020). En este contexto, es plausible considerar que el SB-242084 podría estar actuando como un agonista inverso, un modo de acción previamente documentado para este fármaco (Aloyo et al., 2009). Esto concuerda con la literatura que señala que aproximadamente el 85% de los ligandos previamente caracterizados como "antagonistas" exhiben actividad agonista inversa (Aloyo et al., 2009; Kenakin, 2006).

En resumen, comprender la regulación de la ansiedad requiere comprender los aspectos fundamentales de la complejidad del sistema serotoninérgico y la dualidad funcional que muestran los 5-HT<sub>2c</sub>R. En un contexto clínico, el empleo de la agomelatina, un antidepresivo que actúa como antagonista del 5-HT<sub>2c</sub>R, produce un impacto favorable sobre la ansiedad (Millan, 2022). Por el contrario, la administración de lorcaserina, un agonista selectivo del 5-HT<sub>2c</sub>R empleado en el tratamiento de la obesidad, está relacionada con un aumento de la ansiedad y los síntomas depresivos. En conclusión, la versatilidad de los 5-HT<sub>2c</sub>R y la convergencia de evidencia experimental y clínica refuerzan su papel crucial en la regulación de la ansiedad.

## 6.2 Interacción entre los Receptores 5-HT<sub>2C</sub>R y TRPV1 en la modulación de la ansiedad.

Habiendo establecido que la activación de los receptores 5-HT<sub>2C</sub>R es capaz de inducir comportamientos ansiosos, surgió la pregunta de si el receptor TRPV1 juega un papel esencial en este proceso. Para investigar esto, realizamos dos sets de experimentos para evaluar el papel de TRPV1 en las respuestas ansiosas mediadas por 5-HT<sub>2C</sub>R.

En el primer set de experimentos, utilizamos ratones WT y administramos el antagonista selectivo de TRPV1, CPZ, junto con los agonistas 5-HT<sub>2B/C</sub> mCPP y 5-HT<sub>2C</sub> MK212. Descubrimos que la coadministración de CPZ con mCPP o MK212 eliminó los efectos ansiogénicos inducidos por los agonistas del receptor 5-HT<sub>2C</sub>R. Además, la administración de CPZ por si sola generó un efecto ansiolítico, contrario a los agonistas del receptor 5-HT<sub>2C</sub>R, pero este efecto se revirtió al coadministrar CPZ con MK212 o mCPP (ver figura 10).

El efecto ansiolítico de la administración de CPZ implica una estimulación tónica del TRPV1 en condiciones basales. Este hallazgo coincide con investigaciones anteriores que indican una disminución de la ansiedad tras el bloqueo farmacológico sistémico inducido por la CPZ (Faraji et al., 2017; Kasckow et al., 2004) o la delección genética del TRPV1 (Marsch et al., 2007; Rossi et al., 2012). Los efectos de la administración sistémica de la CPZ parecen ser relativamente más débiles, ya que solo se evidencian en ciertos parámetros del EPM, como se observó en los estudios de Faraji y Kasckow, de acuerdo con nuestros hallazgos. Por el contrario, la influencia ansiolítica de la CPZ administrada mediante inyecciones localizadas en determinadas regiones del cerebro, como el hipocampo ventral (Santos et al., 2008), el PAG dorsolateral (Campos & Guimarães, 2009; Terzian et al., 2009) y la corteza prefrontal (Aguar et al., 2009 ; Rubino et al., 2008), es más consistente y claro. Además, los estudios indican que las microinyecciones de AA-5-HT, un antagonista endógeno del TRPV1, en el BLA desencadenan efectos ansiolíticos (John & Currie, 2012).

La menor potencia del efecto ansiolítico del CPZ por administración sistémica en comparación con la administración intracerebral puede atribuirse a la posible dificultad que representa CPZ,

para atravesar la barrera hematoencefálica y acceder a los lugares de acción cerebrales pertinentes. Aunque recientemente existen investigaciones donde demuestran que CPZ administrada de manera sistémica, atraviesa la barrera hematoencefálica de manera efectiva para alcanzar concentraciones anti-convulsivas en el cerebro de roedores (Gonzalez-Reyes et al., 2013; D. Yang et al., 2019).

La pérdida del efecto ansiolítico de la CPZ al ser coadministrada con mCPP o MK212 sugiere que TRPV1 puede estar implicado en una etapa posterior a la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R.

Para probar nuestra hipótesis, realizamos un experimento clave para evaluar la pérdida del efecto angiogénico de los ligandos 5-HT<sub>2c</sub>R en ratones TRPV1 KO. Esto se confirmó al no observar comportamientos ansiosos en ratones TRPV1 KO después de la administración sistémica única de MK212 o mCPP (ver figura 13). Estos hallazgos revelan una interacción crucial entre los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 en la modulación de las conductas ansiosas.

Además, la ausencia de ansiedad en ratones TRPV1 KO después de la administración de agonistas de 5-HT<sub>2c</sub>R podría sugerir que el calcio, cuya liberación está mediada por TRPV1, podría estar involucrado en la respuesta ansiogénica (Ho et al., 2012; Martins et al., 2014). La falta de este efector podría afectar la transducción de la señal de ansiedad y, por lo tanto, prevenir la aparición de comportamientos ansiosos.

Otra interpretación podría estar relacionada con la cascada de señalización intracelular involucrada en la generación de ansiedad. Se sabe que la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R conduce a la producción de mediadores lipídicos, como endovanilloides/endocannabinoides, que podrían actuar como segundos mensajeros para transmitir la señal de ansiedad (Abdalla et al., 2022; Chang et al., 2000; Pethő & Reeh, 2012; Rosenbaum & Simon, 2007). Sin embargo, la ausencia de TRPV1 podría interferir con esta cascada de señalización, lo que resultaría en la falta de manifestación de conductas ansiosas.

Por otra parte, nuestros resultados indican que los ratones TRPV1 KO muestran un fenotipo ansiolítico (Fig. 11) y mayor sociabilidad (Fig. 12) que los animales WT. El estudio de la ansiedad en el ratón TRPV1 KO ha sido poco explorado. En concordancia con esto, existen solo dos estudios que informan que los ratones TRPV1 KO muestran un fenotipo ansiolítico (Marsch et al., 2007; Rossi et al., 2012). Además del paper de You del 2012 que el ratón TRPV1 KO demuestra conductas anti-depresivas (You et al., 2012). Si bien existen múltiples estudios donde demuestran el efecto ansiolíticos de los antagonistas de TRPV1, los ratones TRPV1 KO han sido objeto de estudio para el dolor, la regulación de la temperatura, entre otros. No se ha profundizado en la investigación del fenotipo ansioso de estos ratones.

En cuanto a la sociabilidad del ratón TRPV1 KO, tampoco existen trabajos. Sin embargo se ha descrito que la aplicación de capsaicina es capaz de disminuir la sociabilidad en ratones WT (Seillier et al., 2013; Seillier & Giuffrida, 2018) , lo que estaría en concordancia con nuestros resultados.

En conjunto, los resultados anteriormente descritos, sugieren un papel relevante de la activación aguda del receptor 5-HT<sub>2c</sub>R en la generación de conductas tipo-ansiosas, donde la actividad del receptor TRPV1 es esencial. Aunque actualmente no se comprende con precisión el mecanismo detrás de la modulación de estas conductas ansiosas, la posibilidad de una interacción indirecta a través de vías de señalización intracelular, mediada por la generación de ligandos endógenos, resulta plausible (Iglesias et al., 2022; Mascarenhas et al., 2013; Micale et al., 2009).

El crosstalk, o interacción cruzada entre sistemas biológicos, es esencial para coordinar procesos fisiológicos y adaptar la respuesta del organismo a cambios internos y externos. Requiere proximidad física entre moléculas o células, compatibilidad de vías de señalización y presencia de receptores compartidos o mediadores comunes. Además, el estado fisiológico y ambiental influye en su ocurrencia. No es necesario que las moléculas o células estén en el mismo tipo celular para que ocurra el crosstalk. En resumen, el crosstalk facilita la comunicación y la integración de sistemas biológicos para coordinar funciones complejas y adaptativas.

La interacción propuesta entre los sistemas 5-HT<sub>2c</sub>R y TRPV1 encuentra respaldo en la conexión de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R con la proteína Gq/11, cuya activación produce diversos mediadores lipídicos, incluyendo endovanilloides y endocannabinoides, que podrían activar a TRPV1 (Micale et al., 2009; Norzé & Maldonado-Vlaar, 2023; Wold et al., 2019). Esta hipótesis se sustenta en observaciones del sistema nervioso periférico, donde otros receptores acoplados a proteína Gq/11, como PAR2, bradicinina B1 y B2, purinérgicos P2, serotonina 5-HT<sub>2</sub> y endotelina (Pethő & Reeh, 2012; Rohacs, 2015a; Rosenbaum & Simon, 2007), activan la cascada de señalización PLC-TRPV1, generando metabolitos lipídicos que pueden activar de manera directa a TRPV1 como el HPETE, AEA (Luchicchi & Pistis, 2012) y el DAG (Woo et al., 2008), los cuales se sugieren como moléculas candidatas que median la activación de TRPV1 por 5-HT<sub>2c</sub>R (ver figura 17). Además, la fosforilación del TRPV1 por la PKC, que se produce río abajo de los receptores mencionados anteriormente, está mediada por el DAG (Rosenbaum & Simon, 2007). El ácido araquidónico, formado por el DAG o la PLA2, también puede estar involucrado en el proceso de activación (Pethő & Reeh, 2012).

La generación de mediadores lipídicos capaces de activar TRPV1 río abajo de la activación de los receptores 5-HT<sub>2c</sub>R podría involucrar tanto a la señalización por la vía canónica mediada por PLC o bien rutas alternativas como la PLA2 o la PLD; estas enzimas pueden desencadenar la liberación de diferentes mediadores lipídicos que pueden afectar la actividad de TRPV1. En el caso de PLA2, además de ser un precursor para AEA, la producción de ácido araquidónico es un precursor de 12-HETE (12-hidroxi-eicosatetraenoico) y N-araquidonil dopamina, ambos con actividad sobre el TRPV1. A su vez, La activación de PLD puede hidrolizar fosfolípidos de membrana para producir fosfatidilcolina y ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es un precursor de otros mediadores lipídicos, como la N-aciletanolamina fosfatidil (NAPE), que a su vez puede convertirse en anandamida mediante la acción de la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD).

Un candidato interesante para este posible cross-talk entre 5-HT<sub>2C</sub> y TRPV1 sería la AEA, propuesto como endocannabinoide/endovaniloide (Ross, 2003; Zygmunt et al., 1999), el cual tiene afinidad tanto por el CB1R como por TRPV1. La AEA podría estar activando a TRPV1 de manera directa o indirecta. En el caso de la activación directa, la anandamida se une y activa TRPV1, lo cual ocurre cuando los niveles de anandamida son elevados (Tóth et al., 2009; Micale et al., 2009). En cambio, cuando los niveles de AEA son bajos puede activar de manera indirecta a los receptores CB1.

Varios estudios en el SNP respaldan nuestra hipótesis. Se ha observado que la potenciación específica de TRPV1 por serotonina en el intestino de ratones se realiza a través de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, y se ha demostrado que los antagonistas selectivos de estos receptores, como ketanserina, atenúan dicha potenciación (Sugiuar et al., 2004). Además, la interacción entre serotonina y TRPV1 se respalda con el hecho de que el fármaco antimigrañoso sumatriptán, un agonista de serotonina, inhibe las corrientes mediadas por TRPV1 en los ganglios del trigémino y las corrientes excitadoras en el trigémino inducidas por capsaicina (Loyd et al., 2011). También, Salzer y colaboradores demostraron que la 5-HT excita las neuronas DRG principalmente a través de los 5-HT<sub>2c</sub>R, y la activación de estos receptores conduce a la sensibilización de los TRPV1 (Salzer et al., 2016).

Contrariamente, en el SNC, Chávez et al. y Grueter et al. demostraron que la AEA puede actuar de manera autocrina al activar TRPV1 postsináptico en el hipocampo (Chávez et al., 2010) y el núcleo accumbens (NAc)(Grueter et al., 2010). Esta activación de TRPV1 desencadena una LTD mediada postsinápticamente, resultando de la endocitosis de los receptores AMPA.

Además, en el laboratorio del Dr. Andrés Chávez, resultados preliminares demuestran que la serotonina deprime la transmisión excitatoria en las neuronas piramidales de las capas II y III. La exposición a 5-HT reduce significativamente la transmisión excitatoria, y este efecto no se acompaña de cambios en la relación EPSC<sub>2</sub>/EPSC<sub>1</sub>. El pretratamiento con CPZ bloquea el efecto

mediado por 5-HT. Esto respalda estos datos y sugiere una posible implicación en áreas relacionadas con la ansiedad. Ver anexos para obtener más información (figura 18).

En cuanto a las manifestaciones de ansiedad y las áreas cerebrales específicas donde puede ocurrir, resulta fácil especular respaldándose en la evidencia que existe en la literatura, que la interacción entre el receptor 5-HT<sub>2C</sub> y TRPV1 respecto a la regulación de las respuestas tipo ansiosas podría residir en la amígdala (Christianson et al., 2010; John & Currie, 2012; Matthiesen et al., 2020; Vicente & Zangrossi Jr, 2012). Aunque también podría suceder en otras regiones donde se ha observado la activación de TRPV1, como el PAG (Terzian et al., 2009) o el hipocampo (Santos et al., 2008), dado que la activación serotoninérgica mediada por 5-HT<sub>2C</sub>R no ocurre en estas zonas, especulamos que es más probable que ocurra en la amígdala. Esto fue respaldado por estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio por Christopher Reyes y Francisca Henríquez, donde se realizó cirugía estereotáxica con implantes de cánulas bilaterales en la amígdala (ver figura 19).

La administración sistémica de MK212 provocó un efecto ansioso, evidenciado por la significativa reducción del tiempo en el centro. Esta respuesta ansiogénica generada de manera fue antagonizada por la inyección local de CPZ 10 nM, indicando que probablemente la regulación de las conductas ansiosas mediadas por la activación de 5-HT<sub>2C</sub>R ocurre en la amígdala.

Para reforzar aún más la idea de que TRPV1 es un efector relevante en las conductas del tipo ansiosas, evaluamos el rol ansiogénico de TRPV1 utilizando ratones SERT KO como modelo genético de conductas tipo-ansiosas. La elección de utilizar ratones SERT KO se basa en su fenotipo complejo y bien caracterizado, que refleja una amplia gama de comportamientos ansiosos el cual ha sido respaldado en múltiples investigaciones (Carroll et al., 2007; Holmes et al., 2003a; Holmes et al., 2003b; Kalueff et al., 2007a; Kalueff et al., 2007b; Li et al., 2004; Line et al., 2011; Lira et al., 2003; Moya et al., 2011; Murphy et al., 2003; Schipper et al., 2011).

En nuestros experimentos, observamos que la administración aguda de CPZ fue capaz de revertir las conductas tipo-ansiosas en los ratones SERT KO (Fig. 14). Este resultado sugiere que el



bloqueo de TRPV1 en los ratones SERT KO puede influir en el rescate del fenotipo ansioso de varias maneras.

Se ha descrito que los ratones SERT KO muestran una actividad cerebral elevada de PLA2, lo que se refleja en un aumento significativo en los coeficientes de incorporación basal del ácido araquidónico (AA) (Basselin et al., 2009; Qu et al., 2005). Se podría especular que ese AA podría estar consumiéndose en la formación de AEA, lo que podría contribuir y explicar su estado más ansioso. Sin embargo, al ser tratados con CPZ, que inhibe los receptores TRPV1, los ratones carecen de un target donde la AEA pueda unirse, lo que resulta en una ausencia de manifestaciones ansiosas.

Otra posibilidad es que en un ratón genéticamente ansioso, donde la serotonina basal esta elevada desde nacimiento, puede causar una regulación a la baja de estos receptores, pero al parecer al existir menos cantidad de receptores 5-HT<sub>2c</sub>R activos se provoca un alza compensatoria de los receptores TRPV1 y de esa forma podría mediar las respuestas ansiosas. Esto puede ser una posibilidad pero no estaría respaldada del todo en la literatura, ya que en el trabajo de Li y colaboradores del 2003 se demostró una disminución en la función de los 5-HT<sub>2c</sub>R en ratones SERT KO, pero es dependiente de la localización (Li et al., 2003).

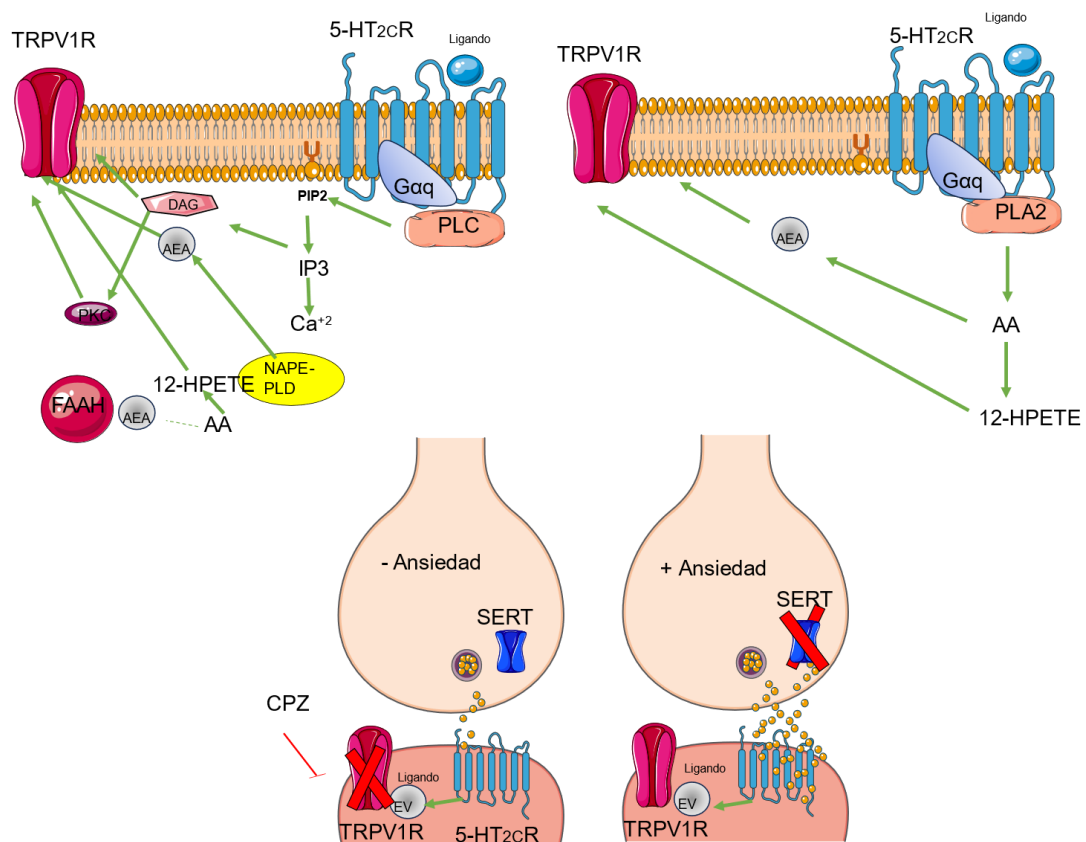
En esa misma línea, obtuvimos un ratón doble heterocigoto, para la proteína SERT y TRPV1, con el fin de observar el impacto de la deficiencia de TRPV1 en un modelo de roedor con conductas tipo-ansiosas. En la Figura 15 se observó que los ratones SERT het TRPV1 het mostraron mayor tiempo de exploración en las áreas abiertas que los ratones SERT het, lo que indica que la disminución del canal TRPV1 es capaz de rescatar el fenotipo ansioso mostrado por ratones SERT het.

Una posible explicación podría relacionarse con la desensibilización de los receptores serotoninérgicos debido al aumento en la concentración de serotonina extracelular en los ratones SERT het. Se sabe que un aumento prolongado en la serotonina extracelular puede conducir a

la desensibilización de los receptores serotoninérgicos, lo que podría contribuir a un estado de ansiedad crónica en estos animales.

En resumen, la disminución de TRPV1 podría tener un efecto regulador sobre la actividad serotoninérgica en el cerebro, contrarrestando así la desensibilización de los receptores serotoninérgicos y reduciendo la ansiedad en los ratones SERT het. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender completamente los mecanismos moleculares involucrados en esta interacción y validar esta especulación.

Este resultado vuelve a confirmar el rol relevante de la expresión de TRPV1 en la manifestación de conductas ansiosas.



**Figura 17. Posibles alternativas para una interacción funcional en la regulación del receptor 5-HT<sub>2c</sub>R sobre la activación del TRPV1.** Flecha verde: activación o estimulación de síntesis de una molécula; línea roja: Bloqueo; cruz roja eliminación, flecha discontinua: escisión de una molécula.

En el contexto de cómo TRPV1 y 5-HT<sub>2c</sub>R interactúan, la generación de ligandos endógenos río debajo de la activación de 5-HT<sub>2c</sub>R podría tener un papel clave. Nuestro modelo muestra de manera hipotética, cómo 5-HT<sub>2c</sub>R puede regular directamente TRPV1, influyendo en respuestas celulares y posiblemente en la respuesta a endocannabinoides. Este modelo visual simplificado muestra cómo 5-HT<sub>2c</sub>R podría activar a TRPV1, proporcionando una base para futuras investigaciones.

## 6. CONCLUSIONES

En resumen, nuestros hallazgos destacan una conexión crucial entre los receptores 5-HT<sub>2C</sub>R y TRPV1 que modula la ansiedad en ratones. Estos resultados enriquecen nuestra comprensión actual sobre la regulación central de la ansiedad a través de la interacción funcional de 5-HT<sub>2C</sub>R y TRPV1. Aunque nuestros datos sugieren la necesidad del receptor TRPV1 en los comportamientos ansiosos mediados por 5-HT<sub>2C</sub>R y en el fenotipo ansioso de ratones SERT KO, se necesitan experimentos adicionales para esclarecer la ruta de señalización activada por TRPV1 durante los comportamientos ansiosos. Por otro lado, los resultados que muestran que el efecto ansiogénico de mCPP o MK212 se bloquea con el antagonista de TRPV1 CPZ, y que este efecto es ausente en ratones TRPV1 KO, respaldan la importancia de la interacción 5-HT<sub>2C</sub>R-TRPV1 en la manifestación de comportamientos ansiosos. Además, los datos preliminares indican que la depresión inducida por la serotonina en la transmisión sináptica excitatoria implica la activación postsináptica de los TRPV1 y que la administración local de CPZ en la amígdala revierte el efecto ansiogénico de MK212 de manera sistémica, proporcionando una perspectiva más completa sobre los mecanismos neurobiológicos subyacentes a la ansiedad mediada por estos receptores.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, S. S., Harb, A. A., Almasri, I. M., & Bustanji, Y. K. (2022). The interaction of TRPV1 and lipids: Insights into lipid metabolism. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1066023>
- Abdelhamid, R. E., Kovács, K. J., Nunez, M. G., & Larson, A. A. (2014). Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. *Pharmacological Research*, *79*, 21-27.
- Abramowski, D., Rigo, M., Duc, D., Hoyer, D., & Staufienbiel, M. (1995). Localization of the 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology*, *34*(12), 1635-1645. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00138-7](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00138-7)
- Aguiar, D. C., Moreira, F. A., Terzian, A. L., Fogaça, M. V., Lisboa, S. F., Wotjak, C. T., & Guimaraes, F. S. (2014). Modulation of defensive behavior by Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 (TRPV1) Channels. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *46*, 418-428. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.026>
- Aguiar, D. C., Terzian, A. L. B., Guimaraes, F. S., & Moreira, F. A. (2009). Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. *Psychopharmacology*, *205*(2), 217-225. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1532-5>
- Akimova, E., Lanzenberger, R., & Kasper, S. (2009). The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biological psychiatry*, *66*(7), 627-635.
- Aloyo, V. J., Berg, K. A., Spampinato, U., Clarke, W. P., & Harvey, J. A. (2009). Current status of inverse agonism at serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, *121*(2), 160-173. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.10.010>

- Alves, S. H., Pinheiro, G., Motta, V., Landeira-Fernandez, J., & Cruz, A. de M. (2004). Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT<sub>2C</sub> agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioural pharmacology*, *15*(1), 37-43.
- Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G. S., Grady, E. F., Trevisani, M., Manni, C., Geppetti, P., McRoberts, J. A., Ennes, H., Davis, J. B., Mayer, E. A., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(18), 4300-4312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5679-03.2004>
- Bandelow, B., & Michaelis, S. (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *17*(3), 327-335. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/bbandelow>
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, *38*(8), 1083-1152.
- Barrett, F. S., Bradstreet, M. P., Leoutsakos, J.-M. S., Johnson, M. W., & Griffiths, R. R. (2016). The Challenging Experience Questionnaire: Characterization of challenging experiences with psilocybin mushrooms. *Journal of Psychopharmacology*, *30*(12), 1279-1295.
- Basselin, M., Fox, M. A., Chang, L., Bell, J. M., Greenstein, D., Chen, M., Murphy, D. L., & Rapoport, S. I. (2009). Imaging Elevated Brain Arachidonic Acid Signaling in Unanesthetized Serotonin Transporter (5-HTT)-Deficient Mice. *Neuropsychopharmacology*, *34*(7), 1695-1709. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.227>
- Baudry, A., Pietri, M., Launay, J.-M., Kellermann, O., & Schneider, B. (2019). Multifaceted regulations of the serotonin transporter: Impact on antidepressant response. *Frontiers in neuroscience*, *13*, 91.
- Bengel, D., Murphy, D. L., Andrews, A. M., Wichems, C. H., Feltner, D., Heils, A., Mössner, R., Westphal, H., & Lesch, K.-P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Molecular pharmacology*, *53*(4), 649-655.

- Benjamin, J., Nemetz, H., Fux, M., Bleichman, I., & Agam, G. (1997). Acute inositol does not attenuate mCPP-induced anxiety, mydriasis and endocrine effects in panic disorder. *Journal of Psychiatric Research, 31*(4), 489-495. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(97\)00021-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(97)00021-6)
- Berg, K. A., Maayani, S., & Clarke, W. P. (1998). Interactions between Effectors Linked to Serotonin Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences, 861*(1), 111-120. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10181.x>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual review of medicine, 60*, 355-366.
- Bert, B., Felicio, L. F., Fink, H., & Nasello, A. G. (2005). The use of sudden darkness in mice: A behavioural and pharmacological approach. *Psychopharmacology, 179*(4), 846-853. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2107-0>
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S. J., & Yeats, J. C. (1992). Capsazepine: A competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology, 107*(2), 544-552. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb12781.x>
- Bilkei-Gorzó, A., Gyertyán, I., & Lévy, G. (1998). mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats—A new method for screening anxiolytic activity. *Psychopharmacology, 136*(3), 291-298. <https://doi.org/10.1007/s002130050568>
- Biringer, R. G. (2021). The rise and fall of anandamide: Processes that control synthesis, degradation, and storage. *Molecular and Cellular Biochemistry, 476*(7), 2753-2775. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04121-5>
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Nutt, D. J. (2011). *Handbook of anxiety and fear*. Elsevier.
- Bortolato, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2010). The degradation of serotonin: Role of MAO. *Handbook of Behavioral Neuroscience, 21*, 203-218.

- Bouchekioua, Y., Nebuka, M., Sasamori, H., Nishitani, N., Sugiura, C., Sato, M., Yoshioka, M., & Ohmura, Y. (2022). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor knockout in mice attenuates fear responses in contextual or cued but not compound context-cue fear conditioning. *Translational Psychiatry*, *12*(1), 58.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European journal of pharmacology*, *463*(1-3), 55-65.
- Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). TRPV1: A potential drug target for treating various diseases. *Cells*, *3*(2), 517-545.
- Burke, J. E., & Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling1. *Journal of lipid research*, *50*, S237-S242.
- Calhoun, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature neuroscience*, *18*(10), 1394-1404.
- Campos, A. C., & Guimarães, F. S. (2009). Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *33*(8), 1517-1521. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.08.017>
- Carbonaro, T. M., Bradstreet, M. P., Barrett, F. S., MacLean, K. A., Jesse, R., Johnson, M. W., & Griffiths, R. R. (2016). Survey study of challenging experiences after ingesting psilocybin mushrooms: Acute and enduring positive and negative consequences. *Journal of psychopharmacology*, *30*(12), 1268-1278.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *29*(8), 1193-1205.
- Carroll, J. C., Boyce-Rustay, J. M., Millstein, R., Yang, R., Wiedholz, L. M., Murphy, D. L., & Holmes, A. (2007). Effects of Mild Early Life Stress on Abnormal Emotion-related Behaviors in 5-HTT Knockout Mice. *Behavior Genetics*, *37*(1), 214-222. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9129-9>



- Casarotto, P. C., Terzian, A. L. B., Aguiar, D. C., Zangrossi, H., Guimarães, F. S., Wotjak, C. T., & Moreira, F. A. (2012). Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. *Neuropsychopharmacology*, 37(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.207>
- Caterina, M. J., & Julius, D. (2001). The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 487-517. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.487>
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science*, 288(5464), 306-313. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.306>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.
- Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Jackson, A. C., Sigal, Y. M., Yamanaka, H., Grant, R., O'Donnell, D., Nicoll, R. A., Shah, N. M., & Julius, D. (2011). Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *Journal of Neuroscience*, 31(13), 5067-5077.
- Chagraoui, A., Thibaut, F., Skiba, M., Thuillez, C., & Bourin, M. (2016). 5-HT2C receptors in psychiatric disorders: A review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 66, 120-135.
- Chang, M., Zhang, L., Tam, J. P., & Sanders-Bush, E. (2000). Dissecting G Protein-coupled Receptor Signaling Pathways with Membrane-permeable Blocking Peptides: ENDOGENOUS 5-HT2C RECEPTORS IN CHOROID PLEXUS EPITHELIAL CELLS \*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7021-7029. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7021>

- Charney, D. S., Woods, S. W., Goodman, W. K., & Heninger, G. R. (1987). Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology*, *92*(1), 14-24. <https://doi.org/10.1007/BF00215473>
- Chávez, A. E., Chiu, C. Q., & Castillo, P. E. (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, *13*(12), 1511-1518. <https://doi.org/10.1038/nn.2684>
- Christianson, J. P., Ragole, T., Amat, J., Greenwood, B. N., Strong, P. V., Paul, E. D., Fleshner, M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2010). 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. *Biological psychiatry*, *67*(4), 339-345.
- Chu, C. J., Huang, S. M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S. A., Miller, J. D., Zipkin, R. E., Daddario, N., Appendino, G., & Di Marzo, V. (2003). N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(16), 13633-13639.
- Clark, M. S., & Neumaier, J. F. (2001). The 5-HT<sub>1B</sub> receptor: Behavioral implications. *Psychopharmacology bulletin*, *35*(4), 170-185.
- Clemett, D. A., Punhani, T., Duxon, M. S., Blackburn, T. P., & Fone, K. C. (2000). Immunohistochemical localisation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology*, *39*(1), 123-132. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00086-6)
- Comer, J. S., Blanco, C., Hasin, D. S., Liu, S.-M., Grant, B. F., Turner, J. B., & Olfson, M. (2010). Health-related quality of life across the anxiety disorders: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions (NESARC). *The Journal of clinical psychiatry*, *71*(1), 8126.
- Cornélio, A. M., & Nunes-de-Souza, R. L. (2007). Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behavioural brain research*, *178*(1), 82-89.

- Cristino, L., De Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., & Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, *139*(4), 1405-1415.
- Curzon, G. (1981). Influence of plasma tryptophan on brain 5HT synthesis and serotonergic activity. *Serotonin: Current Aspects of Neurochemistry and Function*, 207-219.
- Dai, Y., Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Tominaga, M., & Noguchi, K. (2004). Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(18), 4293-4299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0454-04.2004>
- Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., & Atkinson, K. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, *405*(6783), 183-187.
- Davis, M., Walker, D. L., Miles, L., & Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 105-135.
- Dayer, A. (2014). Serotonin-related pathways and developmental plasticity: Relevance for psychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *16*(1), 29-41.
- De Deurwaerdère, P., Bharatiya, R., Chagraoui, A., & Di Giovanni, G. (2020). Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology*, *168*, 107967. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107967>
- De Deurwaerdère, P., Chagraoui, A., & Cunningham, K. A. (2020). Contemporary Perspective on 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Function and Its Pharmacological Targeting. En *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11, p. 606414). Frontiers Media SA. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.606414/full>

- De Mello Cruz, A. P., Pinheiro, G., Alves, S. H., Ferreira, G., Mendes, M., Faria, L., Macedo, C. E., & Landeira-Fernandez, J. (2005). Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, *182*(3), 345-354. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0108-2>
- Devroye, C., Cathala, A., Piazza, P. V., & Spampinato, U. (2018). The central serotonin2B receptor as a new pharmacological target for the treatment of dopamine-related neuropsychiatric disorders: Rationale and current status of research. *Pharmacology & Therapeutics*, *181*, 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.014>
- Di Giovanni, G., & De Deurwaerdère, P. (2016). New therapeutic opportunities for 5-HT2C receptor ligands in neuropsychiatric disorders. *Pharmacology & therapeutics*, *157*, 125-162.
- Dickenson, A. H., & Dray, A. (1991). Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: Evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. *British Journal of Pharmacology*, *104*(4), 1045-1049. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12547.x>
- Dilbaz, N., Cavus, S. Y., & Darcin, A. E. (2011). Treatment resistant generalized anxiety disorder. En *Different Views of Anxiety Disorders*. IntechOpen.
- Duval, E. R., Javanbakht, A., & Liberzon, I. (2015). Neural circuits in anxiety and stress disorders: A focused review. *Therapeutics and clinical risk management*, 115-126.
- Escelsior, A., Sterlini, B., Murri, M. B., Serafini, G., Aguglia, A., da Silva, B. P., Corradi, A., Valente, P., & Amore, M. (2020). Red-hot chili receptors: A systematic review of TRPV1 antagonism in animal models of psychiatric disorders and addiction. *Behavioural Brain Research*, *393*, 112734.
- Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, *65*(1), 7-19.
- Faraji, N., Komaki, A., & Salehi, I. (2017). Interaction Between the Cannabinoid and Vanilloid Systems on Anxiety in Male Rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, *8*(2), 129-137. <https://doi.org/10.18869/nirp.bcn.8.2.129>

- Felder, C. C., Kanterman, R. Y., Ma, A. L., & Axelrod, J. (1990). Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(6), 2187-2191. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.6.2187>
- Felix-Ortiz, A. C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C. A., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2013). BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron*, *79*(4), 658-664.
- Fernstrom, J. D. (1977). Effects of the diet on brain neurotransmitters. *Metabolism*, *26*(2), 207-223.
- File, S. E., Lippa, A. S., Beer, B., & Lippa, M. T. (2004). Animal Tests of Anxiety. *Current Protocols in Neuroscience*, *26*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0803s26>
- Fogaça, M. V., Lisboa, S. F., Aguiar, D. C., Moreira, F. A., Gomes, F. V., Casarotto, P. C., & Guimarães, F. S. (2012). Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, *45*(4), 357-365. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500029>
- Fone, K. C. F., Austin, R. H., Topham, I. A., Kennett, G. A., & Punhani, T. (1998). Effect of chronic *m*-CPP on locomotion, hypophagia, plasma corticosterone and 5-HT<sub>2C</sub> receptor levels in the rat. *British Journal of Pharmacology*, *123*(8), 1707-1715. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701798>
- Fone, K. C. F., Shalders, K., Fox, Z. D., Arthur, R., & Marsden, C. A. (1996). Increased 5-HT<sub>2C</sub> receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation. *Psychopharmacology*, *123*(4), 346-352. <https://doi.org/10.1007/BF02246645>
- Freels, T. G., Lester, D. B., & Cook, M. N. (2019). Arachidonoyl serotonin (AA-5-HT) modulates general fear-like behavior and inhibits mesolimbic dopamine release. *Behavioural Brain Research*, *362*, 140-151. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.010>
- García-Martínez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De La Peña, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Pérez-Payá, E., Belmonte, C., Messeguer, A., & Ferrer-

- Montiel, A. (2002). Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2374-2379. <https://doi.org/10.1073/pnas.022285899>
- García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sánchez, E., Fernández-Ballester, G., & Ferrer-Montiel, A. (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(23), 5307-5314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0202-04.2004>
- Ghazizadeh, V., & Nazıroğlu, M. (2014). Electromagnetic radiation (Wi-Fi) and epilepsy induce calcium entry and apoptosis through activation of TRPV1 channel in hippocampus and dorsal root ganglion of rats. *Metabolic Brain Disease*, 29(3), 787-799. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9549-9>
- Giorgetti, M., & Tecott, L. H. (2004). Contributions of 5-HT<sub>2C</sub> receptors to multiple actions of central serotonin systems. *European journal of pharmacology*, 488(1-3), 1-9.
- Gonzalez-Reyes, L. E., Ladas, T. P., Chiang, C.-C., & Durand, D. M. (2013). TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity *in vitro* and electrographic seizures *in vivo*. *Experimental Neurology*, 250, 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.010>
- Gottschalk, M. G., & Domschke, K. (2022). Genetics of generalized anxiety disorder and related traits. *Dialogues in clinical neuroscience*.
- Govindarajan, V. S., & Sathyanarayana, M. N. (1991). Capsicum—Production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29(6), 435-474. <https://doi.org/10.1080/10408399109527536>
- Grahame-Smith, D. G. (1971). Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. *Journal of Neurochemistry*, 18(6), 1053-1066.

- GriebelCA, G., Misslin, R., Pawlowski, M., & Vogel, E. (1991). M-Chlorophenylpiperazine enhances neophobic and anxious behaviour in mice. *Neuroreport*, *2*, 629.
- Groenink, L., Van Bogaert, M. J. V., Van Der Gugten, J., Oosting, R. S., & Olivier, B. (2003). 5-HT1A receptor and 5-HT1B receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. *Behavioural pharmacology*, *14*(5), 369-383.
- Grueter, B. A., Brasnjo, G., & Malenka, R. C. (2010). Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, *13*(12), 1519-1525. <https://doi.org/10.1038/nn.2685>
- Grupe, D. W., & Nitschke, J. B. (2013). Uncertainty and anticipation in anxiety: An integrated neurobiological and psychological perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(7), 488-501.
- Grycova, L., Lansky, Z., Friedlova, E., Obsilova, V., Janouskova, H., Obsil, T., & Teisinger, J. (2008). Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin. *Biochemical and biophysical research communications*, *375*(4), 680-683.
- Han, P., Korepanova, A. V., Vos, M. H., Moreland, R. B., Chiu, M. L., & Faltynek, C. R. (2013). Quantification of TRPV1 Protein Levels in Rat Tissues to Understand its Physiological Roles. *Journal of Molecular Neuroscience*, *50*(1), 23-32. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9849-7>
- Hannon, J., & Hoyer, D. (2002). Serotonin receptors and systems: Endless diversity? *Acta Biologica Szegediensis*, *46*(1-2), 1-12.
- Hare, B. D., & Duman, R. S. (2020). Prefrontal cortex circuits in depression and anxiety: Contribution of discrete neuronal populations and target regions. *Molecular psychiatry*, *25*(11), 2742-2758.
- Heisler, L. K., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L., Yeo, G. S., O'Rahilly, S., Colmers, W. F., & Elmquist, J. K. (2007). Serotonin activates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *Journal of Neuroscience*, *27*(26), 6956-6964.

- Heisler, L. K., Zhou, L., Bajwa, P., Hsu, J., & Tecott, L. H. (2007). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes, Brain and Behavior*, 6(5), 491-496. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00316.x>
- Hill, R. G. (2011). 5HT<sub>2C</sub> Receptors in the Pathophysiology of CNS Disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(6), 1002.
- Ho, K. W., Ward, N. J., & Calkins, D. J. (2012). TRPV1: A stress response protein in the central nervous system. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 1(1), 1-14.
- Hoffmann, J., Suprinsinchai, W., Andreou, A. P., Summ, O., Akerman, S., & Goadsby, P. J. (2012). Olvanil acts on transient receptor potential vanilloid channel 1 and cannabinoid receptors to modulate neuronal transmission in the trigeminovascular system. *PAIN®*, 153(11), 2226-2232. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.07.006>
- Hogsted, E. S., Beliveau, V., Ozenne, B., Madsen, M. K., Svarer, C., Dam, V. N., Johansen, A., Fisher, P. M., Knudsen, G. M., & Frokjaer, V. G. (2023). The association between brain serotonin 2A receptor binding and neuroticism in healthy individuals: A Cimbi database independent replication study. *bioRxiv*, 2023-08.
- Holmes, A., Li, Q., Murphy, D. L., Gold, E., & Crawley, J. N. (2003). Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: The influence of genetic background. *Genes, Brain and Behavior*, 2(6), 365-380. <https://doi.org/10.1046/j.1601-1848.2003.00050.x>
- Holmes, A., Yang, R. J., Lesch, K.-P., Crawley, J. N., & Murphy, D. L. (2003). Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 28(12), 2077-2088.
- Holzer, P., & Izzo, A. A. (2014). The pharmacology of TRP channels. *British Journal of Pharmacology*, 171(10), 2469-2473. <https://doi.org/10.1111/bph.12723>
- Hornung, J.-P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of chemical neuroanatomy*, 26(4), 331-343.



- Hornung, J.-P. (2010). The neuroanatomy of the serotonergic system. En *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 51-64). Elsevier.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *71*(4), 533-554.
- Huang, J., Zhang, X., & McNaughton, P. A. (2006). Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *17*(6), 638-645.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.11.002>
- Huang, K. W., Ochandarena, N. E., Philson, A. C., Hyun, M., Birnbaum, J. E., Cicconet, M., & Sabatini, B. L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife*, *8*, e46464.
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J., Krey, J. F., Chu, C. J., Miller, J. D., Davies, S. N., Geppetti, P., Walker, J. M., & Di Marzo, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(12), 8400-8405.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.122196999>
- Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.-Y., Kang, C.-J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H., Suh, Y.-G., Kim, D., & Oh, U. (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(11), 6155-6160.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6155>
- Iglesias, L. P., Aguiar, D. C., & Moreira, F. A. (2022). TRPV1 blockers as potential new treatments for psychiatric disorders. *Behavioural Pharmacology*, *33*(1), 2-14.
- Izzo, A. A., & Ernst, E. (2001). Interactions Between Herbal Medicines and Prescribed Drugs: A Systematic Review. *Drugs*, *61*(15), 2163-2175. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161150-00002>
- Jenkins, T. A., Nguyen, J. C., Polglaze, K. E., & Bertrand, P. P. (2016). Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Nutrients*, *8*(1), 56.

- Jensen, N. H., Cremers, T. I., & Sotty, F. (NaN/NaN/NaN). Therapeutic Potential of 5-HT<sub>2c</sub> Receptor Ligands. *The Scientific World Journal*, 10, 1870-1885. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.180>
- John, C. S., & Currie, P. J. (2012). N-Arachidonoyl-serotonin in the basolateral amygdala increases anxiolytic behavior in the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.025>
- Jordt, S.-E., & Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to «hot» chili peppers. *Cell*, 108(3), 421-430. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00637-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00637-2)
- Kahn, R. S., Kalus, O., Wetzler, S., & Van Praag, H. M. (2023). The role of serotonin in the regulation of anxiety. *Role Of Serotonin In Psychiatric Disorders*, 129-160.
- Kalueff, A. V., Fox, M. A., Gallagher, P. S., & Murphy, D. L. (2007). Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes, Brain and Behavior*, 6(4), 389-400. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00270.x>
- Kalueff, A. V., Jensen, C. L., & Murphy, D. L. (2007). Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain research*, 1169, 87-97.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews*, 89(1), 309-380. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>
- Kasckow, J. W., Mulchahey, J. J., & Thomas Jr, D. (2004). Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(2), 291-295.
- Kenakin, T. (2006). Testing for Inverse Agonism with Constitutive Receptor Systems. *Current Protocols in Pharmacology*, 32(1), 9.5.1-9.5.13. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0905s32>

- Kennett, G. A., & Curzon, G. (1988). Evidence that mCPP may have behavioural effects mediated by central 5-HT<sub>1C</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology*, *94*(1), 137-147.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11508.x>
- Kimura, A., Stevenson, P. L., Carter, R. N., MacColl, G., French, K. L., Paul Simons, J., Al-Shawi, R., Kelly, V., Chapman, K. E., & Holmes, M. C. (2009). Overexpression of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in forebrain leads to elevated anxiety and hypoactivity. *The European Journal of Neuroscience*, *30*(2), 299-306.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06831.x>
- Koplas, P. A., Rosenberg, R. L., & Oxford, G. S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*, *17*(10), 3525-3537.
- Kulikov, A. V., Gainetdinov, R. R., Ponimaskin, E., Kalueff, A. V., Naumenko, V. S., & Popova, N. K. (2018). Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy. *Expert opinion on therapeutic targets*, *22*(4), 319-330.
- Leathwood, P. D. (1987). Tryptophan availability and serotonin synthesis. *Proceedings of the Nutrition Society*, *46*(1), 143-156.
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*, *23*, 727-738.
- Lee, H.-Y., Tae, W. S., Yoon, H.-K., Lee, B.-T., Paik, J.-W., Son, K.-R., Oh, Y.-W., Lee, M.-S., & Ham, B.-J. (2011). Demonstration of decreased gray matter concentration in the midbrain encompassing the dorsal raphe nucleus and the limbic subcortical regions in major depressive disorder: An optimized voxel-based morphometry study. *Journal of affective disorders*, *133*(1-2), 128-136.
- Lesch, K. P., Meyer, J., Glatz, K., Flogge, G., Hinney, A., Hebebrand, J., Klauck, S. M., Poustka, A., Poustka, F., Bengel, D., Missner, R., Riederer, P., & Heils, A. (1997). The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in evolutionary perspective: Alternative biallelic variation in rhesus monkeys. *Journal of Neural Transmission*, *104*(11-12), 1259-1266.  
<https://doi.org/10.1007/BF01294726>

- Lesch, K.-P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C. R., Hamer, D. H., & Murphy, D. L. (1996). Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science*, 274(5292), 1527-1531. <https://doi.org/10.1126/science.274.5292.1527>
- Li, H.-B., Mao, R.-R., Zhang, J.-C., Yang, Y., Cao, J., & Xu, L. (2008). Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biological psychiatry*, 64(4), 286-292.
- Li, Q. (2006). Cellular and molecular alterations in mice with deficient and reduced serotonin transporters. *Molecular Neurobiology*, 34(1), 51-65. <https://doi.org/10.1385/MN:34:1:51>
- Li, Q., Luo, T., Jiang, X., & Wang, J. (2012). Anxiolytic effects of 5-HT1A receptors and anxiogenic effects of 5-HT2C receptors in the amygdala of mice. *Neuropharmacology*, 62(1), 474-484.
- Li, Q., Wichems, C. H., Ma, L., Van de Kar, L. D., Garcia, F., & Murphy, D. L. (2003). Brain region-specific alterations of 5-HT2A and 5-HT2C receptors in serotonin transporter knockout mice. *Journal of Neurochemistry*, 84(6), 1256-1265. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01607.x>
- Li, Q.-H., Nakadate, K., Tanaka-Nakadate, S., Nakatsuka, D., Cui, Y., & Watanabe, Y. (2004). Unique expression patterns of 5-HT2A and 5-HT2C receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. *The Journal of Comparative Neurology*, 469(1), 128-140. <https://doi.org/10.1002/cne.11004>
- Line, S. J., Barkus, C., Coyle, C., Jennings, K. A., Deacon, R. M., Lesch, K. P., Sharp, T., & Bannerman, D. M. (2011). Opposing alterations in anxiety and species-typical behaviours in serotonin transporter overexpressor and knockout mice. *European Neuropsychopharmacology*, 21(1), 108-116. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.08.005>
- Linsambarth, S., Moraga-Amaro, R., Quintana-Donoso, D., Rojas, S., & Stehberg, J. (2017). The amygdala and anxiety. *The Amygdale—Where Emotion Shape Perception, Learning and Memories, Neuroscience InTech*, 139-171.

- Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansorge, M. S., Gordon, J. A., Francis, J. H., Bradley-Moore, M., Lira, J., Underwood, M. D., Arango, V., Kung, H. F., Hofer, M. A., Hen, R., & Gingrich, J. A. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biological Psychiatry*, *54*(10), 960-971. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00696-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00696-6)
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., & Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, *54*(6), 905-918. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*, *46*(3), 321-340.
- Lister, RichardG. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, *92*(2). <https://doi.org/10.1007/BF00177912>
- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B. X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R. D., Krystal, G., Rai, R., & Mahadevan, A. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*, *54*(1), 1-7.
- Loane, C., & Politis, M. (2012). Buspirone: What is it all about? *Brain research*, *1461*, 111-118.
- Lopez-Ibor Jr, J. J. (1992). Serotonin and psychiatric disorders. *International clinical psychopharmacology*, *7*, 5-11.
- Lowy, M. T., & Meltzer, H. Y. (1988). Stimulation of serum cortisol and prolactin secretion in humans by MK-212, a centrally active serotonin agonist. *Biological Psychiatry*, *23*(8), 818-828. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(88\)90070-4](https://doi.org/10.1016/0006-3223(88)90070-4)
- Loyd, D. R., Weiss, G., Henry, M. A., & Hargreaves, K. M. (2011). Serotonin Increases the Functional Activity of Capsaicin-Sensitive Rat Trigeminal Nociceptors via Peripheral Serotonin Receptors. *Pain*, *152*(10), 2267-2276. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.06.002>

- Luchicchi, A., & Pistis, M. (2012). Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: Pharmacological Properties, Functional Features, and Emerging Specificities of the Two Major Endocannabinoids. *Molecular Neurobiology*, 46(2), 374-392. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8299-0>
- Lucki, I. (1991). Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs. *The Journal of clinical psychiatry*, 52, 24-31.
- Lukacs, V., Thyagarajan, B., Varnai, P., Balla, A., Balla, T., & Rohacs, T. (2007). Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 7070-7080.
- Maione, S., De Petrocellis, L., de Novellis, V., Moriello, A. S., Petrosino, S., Palazzo, E., Rossi, F. S., Woodward, D. F., & Di Marzo, V. (2007). Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 150(6), 766-781. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707145>
- Mandadi, S., Tominaga, T., Numazaki, M., Murayama, N., Saito, N., Armati, P. J., Roufogalis, B. D., & Tominaga, M. (2006). Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKC $\epsilon$ -mediated phosphorylation at S800. *Pain*, 123(1-2), 106-116.
- Manna, S. S. S., & Umathe, S. N. (2011). Transient receptor potential vanilloid 1 channels modulate the anxiolytic effect of diazepam. *Brain Research*, 1425, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.09.049>
- Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kössl, M., Holsboer, F., Zieglgänsberger, W., Landgraf, R., Lutz, B., & Wotjak, C. T. (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 832-839.
- Martin, J. R., Ballard, T. M., & Higgins, G. A. (2002). Influence of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist, SB-242084, in tests of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), 615-625.
- Martins, D., Tavares, I., & Morgado, C. (2014). "Hotheaded": The role OF TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology*, 85, 151-157.

- Mascarenhas, D. C., Gomes, K. S., & Nunes-de-Souza, R. L. (2013). Anxiogenic-like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. *Behavioural Brain Research*, 250, 308-315. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.023>
- Matthiesen, M., Mendes, L. D., Spiacci, A., Fortaleza, E. A., Corrêa, F. M., & Zangrossi, H. (2020). Serotonin 2C receptors in the basolateral amygdala mediate the anxiogenic effect caused by serotonergic activation of the dorsal raphe dorsomedial subnucleus. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 34(4), 391-399. <https://doi.org/10.1177/0269881119882797>
- Maximino, C. (2012). *Serotonin and anxiety: Neuroanatomical, pharmacological, and functional aspects*. Springer Science & Business Media.
- McGrew, L., Chang, M. S. S., & Sanders-Bush, E. (2002). Phospholipase D activation by endogenous 5-hydroxytryptamine 2C receptors is mediated by Gα13 and pertussis toxin-insensitive Gβγ subunits. *Molecular pharmacology*, 62(6), 1339-1343.
- Meseguer, V., Alpizar, Y. A., Luis, E., Tajada, S., Denlinger, B., Fajardo, O., Manenschijn, J.-A., Fernández-Pena, C., Talavera, A., & Kichko, T. (2014). TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nature communications*, 5(1), 3125.
- Mezey, É., Tóth, Z. E., Cortright, D. N., Arzubi, M. K., Krause, J. E., Elde, R., Guo, A., Blumberg, P. M., & Szallasi, A. (2000). Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3655-3660. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3655>
- Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G. M., Drago, F., & Di Marzo, V. (2009). Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology*, 34(3), 593-606.
- Millan, M. J. (2005). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> Receptors as a Target for the Treatment of Depressive and Anxious States: Focus on Novel Therapeutic Strategies. *Therapies*, 60(5), 441-460. <https://doi.org/10.2515/therapie:2005065>

- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: A review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31(3), 187-199.
- Mohapatra, D. P., & Nau, C. (2005). Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13424-13432.
- Moutkine, I., Collins, E. L., Béchade, C., & Maroteaux, L. (2019). Evolutionary considerations on 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Pharmacological Research*, 140, 14-20.
- Movahed, P., Jönsson, B. A., Birnir, B., Wingstrand, J. A., Jørgensen, T. D., Ermund, A., Sterner, O., Zygmunt, P. M., & Högestätt, E. D. (2005). Endogenous unsaturated C18 N-acylethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38496-38504.
- Moya, P. (2014). Mini-revisión: Variantes genéticas del transportador de serotonina en trastornos neuropsiquiátricos. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 52(2), 115-122.
- Moya, P. R., Fox, M. A., Jensen, C. L., Laporte, J. L., French, H. T., Wendland, J. R., & Murphy, D. L. (2011). Altered 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist-induced responses and 5-HT<sub>2C</sub> receptor RNA editing in the amygdala of serotonin transporter knockout mice. *BMC Pharmacology*, 11, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-11-3>
- Murphy, D. L., & Lesch, K.-P. (2008). Targeting the murine serotonin transporter: Insights into human neurobiology. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(2), 85-96.
- Murphy, D. L., Uhl, G. R., Holmes, A., Ren-Patterson, R., Hall, F. S., Sora, I., Detera-Wadleigh, S., & Lesch, K.-P. (2003). Experimental gene interaction studies with SERT mutant mice as models for human polygenic and epistatic traits and disorders: **Experimental epistasis models for polygenic disorders**. *Genes, Brain and Behavior*, 2(6), 350-364. <https://doi.org/10.1046/j.1601-1848.2003.00049.x>
- Naughton, M., Mulrooney, J. B., & Leonard, B. E. (2000). A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 15(6), 397-415.



- Navailles, S., Lagièrè, M., Guthrie, M., & De Deurwaerdère, P. (2013). Serotonin2c receptor constitutive activity: In vivo direct and indirect evidence and functional significance. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 13(2), 98-107. <https://doi.org/10.2174/1871524911313020002>
- Naziroglu, M., & Demirdas, A. (2015). Psychiatric disorders and TRP channels: Focus on psychotropic drugs. *Current neuropharmacology*, 13(2), 248-257.
- Nebuka, M., Ohmura, Y., Izawa, S., Bouchekioua, Y., Nishitani, N., Yoshida, T., & Yoshioka, M. (2020). Behavioral characteristics of 5-HT2C receptor knockout mice: Locomotor activity, anxiety-, and fear memory-related behaviors. *Behavioural brain research*, 379, 112394.
- Nordquist, N., & Oreland, L. (2010). Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders-a review. *Upsala journal of medical sciences*, 115(1), 2-10.
- Norzé, W., & Maldonado-Vlaar, C. S. (2023). The role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), a modulator of the endocannabinoid system in anxiety, depression, and cocaine addiction. In *Neurobiology and Physiology of the Endocannabinoid System* (pp. 351-364). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90877-1.00029-2>
- Nunes-de-Souza, V., Nunes-de-Souza, R. L., Rodgers, R. J., & Canto-de-Souza, A. (2008). 5-HT2 receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavioural Brain Research*, 187(1), 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.030>
- Ohta, T., Ikemi, Y., Murakami, M., Imagawa, T., Otsuguro, K.-I., & Ito, S. (2006). Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. *The Journal of Physiology*, 576(Pt 3), 809-822. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112250>
- Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J., & Ueda, N. (2007). Biosynthetic Pathways of the Endocannabinoid Anandamide. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1842-1857. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790155>

- Paniccia, G. S., & Rapaport, M. H. (1995). Serotonin receptors, social phobia and panic disorder. *International Review of Psychiatry*, 7(1), 131-140.
- Pethő, G., & Reeh, P. W. (2012). Sensory and Signaling Mechanisms of Bradykinin, Eicosanoids, Platelet-Activating Factor, and Nitric Oxide in Peripheral Nociceptors. *Physiological Reviews*, 92(4), 1699-1775. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2010>
- Plant, T. D., Zöllner, C., Kepura, F., Mousa, S. S., Eichhorst, J., Schaefer, M., Furkert, J., Stein, C., & Oksche, A. (2007). Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Molecular Pain*, 3, 35. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-35>
- Prescott, E. D., & Julius, D. (2003). A Modular PIP<sub>2</sub> Binding Site as a Determinant of Capsaicin Receptor Sensitivity. *Science*, 300(5623), 1284-1288. <https://doi.org/10.1126/science.1083646>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Qu, Y., Villacreses, N., Murphy, D. L., & Rapoport, S. I. (2005). 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor signaling via phospholipase A<sub>2</sub> and arachidonic acid is attenuated in mice lacking the serotonin reuptake transporter. *Psychopharmacology*, 180(1), 12-20. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2231-5>
- Quesseveur, G., Nguyen, H. T., Gardier, A. M., & Guiard, B. P. (2012). 5-HT<sub>2</sub> ligands in the treatment of anxiety and depression. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(11), 1701-1725. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.719872>
- Raisinghani, M., Pabbidi, R. M., & Premkumar, L. S. (2005). Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *The Journal of Physiology*, 567(3), 771-786. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.087874>
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948). Crystalline serotonin. *Science*, 108(2804), 329-330.
- Regier, D. A., Narrow, W. E., Clarke, D. E., Kraemer, H. C., Kuramoto, S. J., Kuhl, E. A., & Kupfer, D. J. (2013). DSM-5 field trials in the United States and Canada, Part II: Test-retest reliability of selected categorical diagnoses. *American journal of psychiatry*, 170(1), 59-70.

- Ren, J., Isakova, A., Friedmann, D., Zeng, J., Grutzner, S. M., Pun, A., Zhao, G. Q., Kolluru, S. S., Wang, R., & Lin, R. (2019). Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *Elife*, *8*, e49424.
- Robinson, O. J., Pike, A. C., Cornwell, B., & Grillon, C. (2019). The translational neural circuitry of anxiety. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *90*(12), 1353-1360.
- Rocha, B., Rigo, M., Di Scala, G., Sandner, G., & Hoyer, D. (1994). Chronic mianserin or eltoprazine treatment in rats: Effects on the elevated plus-maze test and on limbic 5-HT<sub>2C</sub> receptor levels. *European journal of pharmacology*, *262*(1-2), 125-131.
- Rodgers, R. J., Cole, J. C., Cobain, M. R., Daly, P., Doran, P. J., Eells, J. R., & Wallis, P. (1992). Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: Profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP: 1. *Behavioural Pharmacology*, *3*(6), 621-634.
- Rohacs, T. (2015a). Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *467*(9), 1851-1869. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1695-3>
- Rohacs, T. (2015b). Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *467*(9), 1851-1869. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1695-3>
- Rosen, J. B., & Schulkin, J. (1998). From normal fear to pathological anxiety. *Psychological review*, *105*(2), 325.
- Rosenbaum, T., & Simon, S. A. (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. En W. B. Liedtke & S. Heller (Eds.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/>
- Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors: Anandamide and vanilloid receptors. *British Journal of Pharmacology*, *140*(5), 790-801. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705467>
- Rossi, S., Sacchetti, L., Napolitano, F., De Chiara, V., Motta, C., Studer, V., Musella, A., Barbieri, F., Bari, M., & Bernardi, G. (2012). Interleukin-1 $\beta$  causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *Journal of Neuroscience*, *32*(40), 13896-13905.

- Roth, B. L. (1994). Multiple serotonin receptors: Clinical and experimental aspects. *Annals of Clinical Psychiatry*, 6(2), 67-78.
- Roufogalis, B. D., & Mandadi, S. (2008). ThermoTRP channels in nociceptors: Taking a lead from capsaicin receptor TRPV1. *Current neuropharmacology*, 6(1), 21-38.
- Rubino, T., Realini, N., Castiglioni, C., Guidali, C., Vigano, D., Marras, E., Petrosino, S., Perletti, G., Maccarrone, M., & Di Marzo, V. (2008). Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 18(6), 1292-1301.
- Rudnick, G., & Sandtner, W. (2019). Serotonin transport in the 21st century. *Journal Of general physiology*, 151(11), 1248-1264.
- Salzer, I., Gantumur, E., Yousuf, A., & Boehm, S. (2016). Control of sensory neuron excitability by serotonin involves 5HT2C receptors and Ca(2+)-activated chloride channels. *Neuropharmacology*, 110(Pt A), 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.006>
- Salzer, I., Ray, S., Schicker, K., & Boehm, S. (2019). Nociceptor signalling through ion channel regulation via GPCRs. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2488.
- Sanchez, J. F., Krause, J. E., & Cortright, D. N. (2001). The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience*, 107(3), 373-381.
- Sant'Ana, A. B., Vilela-Costa, H. H., Vicente, M. A., Hernandez, P. M., de Andrade, T. G. C. S., & Zangrossi Jr, H. (2019a). Role of 5-HT2C receptors of the dorsal hippocampus in the modulation of anxiety- and panic-related defensive responses in rats. *Neuropharmacology*, 148, 311-319.
- Sant'Ana, A. B., Vilela-Costa, H. H., Vicente, M. A., Hernandez, P. M., de Andrade, T. G. C. S., & Zangrossi Jr, H. (2019b). Role of 5-HT2C receptors of the dorsal hippocampus in the modulation of anxiety- and panic-related defensive responses in rats. *Neuropharmacology*, 148, 311-319.
- Santos, C. J., Stern, C. A., & Bertoglio, L. J. (2008). Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus. *Behavioural pharmacology*, 19(4), 357-360.

- Sartim, A. G., Moreira, F. A., & Joca, S. R. L. (2017). Involvement of CB1 and TRPV1 receptors located in the ventral medial prefrontal cortex in the modulation of stress coping behavior. *Neuroscience*, *340*, 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.031>
- Schipper, P., Nonkes, L. J. P., Karel, P., Kiliaan, A. J., & Homberg, J. R. (2011). Serotonin transporter genotype x construction stress interaction in rats. *Behavioural Brain Research*, *223*(1), 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.037>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *96*, e52434.
- Seillier, A., & Giuffrida, A. (2018). The cannabinoid transporter inhibitor OMDM-2 reduces social interaction: Further evidence for transporter-mediated endocannabinoid release. *Neuropharmacology*, *130*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.032>
- Seillier, A., Martinez, A. A., & Giuffrida, A. (2013). Phencyclidine-induced social withdrawal results from deficient stimulation of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors: Implications for schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *38*(9), 1816-1824. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.81>
- Serchov, T., van Calker, D., & Biber, K. (2016). Light/dark transition test to assess anxiety-like behavior in mice. *Bio-protocol*, *6*(19), e1957-e1957.
- Sharp, T., & Barnes, N. M. (2020). Central 5-HT receptors and their function; present and future. *Neuropharmacology*, *177*, 108155.
- Starowicz, K., Nigam, S., & Di Marzo, V. (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacology & therapeutics*, *114*(1), 13-33.
- Stephens, M. A. C., McCaul, M. E., Weerts, E. M., & Wand, G. (2012). Serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) genotype is associated with cortisol responsivity to naloxone challenge. *Psychopharmacology*, *224*, 223-230.

- Stern, C. A. J., Do Monte, F. H. M., Gazarini, L., Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2010). Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience*, *170*(1), 214-222.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, *15*(10), 655-669.
- Studer, M., & McNaughton, P. A. (2010). Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *The Journal of physiology*, *588*(19), 3743-3756.
- Sugiuar, T., Bielefeldt, K., & Gebhart, G. F. (2004). TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(43), 9521-9530.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2639-04.2004>
- Sun, Y.-X., Tsuboi, K., Okamoto, Y., Tonai, T., Murakami, M., Kudo, I., & Ueda, N. (2004). Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochemical Journal*, *380*(3), 749-756.
- Sylvers, P., Lilienfeld, S. O., & LaPrairie, J. L. (2011). Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. *Clinical psychology review*, *31*(1), 122-137.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (1990). Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life sciences*, *47*(16), 1399-1408.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews*, *51*(2), 159-212.
- Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., & Eid, S. R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature Reviews Drug Discovery*, *6*(5), Article 5.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2280>
- Szolcsányi, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, *38*(6), 377-384.

- Tang, H.-B., Inoue, A., Oshita, K., & Nakata, Y. (2004). Sensitization of vanilloid receptor 1 induced by bradykinin via the activation of second messenger signaling cascades in rat primary afferent neurons. *European Journal of Pharmacology*, 498(1-3), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.076>
- Terlevic, R., Isola, M., Ragogna, M., Meduri, M., Canalaz, F., Perini, L., Rambaldelli, G., Travan, L., Crivellato, E., & Tognin, S. (2013). Decreased hypothalamus volumes in generalized anxiety disorder but not in panic disorder. *Journal of affective disorders*, 146(3), 390-394.
- Terzian, A. L. B., Aguiar, D. C., Guimarães, F. S., & Moreira, F. A. (2009). Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *European Neuropsychopharmacology*, 19(3), 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.11.004>
- Terzian, A. L. B., Dos Reis, D. G., Guimarães, F. S., Corrêa, F. M. A., & Resstel, L. B. M. (2014). Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 231(1), 149-157. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3211-9>
- Tom, R. L., Ahuja, A., Maniates, H., Freeland, C. M., & Robinson, M. J. (2019). Optogenetic activation of the central amygdala generates addiction-like preference for reward. *European Journal of Neuroscience*, 50(3), 2086-2100.
- Tominaga, M., & Julius, D. (2000). Capsaicin receptor in the pain pathway. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 83(1), 20-24.
- Tominaga, M., & Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 451(1), 143-150. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1457-8>
- Torales, J., Arce, A., Riego, V., Chávez, E., Villalba-Arias, J., & Ruiz-Díaz, C. (2015). Psicofarmacología de la ansiedad. *Tendencias en Medicina*, 26(46), 79-86.

- Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Édes, I., Csiba, L., & Blumberg, P. M. (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular Brain Research*, *135*(1-2), 162-168.
- Van Der Stelt, M., & Di Marzo, V. (2004). Endovanilloids: Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *European Journal of Biochemistry*, *271*(10), 1827-1834. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04081.x>
- van der Stelt, M., Fox, S. H., Hill, M., Crossman, A. R., Petrosino, S., Di Marzo, V., & Brotchie, J. M. (2005). A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(9), 1140-1142. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3010fje>
- Varga, A., Bölcskei, K., Szöke, E., Almasi, R., Czeh, G., Szolcsanyi, J., & Pethö, G. (2006). Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience*, *140*(2), 645-657.
- Vellani, V., Kinsey, A. M., Prandini, M., Hechtfisher, S. C., Reeh, P., Magherini, P. C., Giacomoni, C., & McNaughton, P. A. (2010). Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Molecular Pain*, *6*, 61. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-61>
- Vellani, V., Petrosino, S., De Petrocellis, L., Valenti, M., Prandini, M., Magherini, P. C., McNaughton, P. A., & Di Marzo, V. (2008). Functional lipidomics. Calcium-independent activation of endocannabinoid/endovanilloid lipid signalling in sensory neurons by protein kinases C and A and thrombin. *Neuropharmacology*, *55*(8), 1274-1279. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.010>
- Vennekens, R., Vriens, J., & Nilius, B. (2008). Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Current neuropharmacology*, *6*(1), 79-96.



- Vicente, M. A., & Zangrossi Jr, H. (2012). Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(3), 389-400.
- Vilela-Costa, H. H., Maraschin, J. C., Casarotto, P. C., Sant'Ana, A. B., de Bortoli, V. C., Vicente, M. A., Campos, A. C., Guimarães, F. S., & Zangrossi, H. (2021). Role of 5-HT1A and 5-HT2C receptors of the dorsal periaqueductal gray in the anxiety- and panic-modulating effects of antidepressants in rats. *Behavioural Brain Research*, *404*, 113159. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113159>
- Vriens, J., Appendino, G., & Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular Pharmacology*, *75*(6), 1262-1279. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055624>
- Wahl, P., Foged, C., Tullin, S., & Thomsen, C. (2001). Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Molecular pharmacology*, *59*(1), 9-15.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, *2*(2), 322-328.
- Walpole, C. S. J., Bevan, S., Bovermann, G., Boelsterli, J. J., Breckenridge, R., Davies, J. W., Hughes, G. A., James, I., Oberer, L., Winter, J., & Wrigglesworth, R. (1994). The Discovery of Capsazepine, the First Competitive Antagonist of the Sensory Neuron Excitants Capsaicin and Resiniferatoxin. *Journal of Medicinal Chemistry*, *37*(13), 1942-1954. <https://doi.org/10.1021/jm00039a006>
- Walther, D. J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, *299*(5603), 76-76.
- Wang, S. E., Ko, S. Y., Jo, S., Choi, M., Lee, S. H., Jo, H.-R., Seo, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y.-S., & Jung, S. J. (2017). TRPV1 regulates stress responses through HDAC2. *Cell reports*, *19*(2), 401-412.
- Waselus, M., Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. J. (2011). Collateralized dorsal raphe nucleus projections: A mechanism for the integration of diverse functions during stress. *Journal of chemical neuroanatomy*, *41*(4), 266-280.

- Weisstaub, N. V., Zhou, M., Lira, A., Lambe, E., González-Maeso, J., Hornung, J.-P., Sibille, E., Underwood, M., Itohara, S., & Dauer, W. T. (2006). Cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*, *313*(5786), 536-540.
- Wold, E. A., Wild, C. T., Cunningham, K. A., & Zhou, J. (2019). Targeting the 5-HT<sub>2C</sub> Receptor in Biological Context and the Current State of 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Ligand Development. *Current topics in medicinal chemistry*, *19*(16), 1381-1398. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190709101449>
- Woo, D. H., Jung, S. J., Zhu, M. H., Park, C.-K., Kim, Y. H., Oh, S. B., & Lee, C. J. (2008). Direct Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) by Diacylglycerol (DAG). *Molecular Pain*, *4*, 1744-8069-4-42. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-42>
- Wood, M. D., Reavill, C., Trail, B., Wilson, A., Stean, T., Kennett, G. A., Lightowler, S., Blackburn, T. P., Thomas, D., Gager, T. L., Riley, G., Holland, V., Bromidge, S. M., Forbes, I. T., & Middlemiss, D. N. (2001). SB-243213; a selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor inverse agonist with improved anxiolytic profile: Lack of tolerance and withdrawal anxiety. *Neuropharmacology*, *41*(2), 186-199. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00054-5)
- Yang, D., Jing, Y., Liu, Y., Xu, Z., Yuan, F., Wang, M., Geng, Z., & Tian, H. (2019). Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Attenuates Blood–Brain Barrier Disruption after Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Neurotrauma*, *36*(8), 1279-1290. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5942>
- Yang, M. H., Jung, S. H., Sethi, G., & Ahn, K. S. (2019). Pleiotropic Pharmacological Actions of Capsazepine, a Synthetic Analogue of Capsaicin, against Various Cancers and Inflammatory Diseases. *Molecules*, *24*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/molecules24050995>
- Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated Three-Chambered Social Approach Task for Mice. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, CHAPTER 8, Unit-8.26. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>

- You, I.-J., Jung, Y.-H., Kim, M.-J., Kwon, S.-H., Hong, S.-I., Lee, S.-Y., & Jang, C.-G. (2012). Alterations in the emotional and memory behavioral phenotypes of transient receptor potential vanilloid type 1-deficient mice are mediated by changes in expression of 5-HT1A, GABAA, and NMDA receptors. *Neuropharmacology*, *62*(2), 1034-1043.
- Zhuang, X., Gross, C., Santarelli, L., Compan, V., Trillat, A.-C., & Hen, R. (1999). Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology*, *21*(2), 52S-60S.
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, *400*(6743), Article 6743. <https://doi.org/10.1038/22761>

## ANEXOS

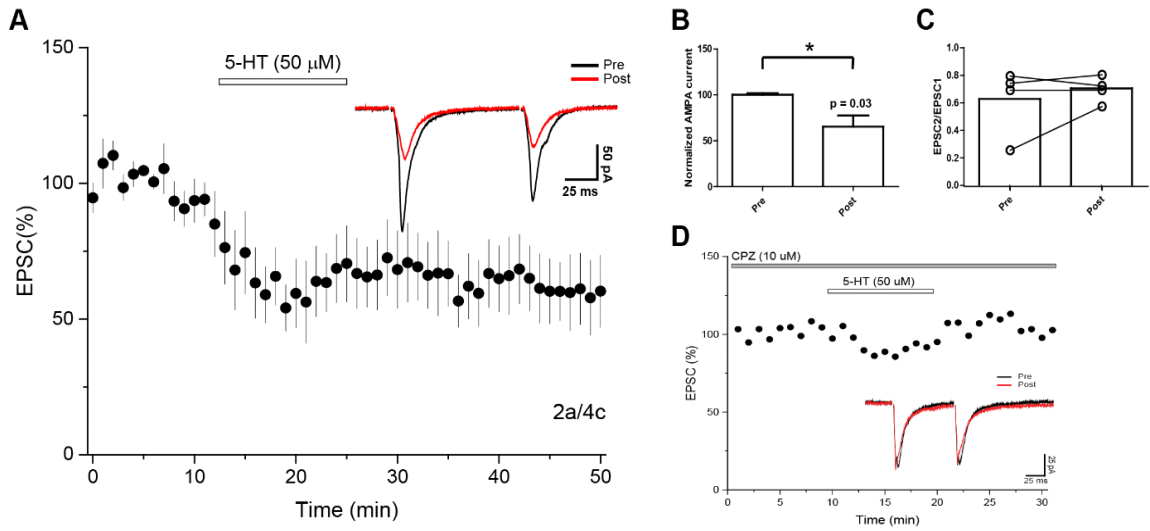


Figura 18. La serotonina deprime la transmisión excitatoria en las neuronas piramidales de la capa II/III. A-B.

En las neuronas fijadas a -60 mV, la exposición a 5-HT (50  $\mu$ M, 10 min) deprime significativamente la transmisión excitatoria. C. El efecto mediado por 5-HT no se acompaña de cambios en la relación EPSC2/EPSC1. D. El pretratamiento de las secciones con capsazepina (CPZ, 10  $\mu$ M; n = 1) bloquea el efecto mediado por 5-HT. Las comparaciones en B y C se realizaron con la prueba de Mann-Whitney U, la significancia se estableció en  $p < 0.05$ .

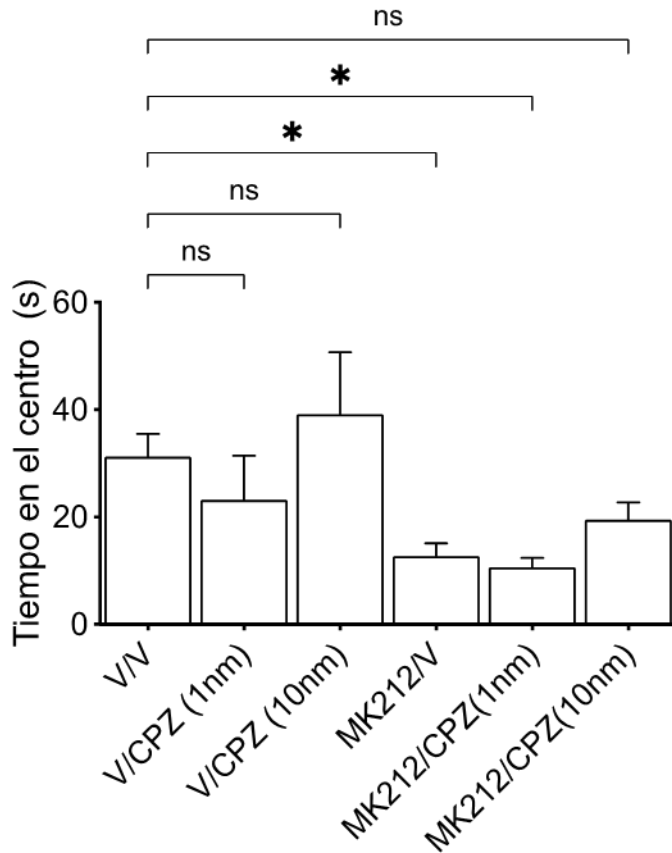


Figura 19. La administración local de CPZ en la amígdala revierte el efecto ansiogénico de MK212 de manera sistémica. Prueba de OFT. Tiempo en el centro. Barras representan la media  $\pm$  SEM. (n=?).  $p < 0.05$ .

En el OFT, la frecuencia de entrada al centro de la arena observada en los animales WT tratados con vehículo (V/V 0,5 ul/0,5ul, inyección sistémica e inyección local) no fue significativamente distinta a la observada en animales tratados localmente con CPZ 1nm (V/V  $31.25 \pm 4.25$  vs V/CPZ(1nm)  $23,1 \pm 8.29$ ,  $p= 0.1472$ ) o a aquellos tratados con CPZ 10 nm (vs CPZ(10nm)  $39,16 \pm 11.53$ ,  $p>0.999$ ).

La administración sistémica de MK212 generó un efecto tipo ansioso determinado por la reducción significativa del tiempo en el centro (V/V  $31.25 \pm 4.25$  vs MK212/V  $12,72 \pm 2,39$ ,  $p=0.330$ ). La inyección de CPZ 10nm local antagonizó el efecto MK212 sistémico (V/V  $31.25 \pm 4,25$  vs MK212/CPZ10nm  $19.51 \pm 3.22$ ,  $p>0.999$ ). No se observó efectos en otros parámetros

relativos a ansiedad en el EPM y LDT, ni tampoco hubo efectos significativos en la actividad locomotora.