



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES CANABINOIDES
CB2 Y GPR55 EN EL NÚCLEO VENTRAL
POSTEROLATERAL DEL TÁLAMO DE LA RATA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

LUCERO AGUILAR CARRILLO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Enero de 2022.

RESUMEN

El Sistema Endocanabinoide está compuesto por los ligandos o endocannabinoides, las enzimas involucradas en la biosíntesis o la degradación de endocannabinoides y los receptores canabinoides. Los receptores canabinoides mayormente estudiados son los receptores CB1, CB2 y GPR55, que al ser activados provocan resultados variados sobre los organismos vivos. La propiedad antinociceptiva ha sido observada al activar cualquiera de los tres principales receptores canabinoides, pero en el caso de CB2 y GPR55, los efectos colaterales parecen no ser adversos. Por ello, resulta destacable poder describir la posibilidad de que los receptores cannabinoides CB2 y GPR55 pudieran tener actividad analgésica como un dímero. En la presente investigación, se rastreó el heterómero CB2 – GPR55 en el núcleo ventral posterolateral (VPL) del tálamo de la rata, ya que se sabe que este núcleo forma parte de la vía ascendente del dolor y, por ello, participa en la recepción y discriminación de los estímulos dolorosos en su ruta hacia la corteza cerebral. Mediante el uso de técnicas analíticas (Western blot, Wb) e inmunológicas (Co-inmunoprecipitación, Co-ip), se realizaron abordajes para la localización de ambas proteínas en el núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata. Una vez que se logró una aproximación para poder sugerir que ambos receptores pueden existir como dímero en el núcleo ventral posterolateral del tálamo, se utilizaron técnicas de inmunomarcaje (inmunofluorescencia, IF) para dar soporte a estos resultados. Después de haber obtenido resultados positivos sobre la posible presencia de este dímero en el núcleo ventral posterolateral de la rata, se realizaron ensayos de Latencia de Retirada de la Cola (LRC, Tail Flick Test), en ratas Wistar para determinar si dicho complejo de receptores podría ejercer algún efecto funcional en animales vivos. Los agonistas sintéticos de GPR55 y de CB2 fueron administrados por vía intratálamica, previo a la prueba de Latencia de Retirada de la Cola. A dosis de 1 μ M y de 100 μ M, respectivamente, se observaron aumentos en las lecturas de las latencias, cuando los agonistas fueron administrados de forma simultánea y también cuando el agonista de GPR55 fue administrado de forma individual, lo cual sugirió que los efectos de la activación del receptor CB2 podrían estar influenciados por la activación del receptor GPR55, en este modelo de dolor agudo.

ABSTRACT

The Endocannabinoid System is composed by the ligands or endocannabinoids, the degrading and biosynthesizing enzymes, and the endocannabinoid receptors. The most studied cannabinoid receptors are the CB1, CB2, and GPR55, which when activated induce a variation of results on living organisms. The antinociceptive property has been noticed when any of the three mainly studied cannabinoid receptors is activated, but in the case of CB2 and GPR55, the collateral effects seem not to be adverse. Therefore, it is remarkable to describe the possibility that the cannabinoid receptors CB2 and GPR55 could be able to have analgesic activity being a dimer. In this study, we traced the possible existence heteromer CB2 – GPR55 in the ventral posterolateral (VPL) nucleus of the rat thalamus, in order to the knowledge that this nucleus is part of the ascending pathway of pain and therefore, it participates in the reception and discrimination of algic stimuli, that then will follow or not their course up to the cerebral cortex. Through the use of analytic (Western blot, Wb) and immunologic (Co-immunoprecipitation, Co-ip) techniques, the location of both proteins in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus of the rat was assayed. After the Co-immunoprecipitation and Western blot showed results that suggest that both receptors could exist as a dimer in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus rat, we used an immunolabeling technique (immunofluorescence, IF) to bear out such results. After obtaining positive results about the possible presence of this dimer in ventral posterolateral nucleus of the thalamus, it was assayed a Tail Flick Test, in Wistar rats to determine if that complex could exert any functional effect in live animals. The synthetic agonists of GPR55 and CB2 were administered by intrathalamic route previous to the tail flick test. At doses of 1 μ M and 100 μ M, respectively, there were observed augmentations in the latencies when the agonists were administered together, or when the GPR55 agonist was administered alone, so it is suggested that CB2 receptor effects could be influenced by the activation of GPR55 receptor, in this acute pain model.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	SISTEMA ENDOCANABINOIDE.....	3
2.2	CLASIFICACIÓN DE LOS CANABINOIDES.....	4
2.3	EL TÁLAMO.....	6
2.4	VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN SENSORIAL.....	8
2.5	CLÍNICA TERAPÉUTICA.....	10
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
4	HIPÓTESIS.....	14
5	OBJETIVO GENERAL.....	15
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1	ANIMALES.....	16
6.2	PREPARACIÓN DE REBANADAS DE CEREBRO.....	16
6.3	PREPARACIÓN DE SINAPTOSOMAS.....	16
6.4	Co – INMUNOPRECIPITACIÓN (CO-IP).....	17
6.5	WESTERN BLOTTING.....	17
6.6	INMUNOFLUORESCENCIA (IF) EN REBANADAS.....	18
6.7	EVALUACIÓN CONDUCTUAL.....	18
6.7.1	<i>Implantación bilateral de cánulas intratalámicas.....</i>	<i>18</i>
6.7.2	<i>Prueba de Latencia de Retirada de la Cola (LRC).....</i>	<i>20</i>
6.7.3	<i>Histología.....</i>	<i>21</i>
7	RESULTADOS.....	22
7.1	LOS RECEPTORES CB2 Y GPR55 SE EXPRESAN EN EL NÚCLEO VENTRAL POSTEROLATERAL (VPL) DEL TÁLAMO DE LA RATA.....	22
7.2	EL RECEPTOR CB2 SE EXPRESA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y CITOPLASMA DE NEURONAS DEL NÚCLEO VENTRAL POSTEROLATERAL (VPL) DEL TÁLAMO DE LA RATA.....	22
7.3	LOS RECEPTORES CANABINOIDES TIPO 2 Y GPR55 AUMENTAN LA LATENCIA DURANTE LA PRUEBA DE RETIRADA DE LA COLA, AL SER ADMINISTRADOS DE FORMA INTRATALÁMICA.....	23
8	DISCUSIÓN.....	25
9	CONCLUSIONES.....	29
10	CUADROS, GRÁFICAS Y FIGURAS.....	30
11	BIBLIOGRAFÍA.....	45

1 Introducción general.

Los receptores canabinoides han sido el objetivo de experimentos relacionados con el dolor (Bagüés et al., 2014; Sagar et al., 2012; Rahn & Hohmann, 2009). Sin embargo, en forma similar a lo que sucede cuando los receptores canabinoides son activados, el uso de receptores opioides como analgésicos es útil para el tratamiento de diferentes tipos de dolor, pero sus efectos colaterales son características importantes que no deben ser inadvertidas por el clínico, para no producir detrimento en la funcionalidad mental del paciente (Cichewicz, 2004, Gomes et al., 2000; E. B. Russo, 2008).

El primer receptor canabinoide que fue utilizado para prevenir o disminuir el dolor fue el receptor canabinoide tipo 1. Uno de los productos desarrollados para uso terapéutico fue Sativex®, el cual es un modulador del sistema endocanabinoide que se administra a pacientes con dolor neuropático originado por esclerosis múltiple. Funciona como un agonista parcial sobre los receptores canabinoides humanos tipo 1 y 2, en vías corticales específicas, y ha demostrado mejores resultados en pacientes sin daño desmielinizante sobre las fibras nerviosas (M. Russo et al., 2016). Este producto ha sido clínicamente probado evaluando su eficacia y seguridad, y aun cuando su uso no causa desarrollo de tolerancia a sus ingredientes activos (Serpell et al., 2013), si causa efectos secundarios como desordenes gastrointestinales o sedación (Nurmikko et al., 2007). Otros autores han reportado que su efecto analgésico no es significativo, y que factores como el estado depresivo pueden interferir con el proceso normal de antinocicepción (Selvarajah et al., 2010).

El segundo receptor canabinoide que ha sido sujeto de estudio en el área de la analgesia, es el canabinoide tipo 2. Su activación puede producir efectos sobre la nocicepción y se ha evaluado en las diversas presentaciones del dolor: somático, visceral, agudo, crónico y neuropático (Curto-Reyes, Llames, Hidalgo, Menéndez, & Baamonde, 2010). Se ha sugerido que una baja expresión o la ausencia de este receptor en neuronas del sistema nervioso central, podría ser la razón de la ausencia de efectos adversos a este nivel (Schatz et al., 1997). Otros autores como Ibrahim et. al. sugieren que es

posible que la activación del receptor CB2 estimule la liberación de endorfinas β opioides endógenas desde los queratinocitos, que actúan sobre los receptores opioides, sobre neuronas aferentes primarias inhibiendo la nocicepción (Ibrahim et al., 2005).

El tercer receptor canabinoide, GPR55, al parecer participa en la excitabilidad del ganglio de la raíz dorsal (Lauckner et al., 2007), en la memoria procedimental (Marichal-cancino et al., 2017), en la regulación del crecimiento de la morfología del cono y el crecimiento del axón de la retina durante el desarrollo en los roedores (Cherif et al., 2015), y en la regulación de la hipersensibilidad neuropática. Los modelos de dolor utilizados por Staton et. al. para estudiar el dolor neuropático en roedores, mostraron que cuando el gen de GPR55 fue eliminado, el dolor inflamatorio y neuropático fue abolido en ratones, debido a la falta de un evento común durante la inflamación producida por la ausencia del gen (Staton et al., 2008). No obstante, otros autores han afirmado que la presencia del gen de GPR55 no es el responsable de modificar el desarrollo del dolor crónico patológico en modelos de roedores (Carey et al., 2017), pero es necesario realizar más investigaciones acerca del comportamiento de este receptor y el uso de ligandos selectivos hacia él.

Adicionalmente, desde 1980, Ferré & Franco (Ferré & Franco, 2011) reportaron que la mayoría de los receptores que pertenecen a la clase A de proteínas G, como los canabinoides, pueden ser detectados como homómeros y heterómeros (Fuxe et al., 2014a, b). los receptores canabinoides CB2 y GPR55 han sido estudiados como un heterodímero por Balenga y colaboradores, quienes desarrollaron estudios en los que ambos receptores mostraron co-localización y diafonía. Sus observaciones fueron realizadas en neutrófilos humanos (Balenga et al., 2011) y también en células HEK293 (Balenga et al., 2014), y ambos estudios mostraron que la señalización de GPR55 es afectada durante su co-expresión con CB2. El uso de este dímero a nivel talámico podría representar una alternativa para el manejo del dolor, pero es necesario evaluar a detalle tanto su expresión como sus efectos analgésicos en un modelo animal.

2 Revisión de literatura.

2.1 Sistema endocanabinoide.

El sistema endocanabinoide, inicialmente fue descrito como el conjunto de ligandos endógenos, enzimas y receptores que al activarse pueden provocar efectos como analgesia, efectos antiinflamatorios y regulación de la obesidad (Di Marzo & Piscitelli, 2015; Izzo et al., 2009; Kreitzer & Stella, 2009).

Los ligandos de este sistema endocanabinoide son conocidos como endocanabinoides y a diferencia de los neurotransmisores clásicos, no se almacenan, sino que se sintetizan como respuesta a la despolarización de las neuronas. Los dos endocanabinoides mejor caracterizados son la araquidonoiletanolamida (anandamida) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG), que son biosintetizados mediante Fosfolipasa D específica de N-acil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasas (DAGL) α y β , para anandamida y 2-AG, respectivamente, mientras que su inactivación hidrolítica ocurre por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), para la anandamida y 2-AG, respectivamente. En la Figura 1 se muestra cómo los ligandos endógenos también llamados endocanabinoides, actúan como mensajeros retrógrados, es decir, que son liberados por neuronas postsinápticas y atraviesan la hendidura sináptica para estimular los receptores canabinoides en las terminales presinápticas (Ahn et al., 2008; Wilson et al., 2012).

La activación de los receptores induce un cambio conformacional en la subunidad alfa de la proteína G asociada, lo que origina la liberación de GDP (guanosín difosfato) seguida por la unión de GTP (guanosín trifosfato). Subsecuentemente, la forma de GTP unida de la subunidad alfa (α) se disocia del receptor, así como del dímero estable beta-gamma ($\beta\gamma$). Tanto la subunidad α unida a GTP, como el dímero liberado $\beta\gamma$ pueden estimular moléculas efectoras como la adenil y la guanilil ciclasas, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa A2 (PLA₂), la fosfolipasa C (PLC) y la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), las cuales activan o inhiben la producción de segundos mensajeros como adenosín monofosfato cíclico (AMPC), guanosín monofosfato cíclico (GMPc),

diacilglicerol, inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP3), ácido araquidónico y ácido fosfatídico, además de regular la actividad de los canales de calcio dependientes del voltaje y de los canales tipo GIRK e inhibir la liberación de neurotransmisores (Hamm & Hamm, 1998; Howlett et al., 2002; Marinissen & Gutkind, 2001).

2.2 Clasificación de los cannabinoides.

De acuerdo a su origen, los cannabinoides se pueden clasificar como:

1. Endocannabinoides o cannabinoides endógenos, los cuales son producidos por el organismo;
2. Fitocannabinoides o cannabinoides de origen vegetal, los cuales se encuentran en la resina oleosa de brotes y hojas de la planta de marihuana;
3. Cannabinoides sintéticos, que son cannabinoides preparados en universidades y en laboratorios de compañías farmacéuticas (Lee, 2012).

Los endocannabinoides son sustancias consideradas como mediadores lipídicos y en éstos se incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadenas largas poliinsaturadas. Estas sustancias se localizan en el cerebro, la médula espinal y diversos tejidos periféricos y órganos (Ahn et al., 2008; Battista et al., 2012; Hazekamp et al., 2013) de peces, reptiles, lombrices de tierra, sanguijuelas, anfibios, aves, mamíferos y casi todos los animales excepto los insectos (Lee, 2012).

Los fitocannabinoides se definen químicamente como sustancias con una estructura carbocíclica con 21 carbonos, formados generalmente por tres anillos, ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno (Cannabinoides, n.d.). que poseen propiedades hidrofóbicas, por lo que son muy solubles en lípidos. A diferencia de los cannabinoides endógenos y de los sintéticos, los fitocannabinoides son hidrocarburos aromáticos que contienen oxígeno, y en contraste con otros fármacos, incluyendo opiáceos, cocaína, nicotina y cafeína, los cannabinoides no contienen nitrógeno, por lo que no son alcaloides (Grotenhermen, 2006). Los principales fitocannabinoides son el delta 9-tetrahidrocannabinol, el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN) pero la planta

cannabis también posee otros cannabinoides que son el cannabícromeno (CBC), cannabíciclol (CBL), cannabigerol (CBG), monometiléter del cannabigerol (CBGM), cannabielsoina (CBE), cannabítriol (CBT), dehidrocannabifurano y canabicitrano, los cuales aparecen en cantidades diferentes según la variedad de *Cannabis sativa* valorada (Cannabinoides, n.d.). De estos fitocannabinoides, el delta 9- tetrahidrocannabinol (Δ^9 THC) posee propiedades como analgésico, antiinflamatorio, inmunosupresor, anticonvulsivo, regulador de la presión intraocular en el glaucoma y atenuador del vómito. Sin embargo, sus propiedades psicoactivas limitan su uso clínico. En contraste, el canabidiol (CBD) es no-psicoactivo y posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas (Grotenhermen, 2006).

Los receptores de estas sustancias cannabinoides mayormente estudiados son los receptores cannabinoides tipo 1 y tipo 2, CB1 y CB2, respectivamente. Estos receptores poseen siete dominios transmembranales y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, integrantes de la clase A, que son receptores similares a rodopsina. El receptor GPR55 también se clasifica en esta familia sin importar que posee baja identidad aminoacídica con los receptores cannabinoides CB1 (13.5%) y CB2 (14.4%) (Shore & Reggio, 2015). En cambio CB1 y CB2 comparten entre sí un 44% de identidad en su secuencia aminoacídica completa (Bouaboula et al., 1996) y un 68% de identidad cuando se comparan solamente sus regiones transmembranales que constituyen el dominio putativo de unión al ligando (Schatz et al., 1997).

La secuencia de ADN para el primer receptor descrito, CB1, fue codificada en 1990 por Lisa Matsuda. Esta secuencia fue determinada con precisión en el cerebro de la rata, y se sabe que el cerebro humano también posee ese receptor, que consiste de 472 aminoácidos unidos en una cadena plegada siete veces a través de la membrana celular (Lee, 2012).

El reporte de CB2 sucedió en 1993 por parte de Munro y cols. (Munro S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, 1993) al lograr la clonación de este receptor. Ellos señalaron su expresión en macrófagos y en zona marginal del bazo pero aseguraban que no estaba en el cerebro. Ahora se sabe que este receptor se

expresa predominantemente en las células del sistema inmune, donde aparentemente participa en la mediación de efectos inmunosupresivos (Ahn et al., 2008) pero también está presente en el estómago, los testículos, los pulmones, los riñones, el intestino, el hígado, el corazón, los huesos, los vasos sanguíneos, las glándulas endocrinas (Lee, 2012; Marchalant et al., 2014) y en diversas regiones del cerebro, tanto en las neuronas como en la glía.

En 1999, Sawzdargo y cols. (Sawzdargo et al., 1999) identificaron y clonaron tres nuevos genes de receptores acoplados a proteínas G: GPR55, GPR52 y Ψ GPR53. Identificaron transcritos de ARNm de GPR55 de 4.3, 7.0 y 10-kb en el núcleo caudado y el putamen en el cerebro humano, pero no identificaron evidencia de su expresión en el tálamo, el hipocampo, el puente, el cerebelo, la corteza frontal del cerebro, ni en el hígado. A diferencia del humano, en rata y ratón se han hallado los homólogos de GPR55 en los núcleos talámicos, la corteza frontal, el hipocampo, el tallo cerebral y regiones del mesencéfalo, así como en tejidos periféricos como el yeyuno, el íleon, el colon, el bazo, los pulmones, el hígado, el útero, la vejiga, los riñones, los huesos, las glándulas adrenales y células del sistema inmune como monocitos y linfocitos granulares. El receptor GPR55 tiene un ligando endógeno llamado lisofosfatidilinositol (LPI) que no es un canabinoide y por lo tanto no activa a los receptores CB1 ni CB2. Sin embargo, también se puede activar por endocannabinoides por lo que se ha considerado que se podría clasificar como el receptor canabinoide tipo 3 (Cherif et al., 2015; Chiurchiù et al., 2014; Gasperi et al., 2013; Godlewski et al., 2009).

2.3 El tálamo.

En 1964 Gaoni y Mechoulam (Gaoni & Mechoulam, 1964) determinaron la estructura química del principal ingrediente psicoactivo de la marihuana, el Δ^9 THC, el cual activa al receptor canabinoide tipo 1 en el sistema nervioso central. El sistema nervioso central controla gran variedad de funciones como son el aprendizaje y la memoria (hipocampo) (Friedman et al., 1997; Pope et al., 2003), la modulación de la actividad locomotora y vías de recompensa (ganglios basales) (Fernández-ruiz, 2009), el control del apetito (hipotálamo) (J Irving et al., 2002) y la modulación del dolor (periacueducto gris y tálamo) (Deliu et al., 2015; Jhaveri et al., 2008).

El sistema nervioso central está formado por el encéfalo y la medula espinal. La porción del encéfalo se divide en:

1. Los hemisferios cerebrales,
2. El diencéfalo,
3. El cerebro medio,
4. El metencéfalo y,
5. El bulbo raquídeo (Martinez, 2015).

El diencéfalo está constituido por dos estructuras que son el tálamo y el hipotálamo (Figura 2). De estas dos estructuras, el tálamo es la estructura más grande del diencéfalo y posee dos masas voluminosas de sustancia gris situadas a cada lado del tercer ventrículo. Estas masas se encuentran divididas por la lámina interna y externa en porciones lateral y medial (Martinez, 2015).

Cada masa se divide en diferentes segmentos: núcleos anteriores, núcleos laterales, grupo medial y grupo posterior. Los núcleos laterales se dividen en:

1. Núcleo ventral anterior,
2. Núcleo ventral lateral y,
3. Núcleo ventral posterior: dentro de este núcleo se encuentra el núcleo ventral posterolateral (VPL) que es el centro donde terminan los fascículos espinotalámicos del lemnisco medio, conductores de sensibilidad, tacto, temperatura y cinestesia (Suárez, 2008).

Estos núcleos talámicos también se pueden clasificar según su tipo de función en sensoriales, motores o inespecíficos:

1. Los núcleos sensoriales talámicos son estaciones de relevo de todos los sistemas sensoriales excepto el olfativo, proyectando a las cortezas sensoriales primarias (Martin et al., 1996);
2. Los núcleos motores talámicos reciben proyecciones desde el cerebelo y ganglios basales y proyectan a la corteza motora de asociación;
3. Otros núcleos son estaciones de relevo para proyecciones que se dirigen hacia el sistema límbico. Así mismo, dado que los núcleos inespecíficos del tálamo son el lugar donde terminan las proyecciones de SARA (Sistema

Activador Reticular Ascendente), el tálamo se convierte en un importante centro nervioso relacionado con funciones de *arousal* (activación general fisiológica y psicológica del organismo) y de producción del sueño (Cerebral & Rom, n.d.).

2.4 Vías de procesamiento de la información sensorial.

Las vías somatosensitivas ascendentes que participan en el procesamiento de la información sensorial tienen su origen en la médula espinal y el tronco encefálico y convergen en el tálamo. En esta estructura, el tálamo, existe una porción denominada complejo ventral posterior que es el objetivo principal de estas vías ascendentes. Dentro de este complejo, el núcleo ventral posterolateral (VPL) recibe proyecciones desde el lemnisco medial que transmiten toda la información somatosensitiva desde el cuerpo y la región posterior de la cabeza, mientras que el núcleo ventral posteromedial (VPM) recibe axones desde el lemnisco trigeminal con información mecanosensitiva y nociceptiva del rostro. La vía principal que transmite información de los estímulos nociceptivos hasta el encéfalo es conocida como tracto espinotalámico o sistema anterolateral. En esta vía (Figura 3), los axones centrales de las células nerviosas nociceptivas entran en la médula espinal a través de las raíces dorsales (o sensitivas). Estas células se conocen como neuronas de primer orden porque inician el proceso sensitivo. En estas neuronas sucede la activación de los complejos formados por receptor-canal iónico, lo cual produce una corriente de despolarización en respuesta al estímulo nocivo. Esta despolarización origina un potencial de acción que promueve la liberación de neurotransmisores al momento en que los axones de estas neuronas llegan al asta dorsal (Reichlig, 1999). Aquí los axones se ramifican en colaterales ascendentes y descendentes, formando el tracto dorsolateral de Lissauer. Posteriormente, los axones penetran en la sustancia gris del asta dorsal y ahí dan origen a ramas que hacen contacto con neuronas denominadas láminas de Rexed (Craig et al., 1994). Las fibras tipo A δ de estos axones contactan con neuronas de la lámina I, II, y III y de ahí van hacia los tractos espinotalámicos y espinoreticulares hasta centros superiores (Figura 3). Las fibras tipo C conectan con neuronas de estas láminas, con

interneuronas, con motoneuronas, y con neuronas simpáticas produciendo reflejos espinales y las manifestaciones simpáticas del dolor agudo y crónico. Ascienden por los mismos tractos pero de forma lenta, traduciendo una sensación difusa del dolor. Por los tractos espinoreticulares llegan a la formación reticular y de allí al sistema límbico e hipotálamo. La información de la lámina II es transmitida a neuronas de proyección de segundo orden en las láminas IV, V y VI. Las neuronas de segundo orden en las láminas IV – VI atraviesan la línea media y ascienden hasta el tronco encefálico y el tálamo en el cuadrante anterolateral (ventrolateral) de la mitad contralateral de la médula espinal, a diferencia de la vía mecanosensitiva que asciende homolateralmente (Purves, D., 2001). Estos axones también llegan a la formación reticular, núcleo magno del rafe y sustancia gris periacueductal, que son zonas espinales donde se originan las vías descendentes (Perena et al., 2000).

Debido a la integración existente entre el sistema motor y simpático, las neuronas aferentes del asta dorsal sinaptan directamente e indirectamente con las neuronas motoras del asta anterior. Esta sinapsis será responsable de la actividad muscular refleja (normal o patológica) asociada al dolor. Las sinapsis entre las neuronas aferentes nociceptivas y las neuronas simpáticas de la columna intermedio - lateral resultarán en un reflejo simpático que se manifestará como una vasoconstricción, un espasmo muscular suave, y como una liberación de catecolaminas (Perena et al., 2000)

En el tálamo de la rata se ha evidenciado que los axones que se originan de las neuronas del complejo ventral posterior se proyectan hacia las neuronas corticales localizadas en la capa IV y mínimamente en la capa I de la corteza somatosensitiva, que comprende cuatro regiones distintas, o campos, conocidas como áreas 3a, 3b, 1 y 2 de Brodmann. El área 3b por lo general se conoce como corteza somatosensitiva primaria (SI), pero las cuatro áreas participan en el procesamiento de la información táctil (Schusdziarra et al., 1980).

2.5 Clínica terapéutica.

Los productos de consumo que pueden ser obtenidos a partir de la planta de Cannabis son los extractos de las flores secas, brotes y hojas que son conocidos como cannabis o marihuana, y el hashish que se obtiene de la resina secretada por las flores de las plantas femeninas (Manzanares et al., 2006). Sin embargo, cuando los consumidores fuman, comen o toman cualquiera de estos productos vegetales, es difícil determinar el origen de los efectos experimentados, debido a la diversidad de fitocannabinoides y otras clases de químicos presentes en la planta (Cabral et al., 2015). El compuesto psicoactivo de Cannabis, el Δ^9 THC, ejerce acción sobre el receptor más abundante del sistema nervioso central, el receptor CB1. Este receptor canabinoide presenta altos niveles de expresión en hipocampo, corteza, cerebelo y ganglios basales, lo que presumiblemente origina los efectos adversos del Δ^9 THC sobre la memoria y la cognición (Ahn et al., 2008; Wilson et al., 2012). Su activación en el hipotálamo produce estimulación del apetito en roedores (Arnone et al., 2003), y su expresión en la médula espinal ha indicado que puede tener cierta participación en los procesos nociceptivos (Sagar et al., 2005). Además del sistema nervioso, los órganos y tejidos periféricos en los que se ha identificado CB1 son glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y algunas partes de los tractos urinario, reproductivo y gastrointestinal. Como consecuencia de la diversidad de tejidos en los que se ha encontrado la expresión del receptor de CB1 y en los que la activación de este receptor puede ejercer algún efecto, se desarrollaron productos comerciales que actuaban sobre CB1. Dentro de estos productos, uno de los más conocidos es el rimonabant, un antagonista selectivo del receptor CB1 (y agonista de los receptores GPR55), el cual bloquea la estimulación del apetito. Por esta razón, el producto bajo el nombre comercial Acomplia estuvo disponible en Europa en 2006, y aunque la FDA en Estados Unidos no lo aprobó, si se vendió rimonabant como Zimulti para el manejo de la obesidad y de riesgos cardiometabólicos relacionados. No obstante, su uso provocaba efectos secundarios adversos que incluían vómito, náusea, hipertensión, alucinaciones, insomnio, fatiga y mareo, así como trastornos psiquiátricos graves como la depresión y el suicidio como consecuencia de la interrupción

del tratamiento. Éstos últimos se observaron en pacientes que tomaron dosis de 20 mg/día en el programa de pruebas clínicas del rimonabant de RIO-Norteamérica, aunque Pi-Sunyer et. al. (Pi-Sunyer, et. al., 2006) solo reportaron la náusea como el efecto adverso más relevante. Sin embargo, posteriores investigaciones del uso de antagonistas de CB1 con acción restringida a la periferia y penetración limitada al cerebro, han mostrado reducción en los efectos promotores del miedo, a nivel conductual (Micale, et. al., 2019); y a nivel hepático, se ha observado su efecto antifibrogénico en modelos preclínicos de hígado graso no alcohólico (Mallat et al., 2013), evitando aparentemente los efectos psicoactivos. A pesar de estos avances, el receptor CB1 sigue siendo considerado poco aplicable en terapias medicas debido a sus posibles efectos secundarios, por lo cual se han investigado alternativas de manipulación de componentes del sistema endocanabinoide. La manipulación de las enzimas degradadoras de los endocanabinoides se ha utilizado para evaluar la analgesia previniendo la presencia de efectos secundarios adversos. Tal es el caso de la utilización de un inhibidor de la enzima ácido graso hidrolasa (FAAH) de acción periférica restringida, el URB937, aplicado en un modelo de contorsiones peritoneales inducidas por ácido acético. El compuesto URB937 atenuó la hiperalgnesia térmica y suprimió la hiperalgnesia mecánica, así como la alodinia mecánica, pero no así la reactividad a estímulos cutáneos. En el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético, el mismo compuesto, con una ED₅₀ de 0.1 mg·kg⁻¹, mostró una eficacia comparable con la provocada por los inhibidores de FAAH que penetran el sistema nervioso central. Los autores sugirieron que la inhibición periférica de FAAH magnifica un mecanismo analgésico endógeno mediado por anandamida (Van Sickle et al., 2005), y es probable la contribución de otros receptores entre los que mencionaron a PPAR-α y CB2. La actividad antiinflamatoria del receptor CB2 ha sido evaluada en modelos animales como el de traumatismo cerebral de Yu et. al., en el que se utilizó un agonista de CB2 (AM1241) durante la fase temprana posterior a un traumatismo, y se suprimió la neurodegeneración en animales (Yu et al., 2015). Sin embargo, un modelo de artritis reumatoide (Gui et al., 2014), no permitió determinar la actividad protectora o la antiinflamatoria, aun cuando si se expresó el receptor y se activó específicamente sobre los sinoviocitos tipo fibroblasto. Otros autores como Jhaveri y colaboradores

(Jhaveri et al., 2008) previamente habían sugerido la posibilidad de la adición de efectos inhibitorios de los receptores CB2 supraespinales sobre la acción analgésica de los receptores CB2 periféricos. Jhaveri et. al. realizaron una evaluación en un modelo de alodinia mecánica en ratas administrando un agonista selectivo de CB2, JWH-133, el cual inhibió significativamente la actividad espontánea y evocada de las neuronas del VPL en ratas con ligadura espinal, pero no en ratas con ligadura simulada. El efecto sugirió poco control de las respuestas neuronales tras la administración intratálámica del agonista de CB2, durante situaciones no patológicas. En situaciones patológicas mentales como la esquizofrenia (Ishiguro et al., 2010), se ha detectado baja función de CB2; y en patologías inducidas experimentalmente como la encefalitis autoinmune, se ha identificado, además de la activación de las células de la microglía, un aumento en la expresión del ARNm del receptor CB2 de hasta 100 veces, lo cual sugiere la posible influencia de este receptor durante la inflamación inducida de forma autoinmune (Maresz et al., 2005). El receptor GPR55 también se ha identificado en el sistema inmune, en los monocitos y en las células asesinas, por lo cual se ha inferido que este receptor participa como proinflamatorio y estimulador de células inmunes innatas (Chiurchiù et al., 2014). En respuesta al microambiente tumoral, se ha observado que la activación de GPR55 modula la migración, orientación y polarización de las células cancerígenas de mama (Moreno et al., 2014). De igual forma, en los procesos de cáncer de piel, de próstata y de ovario, las expresiones de ARNm y de proteína de GPR55 están presentes y se ha demostrado que aumenta el crecimiento independiente de estas líneas celulares cancerígenas (Shore & Reggio, 2015).

3 Planteamiento del problema.

La planta *Cannabis sativa* contiene un ingrediente activo conocido como Δ^9 -THC, el cual es mimetizado por el sistema endocanabinoide que está presente en los mamíferos. Este sistema endocanabinoide se constituye por endocannabinoides, enzimas de biosíntesis y de degradación y receptores cannabinoides los cuales están distribuidos en diferentes órganos, incluido el Sistema Nervioso Central (Lauckner et al., 2005; Pertwee, 2015). Los receptores cannabinoides más estudiados son el CB1, el CB2 y el GPR55 y se sabe que entre ellos pueden formar asociaciones proteicas conocidas como dímeros o trímeros, según el número de moléculas asociadas (Ferré & Franco, 2011).

A pesar de la continua investigación acerca de este sistema endocanabinoide y los efectos tras la activación de sus receptores, la localización de éstos en los tejidos, así como sus vías de señalización, no están completamente definidos por lo que no se sabe si el dímero CB2-GPR55 observado en sistemas heterólogos (N. A. Balenga et al., 2014) podría expresarse en un sistema nativo como lo es el tálamo de la rata. La posibilidad de identificar el dímero en este tejido aportaría información de la modulación de estos receptores en el procesamiento de mecanismos motores y de percepción sensorial.

4 Hipótesis.

Los receptores canabinoides CB2 y GPR55 forman un dímero estructural en las neuronas del núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata.

5 Objetivo general.

Demostrar la dimerización entre los receptores CB2 y GPR55 en el núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata.

5.1 Objetivos específicos.

Determinar la dimerización mediante la co-inmunoprecipitación de los receptores canabinoideos CB2 y GPR55 en neuronas del núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata.

Evidenciar la localización ultraestructural del receptor CB2 mediante inmunofluorescencia en neuronas del núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata.

Evaluar si existe algún efecto sobre la modulación del dolor agudo *in vivo* en ratas, debido a la activación de los receptores CB2 y GPR55 en el núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata.

6 Materiales y métodos.

6.1 Animales.

Se utilizaron ratas Wistar macho (con peso de 190-220 gramos). Todos los procedimientos descritos fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV – IPN, Ciudad de México) cuyo bioterio opera bajo el registro SAGARPA AUT-B-C-0114-007. Asimismo, se observaron las indicaciones establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (2011) así como en la NOM 062-ZOO-1999-2011: capítulo 7-apartados: 2.1.1.c., 7.4.1.2.; capítulo 9-apartado: 5.3.2.1. (Uso & Laboratorio, 2001), realizando siempre todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

6.2 Preparación de rebanadas de cerebro.

Se utilizaron 18 ratas para obtener rebanadas de la porción ventral posterolateral del tálamo. Posterior al sacrificio rápido de los animales, los cerebros se sumergieron en solución oxigenada y congelada de fluido artificial espinal (aCSF) con la siguiente composición (mM): 118.25 NaCl, 1.75 KCl, 1 MgSO, 1.25 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl, y 10 D-glucosa. Se obtuvieron las rebanadas coronales de cerebro (400 µm de grosor) utilizando un vibratomo (Campden Inc., Cambridge UK) (Gonzalez et al., 2009). Se realizó microdissección de la porción ventral posterolateral del tálamo utilizando un microscopio estereoscópico. El núcleo de interés fue identificado de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997).

6.3 Preparación de sinaptosomas.

Las fracciones sinaptosomales fueron aisladas a partir de rebanadas de la porción ventral posterolateral del tálamo de 18 ratas. Se utilizó el método descrito por Sánchez-Zavaleta y cols. (Sánchez-Zavaleta, 2018). Brevemente, las rebanadas fueron homogenizadas en buffer (sacarosa 0.32 M; HEPES, 0.005 m, pH 7.4) y los homogenados se centrifugaron a 800g por 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue posteriormente centrifugado a 20,000g por 20

minutos. A partir de esta segunda centrifugación, el sobrenadante (S1) fue descartado, y el precipitado o pellet obtenido (P1) fue suspendido y colocado en la sacarosa 0.8 M, HEPES 0.005 M, buffer (pH 7.4), y nuevamente centrifugado a 20,000g durante 20 min. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el nuevo pellet (P2) que contenía los sinaptosomas fue empleado. La fracción sinaptosomal fue incubada con tampón de ensayo de radionmunoprecipitación (RIPA) así como una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, Mexico) por 15 minutos. Para obtener las membranas, los sinaptosomas fueron sonicados y la proteína fue cuantificada por el método Bradford.

6.4Co – inmunoprecipitación (co-IP).

Se utilizó una muestra de 500µg de proteína de la porción posterolateral del tálamo (VPL) con CB2 anticuerpo (1:250) o GPR55 anticuerpo (1:250), los cuales se incubaron durante toda la noche. Posteriormente, se agregaron perlas de agarosa (Roche Applied Science, México) y se mantuvieron en agitación durante 3 horas. Las muestras se lavaron y centrifugaron 8 veces (10,000 rpm) por 5 minutos con 500 ml de buffer RIPA. El precipitado resultante de la tercera centrifugación fue resuspendido en el buffer de muestra (Glicerol 50%, Tris-HCl 125 mM, SDS 4% azul de Bromofenol 0.08%, β-mercaptoetanol 5%) y calentado a 95°C por 5 minutos, de acuerdo con el protocolo usado previamente por Avalos-Fuentes y cols. (Avalos-Fuentes et al., 2013).

6.5Western blotting.

Para detectar CB2r y GPR55, las muestras fueron resueltas en electroforesis SDS-PAGE, transferidas a membranas PVDF, y secadas por 1 hora a temperatura ambiente en buffer salino Tris (0.1% Tween 20 y 5% de leche en polvo sin grasa). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con alguno de los anticuerpos CB2r (dilución 1:2000), o GPR55 (1:2000). Los anticuerpos policlonales CB2 fueron obtenidos de Laboratorio Alomone y Laboratorio Abcam. Los anticuerpos policlonales GPR55 se obtuvieron de BIOS ANTIBODIES Bioss Inc. La detección de los anticuerpos se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL-Plus Amersham) con anticuerpos

secundarios conjugados con HRP (dilución 1:2000) (Avalos-Fuentes et al., 2013).

6.6 Inmunofluorescencia (IF) en rebanadas.

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (4 mg/kg i.p.), a la brevedad fueron perfundidas vía intracardiaca, utilizando solución salina Ringer, seguido por paraformaldehído al 4% (PFA) en buffer fosfato 0.1 M (PBS), pH 7.4. Los cerebros fueron disecados y fijados en sacarosa al 30% de sacarosa y posteriormente incrustados en parafina y cortados en secciones coronales 20 µm de espesor utilizando un microtomo congelante (Leica, Nussloch, Alemania). Para realizar los procedimientos de inmunofluorescencia, se utilizó la técnica de secciones libres flotantes; las rebanadas fueron incubadas con suero de burro al 2%, 0.1% Tritón X-100 y albumina de suero bovino al 1% en PBS 0.1 M, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de completar el bloqueo, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios, durante 48 horas a 4°C. Se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-CB2 (dilución 1:100), el cual reconoce el epítipo en el tercer bucle intracelular (aminoácidos 228-242) de CB2r. Para las células glutamatérgicas, se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-vGLUT2, en dilución 1:200. Posteriormente, las rebanadas se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios: anticuerpo secundario anticonejo Alexa Fluor™ 488 (1:100) y anticuerpo secundario antirratón Alexa Fluor™ 594 (1:100), a temperatura ambiente por 3 horas (López-Ramírez et al., 2020). Finalmente, las rebanadas fueron montadas en cubreobjetos, lavadas y secadas. Se obtuvieron imágenes usando un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) así como el programa Leica LAS AF software y un objetivo de inmersión en aceite 63X.

6.7 Evaluación conductual.

6.7.1 Implantación bilateral de cánulas intratalámicas.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con peso vivo de 190 – 220 gramos. Las ratas se alojaron 5 por caja, con disponibilidad de agua y alimento

peletizado estándar para roedor a libre acceso, bajo ciclo de luz 12 : 12 h, día : noche durante uno a dos días previos a la cirugía.

El procedimiento de implantación bilateral de cánulas intratálámicas se llevó a cabo como ha sido previamente descrito por Seyer y colaboradores (Seyer et al., 2016). Bajo anestesia fija utilizando xilacina – ketamina (xilacina a dosis de 10 mg/kg; ketamina a dosis de 65 mg/kg; IP), más midazolam (2.5 mg/kg, IP) ó diazepam (2.5 mg/kg, IP) y medicación prequirúrgica (10 min) con meloxicam (2 mg/kg, SC) como analgésico, la rata fue colocada en un marco estereotáxico David Kopf. Se realizó una incisión sagital en el cráneo para poder identificar Bregma. A partir de esta referencia se ajustaron las coordenadas correspondientes al núcleo ventral posterolateral del tálamo (-2.9 mm posterior, -3.1 mm izq./ +3.2 mm der. Lateral, -5.2 mm ventral desde bregma), basado en el atlas de Paxinos y Watson (1986) para insertar las cánulas. Las cánulas fueron elaboradas a partir de agujas hipodérmicas calibre 21. Cada cánula (izquierda/derecha) fue asegurada al cráneo con un tornillo metálico pequeño y fue aplicado cemento dental acrílico para fijar ambos al hueso (Nicollelis, M. A. L., 2008). Finalmente la incisión en la piel fue cerrada utilizando cianoacrilato (Montes et al., 2009; V, 2008). Se administró antibiótico (0.1 ml SC de solución 4:1, Enroxil 5% : agua destilada) desde el día de la cirugía y hasta un día antes de la evaluación conductual.

Después de la cirugía, las ratas fueron mantenidas en cajas individuales con tapa elevada, con alimento y agua *ad libitum*, bajo ciclo de luz 12 : 12 h, día : noche durante dos a tres días antes de realizar la prueba de Latencia de Retirada de la Cola. La postura y comportamiento de las ratas así como limpieza de la herida fueron monitoreados durante la recuperación de los animales y durante los siguientes días posoperatorios.

Antes de que las ratas fueran sometidas al ensayo conductual fueron aclimatadas al cuarto de pruebas durante 30 min.

6.7.2 Prueba de Latencia de Retirada de la Cola (LRC).

Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos para la administración intratalámica de los fármacos:

1. Grupo agonista selectivo para el receptor CB2 (JWH133, 100µM),
2. Grupo agonista selectivo para el receptor GPR55 (O-1602, 1 µM),
3. Grupo de agonista CB2 + agonista de GPR55 (JWH133, 100 µM + O-1602, 1 µM),
4. Grupo de antagonista selectivo y agonista de CB2 (AM630 (Tocris Bioscience), 100 µM + JWH133, 100 µM),
5. Grupo de antagonista y agonista de GPR55 (CID16020046 (Cayman Chemical), 1 µM + O-1602, 1 µM),
6. Grupo control (agua destilada).

Para la evaluación de la antinocicepción se utilizó el analgesiómetro denominado *Tail Flick Apparatus* (U- et al., 2014), el cual consiste en un aparato que provee de un haz calórico de intensidad regulable. La LRC se midió como el tiempo transcurrido entre la exposición de la cola al calor radiante y la retirada de la cola. Una intensidad de 90 en escala de 0 a 100, con la determinación de un corte en el suministro del haz calórico a los 36 segundos, fue usada durante el estudio. El haz de luz se enfocó sobre la parte dorsal de la cola de la rata, a 1.5 cm y a 5 cm de la porción más distal. La intensidad radiante se ajustó en una base de 6 a 35 segundos y los animales fuera de ese parámetro fueron excluidos. El tiempo base de latencia se determina por el promedio de dos pruebas de LRC, con un intervalo de 10 min entre cada lectura.

Las ratas fueron administradas con los fármacos 15 min después de la medición de referencia. Los animales fueron sujetos manualmente (Berge et al., 1988) para llevar a cabo las evaluaciones de LRC, que fueron ejecutadas a los 0, 15, 30, 45 y 60 min después de la administración de los fármacos. Se realizaron dos lecturas consecutivas para cada distancia (1.5 cm y 5 cm) sobre las que se posicionó el haz de luz; se determinó un periodo de reposo de 30 segundos entre las primeras dos mediciones y 1 min entre la repetición de

ambas mediciones. El mismo investigador realizó todas las evaluaciones del *Tail Flick Test* o LRC. Los cerebros fueron removidos para verificar el sitio de inserción de la cánula.

6.7.3 Histología.

Posterior a la rápida decapitación, los cerebros fueron removidos y sumergidos durante 24 h en formol al 37% para su fijación. Posteriormente, utilizando un vibratomo se obtuvieron rebanadas de 400 μm de espesor en las que se verificaron, mediante la observación en microscopio estereoscópico, los sitios correctos de inserción de las cánulas. Las imágenes de los cortes histológicos de estas verificaciones se muestran a continuación:

7 Resultados.

7.1 Los receptores CB2 y GPR55 se expresan en el núcleo ventral posterolateral (VPL) del tálamo de la rata.

Como evidencia bioquímica, se determinó la presencia del receptor CB2 en el inmunoprecipitado de GPR55, que fue preparado a partir de homogenados de tejido talámico (VPL) usando la técnica de co-IP, tal y como se describió en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en la figura 5a demuestran la expresión de CB2 en el inmunoprecipitado de GPR55, en el tamaño molecular esperado. Se observa una banda extra de mayor peso molecular ≈ 70 kDa.

Para corroborar este resultado se realizó la maniobra inversa en la que se determinó la presencia del receptor GPR55 en el inmunoprecipitado de CB2, que fue preparado a partir de homogenados de tejido talámico (VPL) usando la técnica de Co-ip, tal y como se describió en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados mostrados en la Figura 5b demuestran la expresión de GPR55 en el inmunoprecipitado de CB2, en el tamaño molecular esperado. Se observa una banda extra de mayor peso molecular ≈ 50 kDa.

7.2 El receptor CB2 se expresa en la membrana plasmática y citoplasma de neuronas del núcleo ventral posterolateral (VPL) del tálamo de la rata.

Los receptores canabinoides están clasificados como proteínas transmembranales de siete dominios. No obstante, debido a que estas proteínas aun no son bien delimitadas en sus comportamientos, es trascendente corroborar algunas de sus características primordiales, como lo son su ubicación en la célula, que para fines de este estudio, es la neurona. En este sentido, mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, se pudo observar la ubicación del receptor canabinoide CB2 en neuronas del núcleo ventral posterolateral del tálamo. En la Figura 7 se identificaron el núcleo de la célula (Fig. 7-A) y el receptor distribuido en densas áreas de la neurona (Fig. 7-B). Posteriormente, al superponer ambas imágenes y una vez delimitada el área nuclear de la neurona, se pueden determinar las

zonas de distribución del receptor CB2. Debido a que las tinciones no se observan en superposición, se puede comprobar que el receptor se encuentra en zonas diferentes al núcleo celular, es decir, citoplasma y región membranal (Fig. 7-C).

Se utilizó un control negativo en el que no se expusieron las células al colorante específico para el receptor CB2 (Fig. 7D-F).

Con referencia a la ubicación del receptor CB2 en la sinapsis neuronal, se puede apreciar en la Figura 8 la utilización de tres tinciones. El colorante DAPI azul es un marcador fluorescente nuclear específico para esta estructura celular; el colorante Alexa 488 fue aplicado a las mismas células con el objetivo de identificar la localización del receptor CB2 en ellas; y el colorante Alexa 594 es un colorante empleado para identificar el transportador vesicular de glutamato (vGLUT2). Al superponer las tres imágenes (Figura 8D) se pueden observar en las neuronas glutamatérgicas, algunas zonas teñidas de color naranja-café, debido a que los fluoróforos dirigidos tanto al receptor CB2 como el de VGLUT2 se intercalan y originan esta tinción.

7.3 Los receptores canabinoides tipo 2 y GPR55 aumentan la latencia durante la prueba de retirada de la cola, al ser administrados de forma intratálámica.

Posterior a la implantación de la cánula intratálámica, las ratas continuaron mostrando conducta normal de alimentación y limpieza. El progreso de la conducta de nocicepción aguda fue evaluado tres días después de la cirugía. Después de la aplicación del estímulo nociceptivo, las ratas en las que el agonista de GPR55 (O-1602, 1 μ M) fue inyectado, mostró un aumento significativo en la latencia de la retirada de la cola ($P < 0.001$, $n = 5$), comparado con las ratas del grupo Control. Las ratas en las que el agonista de CB2 y el agonista de GPR55 fueron inyectados al mismo tiempo (JWH-133, 100 μ M, y O-1602, 1 μ M; respectivamente), también mostró un aumento significativo en la latencia de retirada de la cola ($P < 0.001$, $n = 5$). En contraste, el grupo en el que el agonista de CB2 (JWH-133, 100 μ M) fue inyectado solo, la retirada de la cola no fue tan significativa ($P = 0.020$, $n = 5$) como lo observado en los dos grupos

mencionados anteriormente. Las gráficas generadas a partir de las pruebas de ANOVA, de las dos mediciones realizadas a 1.5 y 5 cm de la parte distal de la punta de la cola (Gráficas 1a y 1b, respectivamente), muestra como los agonistas ejercen su efecto máximo antinociceptivo aproximadamente a los 15 a 30 minutos después de la administración de los fármacos. Posteriormente, cada grupo tuvo comportamientos diferentes a partir de los 30 minutos hasta el fin del experimento a los 60 minutos. El antagonista de GPR55 (CID16020046, 1 μ M) bloqueó el efecto inhibitorio de O-1602 sobre la latencia de retirada de la cola; un efecto similar fue observado al administrar el antagonista de CB2 (AM630, 100 μ M) sobre los efectos inhibitorios de JHW-133.

El área bajo la curva efecto-tiempo en el intervalo de cero a sesenta minutos, después de la administración de JWH-133, O-1602, JWH-133 + O-1602, y el vehículo (AUC_{0-60}) fue calculada mediante la regla lineal trapezoidal, usando la Ecuación 1. El aumento del efecto se describe como la fracción de la diferencia entre el límite de corte y la observación basal. El valor máximo siempre será 100%, que es igual al valor de corte (Ouellet & Pollack, 1995) (Gráfica 2).

$$\text{Efecto (\%)} = \frac{(\text{observación post-fármaco}) - (\text{observación basal})}{(\text{tiempo de corte}) - (\text{observación basal})} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

8 Discusión.

La identificación de la expresión de los receptores CB2 y GPR55 en el tálamo de la rata se realizó mediante un estudio dividido en dos fases.

En la primera fase, las técnicas de co-inmunoprecipitación y Western blot se utilizaron para evidenciar la expresión de CB2 y GPR55. Los resultados mostraron dos bandas que indicaron los pesos moleculares correspondientes a cada proteína identificada (Figura 5). El fortalecimiento de estos resultados podría lograrse mediante el uso de la técnica de análisis de ácidos nucleicos. Durante nuestros experimentos realizados, además de la banda de 45 kDa, se observaron otras bandas con pesos moleculares por encima y por debajo de este valor. Una de estas bandas era de aproximadamente 60 kDa, la cual de acuerdo con Marchalant et. al. se eliminaría del revelado del Western blot si se hiciera un enriquecimiento de membrana (Boon et al., 2012; Marchalant et al., 2014). La otra banda fue de aproximadamente 70 kDa, la cual pudo haberse originado como producto de degradación a partir de la proteína de estudio (Karginov & Agaphonov, 2016). Esta degradación puede ocurrir durante los procesos de desnaturalización, mediante la aplicación de calor y/o 2-mercaptoetanol. Sin embargo, estas bandas de alto peso molecular han sido reportadas previamente (Romero-Zerbo et al., 2011) como resultado de la expresión de modificaciones post-traduccionales necesarias para el plegamiento de las proteínas. Otros autores sugieren que la presencia de bandas que difieren del peso molecular esperado para una proteína, puede deberse a la interacción con ligandos, definición de su estado funcional, o bien su actividad en las vías de señal de transducción (Bürkle, 2001). Algunas diferencias que se pueden notar durante la detección de proteínas pueden ser debidas a la falta de sensibilidad o de especificidad de los anticuerpos usados (Marchalant et al., 2014). Los anticuerpos utilizados para la identificación de CB2 en el presente estudio, fueron obtenidos de Laboratorio Cayman y Laboratorio Abcam. Para el caso de Cayman la banda esperada se indica en el peso molecular de 37 kDa, que se alinea con la isoforma corta del receptor CB2, pero difiere de la banda de 45 kDa de nuestro estudio. Las bandas adicionales observadas, de 60 y 70 kDa aproximadamente, no podrían

representar homómeros de CB2 ni de la proteína alfa-enolasa, como Marchalant et. al. también habían asegurado en un inicio. Al igual que para la identificación de CB2, el receptor GPR55 fue identificado utilizando el protocolo de Western blot que mostró una banda de 37 kDa (N. A. Balenga et al., 2014; N. A. B. Balenga et al., 2011). Bouskila et al identificaron una banda similar a ésta en la porción extrafoveal de la retina del primate *Chlorocebus pygerythrus*, y su identificación en este experimento ayudo a determinar que este receptor participa en la modulación de la visión escotópica (Bouskila et al., 2013). También se sabe que la secuencia del receptor GPR55 de la rata posee una similitud del 75% con la secuencia del receptor de humano (Ryberg et al., 2007), por lo cual es relevante que al realizar experimentos en especies diferentes a la humana, se deben tomar precauciones al interpretar resultados posiblemente aplicables a nuestra especie. La complementación de la primera fase de nuestro experimento se realizó mediante los ensayos de inmunofluorescencia, para demostrar la expresión del receptor CB2 en las neuronas del tálamo ventral posterolateral de la rata. El uso de un fluoróforo facilitó la localización subcelular del receptor fuera del núcleo celular, lo cual reafirmó la ubicación membranal de la proteína de CB2, que en la Figura 2C se indicó con una flecha amarilla. A pesar de que en 2008 Brusco et. al. (Brusco et al., 2008) afirmaron que la ubicación del receptor CB2 era primariamente postsináptica, en nuestro estudio se observó presináptico. En la superposición de las imágenes en la Figura 3, se aprecia la co-localización del receptor CB2 con el Transportador Vesicular de Glutamato (VGluT) en las terminales axónicas de la neurona. Lo anterior sugiere que el receptor CB2, además de ser un receptor membranal, también puede comportarse como presináptico, ya que es en esta región de la sinapsis en la que las vesículas transportadoras del glutamato capturan al glutamato, el cual es un neurotransmisor excitatorio de las células neuronales. A diferencia de la investigación de Brusco et. al., la cual fue realizada en el núcleo CA1 del hipocampo y en la substantia nigra pars reticulata, nuestros experimentos se realizaron en tejido talámico. Sin embargo, Brusco et. al. no descartaron la posibilidad de la localización presináptica de este receptor pero señalaron que la localización postsináptica era más común (Brusco et al., 2008). La identificación de este receptor en el tálamo (Gong et al., 2006) permitió sugerir la posibilidad de la expresión de los

receptores CB2 y GPR55, dímero previamente identificado en células del sistema inmune (N. A. Balenga et al., 2011).

La segunda fase de nuestro estudio empleó una prueba conductual para evaluar los posibles efectos analgésicos inducidos por los agonistas de CB2 y de GPR55, y sus respectivos antagonistas. El uso de este tipo de pruebas es susceptible a variabilidad provocada por factores como la concentración del fármaco, el origen de la sustancia de estudio, el uso de sistemas nativos o sistemas heterólogos, así como la interacción de las proteínas con algunas de la misma familia o de diferentes familias, formando entre ellas homómeros o heterómeros, respectivamente (Ferré & Franco, 2011). La elección para nuestro estudio fue un modelo de dolor que permitiera evaluar los efectos *in vivo* del dímero CB2-GPR55 en el sistema nervioso. El dolor ha sido definido como: "una experiencia sensorial y emocional no placentera" (IASP, International Association for the Study of Pain), por lo cual dada su naturaleza subjetiva, es difícil medirlo objetivamente, no obstante para propósitos de investigación se han desarrollado protocolos según el tipo de respuesta que se requiere evaluar. Para nuestro estudio, la prueba de retirada de la cola fue el modelo de dolor elegido para evaluar el efecto analgésico supra espinal de los fármacos previamente mencionados, aunque se sabe que también este modelo mide reflejos espinales (Berge et al., 1988; Hole & Tj, 1993). Los fármacos de estudio fueron los agonistas de los receptores CB2 y GPR55, JWH-133 y O-1602, respectivamente. El receptor canabinoide tipo 2 ha sido objeto de diversos estudios ya que su comportamiento no ha sido homogéneo y por lo tanto, es necesario conocer sus características funcionales, para poder desarrollar terapias eficientes para el tratamiento del dolor (Greco et al., 2014; Iyer et al., 2020). Como parte de su participación en procesos fisiológicos, CB2 está parcialmente involucrado en las respuestas tempranas y tardías de la inflamación (Iwamura et al., 2001) durante situaciones de lesión de tejidos y nervios (Beltramo et al., 2006), por lo cual es común no identificar este receptor en estados fisiológicos normales. Nuestros resultados proponen que el receptor CB2 puede identificarse tanto en tejido cerebral intacto, así como en sitios espinales y periféricos en situaciones de lesión, como ya se ha reportado anteriormente (Curto-Reyes et al., 2010; Jhaveri et al., 2008). Los resultados

registrados en nuestro estudio mostraron efectos antinociceptivos moderados (Graficas 1 y 2) que fueron similares a los reportados por Jhaveri et. al., al administrar JWH-133 vía intratálamica y aplicar un estímulo doloroso. Sin embargo, el tipo de dolor evaluado en estos estudios fue diferente (Bannon & Malmberg, 2007), así como las concentraciones del fármaco aplicado, ya que para la evaluación de la retirada de la cola en nuestro estudio utilizamos menos del 50% de la concentración utilizada por Jhaveri et. al. Posterior a la administración del agonista de GPR55, O-1602, observamos un aumento en la latencia de la retirada de la cola en las ratas, lo cual sugiere un efecto antinociceptivo. No obstante, la micro-inyección periacueductal del ligando endógeno de este receptor, ha reportado la reducción en el umbral nociceptivo (Deliu et al., 2015). Adicionalmente, cuando los ratones han sido modificados genéticamente para carecer del receptor GPR55, no han desarrollado hiperalgesia mecánica en modelos de dolor neuropático (Staton et al., 2008), pero sin llegar a mostrar alteración profunda de los umbrales nociceptivos normales. Sin embargo, en nuestro estudio el aparente efecto antinociceptivo del agonista de GPR55 (O-1602), pudo haber sido observado debido a la estimulación sensorial del tálamo excitando al periacueducto gris, que a su vez pudo retornar el efecto como inhibición al tálamo (Wu et al., 2014). El efecto antinociceptivo observado pareció ser potenciado cuando los agonistas de los receptores CB2 y GPR55 fueron administrados juntos, lo cual mostró un aumento significativo en la latencia de remoción de la cola. De forma similar, Balenga et. al. demostraron que durante la co-expresión de estos receptores, CB2 afecta la señalización mediada por GPR55 provoca un efecto (N. A. Balenga et al., 2014), aun cuando estas observaciones se realizaron en células del sistema inmune y en cultivos celulares, a diferencia de nuestro estudio realizado en el tálamo.

9 Conclusiones.

En este estudio, identificamos los receptores cannabinoides CB2 y GPR55 en la porción ventral posterolateral del tálamo de la rata, mediante el uso de las técnicas de co-inmunoprecipitación y Western blot. Este hallazgo permitió realizar la prueba conductual de tail flick que mostró que GPR55 tuvo efectos antinociceptivos, y cuando CB2 y GPR55 fueron activados simultáneamente, se observó un efecto adicional de CB2 sobre el efecto antinociceptivo de GPR55. Sugerimos que el efecto antinociceptivo pudo deberse a la concentración utilizada en nuestro estudio (1 μ M), que difiere de la concentración de 10 μ M mencionada por Deliu et. al. anteriormente. También sugerimos la posibilidad de intercambio de información entre el tálamo y el periacueducto gris, debido a que ambos núcleos supraespinales se involucran en el procesamiento de los estímulos sensoriales (Green et al., 2005; Wu et al., 2014).

Se requiere de más investigaciones que con técnicas que ayuden a describir a detalle las vías de señalización de ambos receptores activados individualmente y como dímero.

10 Cuadros, gráficas y figuras

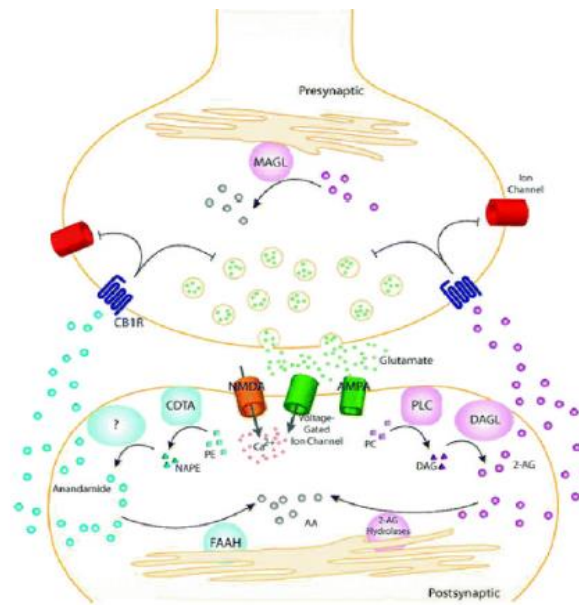


Figura 1. Modelo general de señalización retrógrada endocanabinoide. Tras la liberación de neurotransmisores, los receptores post sinápticos, así como los canales iónico-dependientes de voltaje son activados, permitiendo el influjo de Ca^{2+} y la biosíntesis sobre demanda de endocannabinoides. Los endocannabinoides que son sintetizados de precursores fosfolipídicos, migran después de las neuronas postsinápticas hacia los receptores CB1 localizados en las neuronas presinápticas. Una vez activados los receptores, éstos se acoplan mediante proteínas G de la clase G_i/G_o para regular canales iónicos e inhibir la liberación de neurotransmisores. La señalización retrógrada de los endocannabinoides es finalizada por enzimas de degradación que actúan sobre los endocannabinoides. Imagen tomada de *Chem Rev.* Author manuscript; available in PMC 2011 August 5.

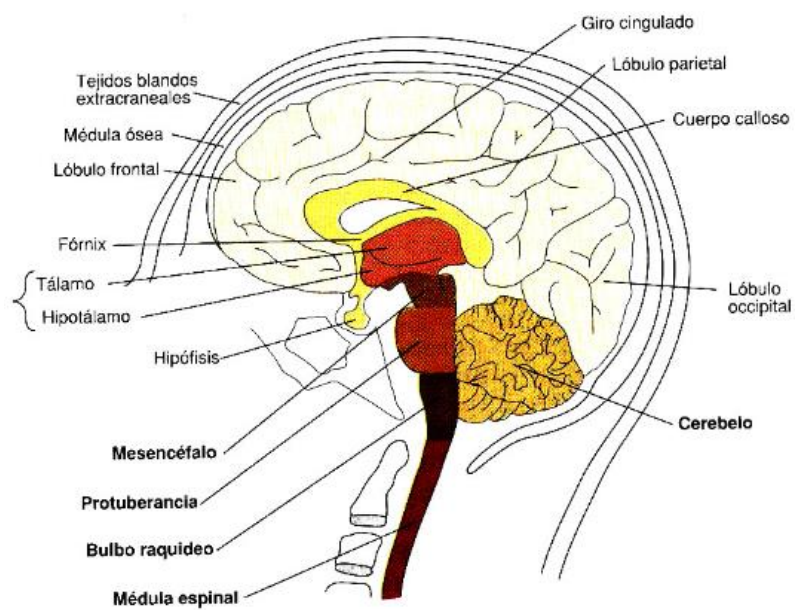


Figura 2. Se muestran los dos componentes del diencéfalo, el tálamo y el hipotálamo. Imagen tomada de Suárez, 2008.

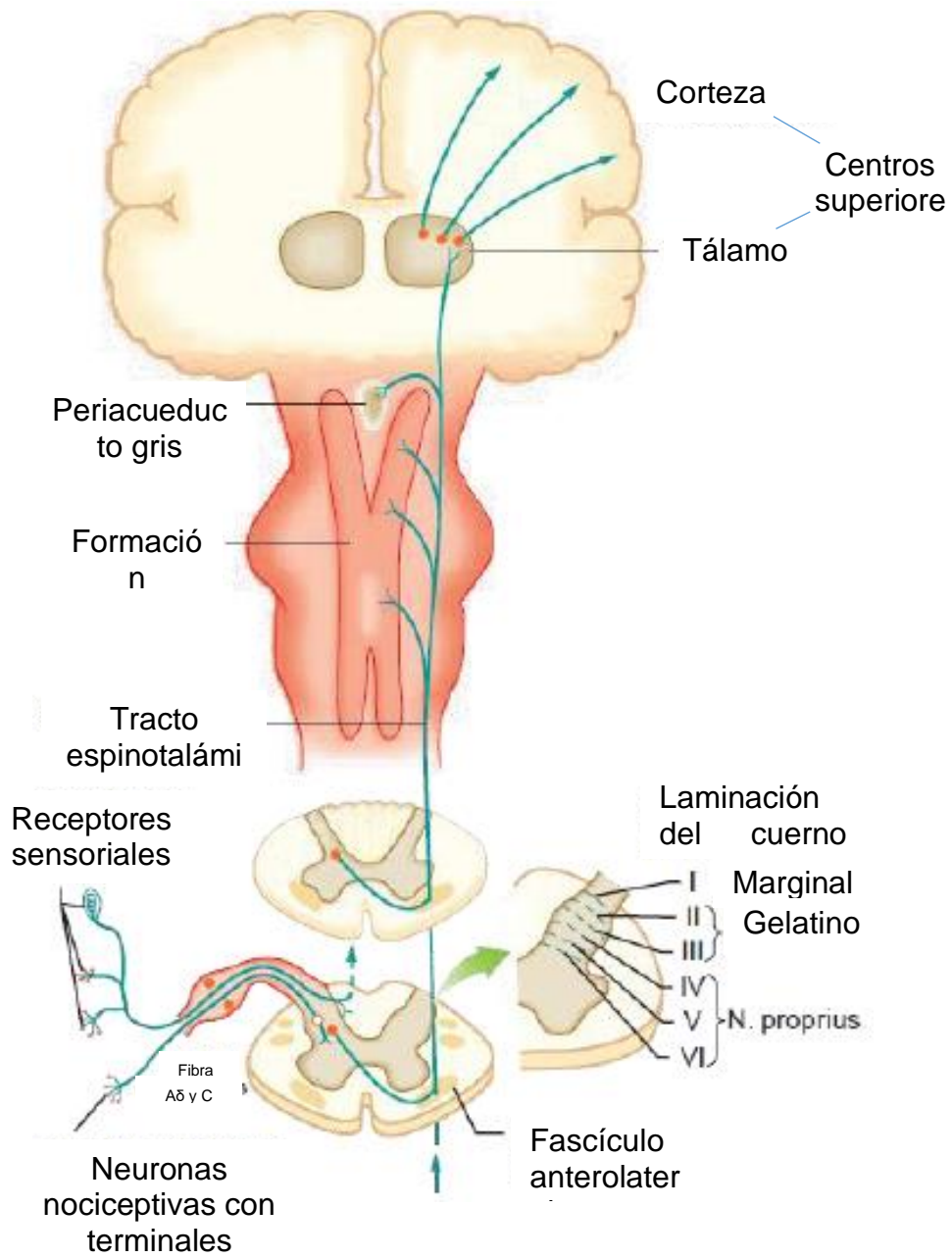
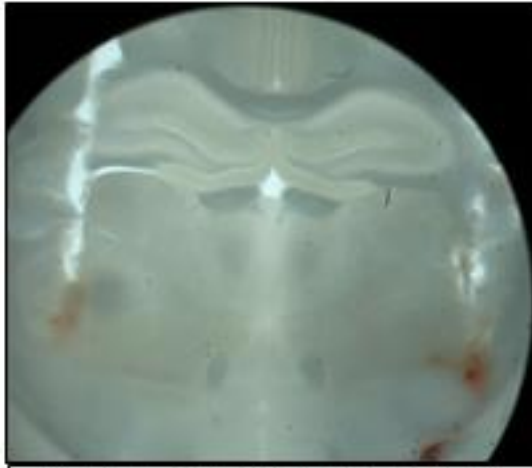
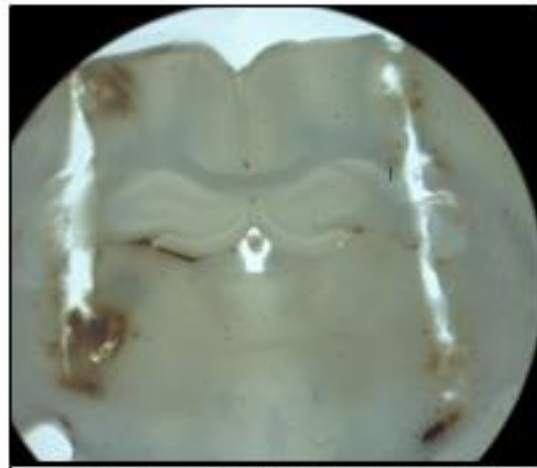


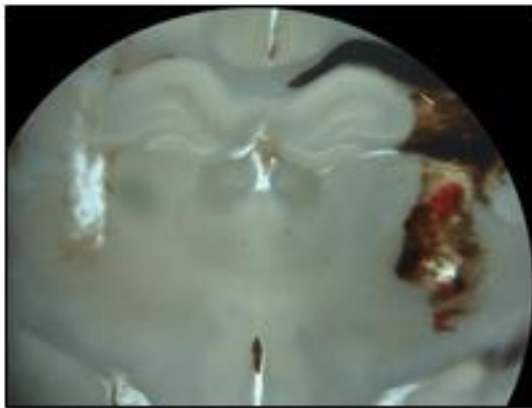
Figura 3. Esquemización de las vías sensoriales aferentes. Imagen tomada Varosyan, A., 2017.



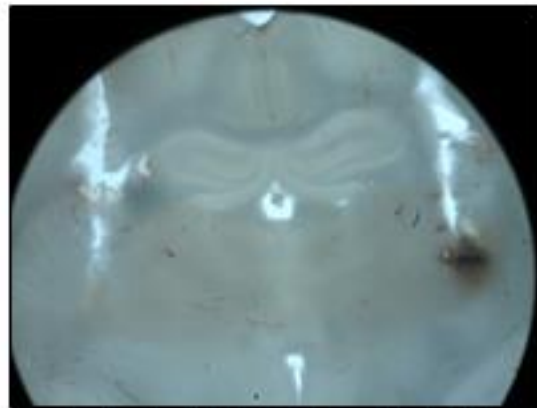
Sujeto de estudio #21-Control de O1602



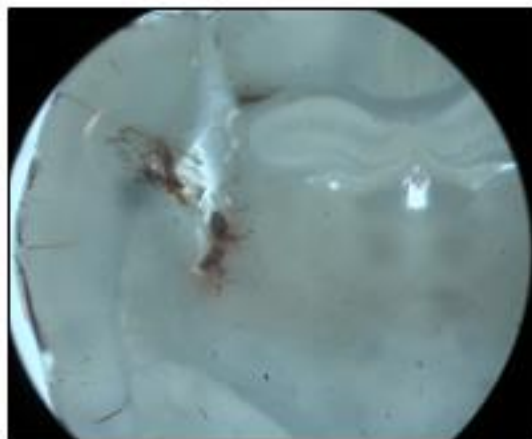
Sujeto de estudio #25-Control de O1602



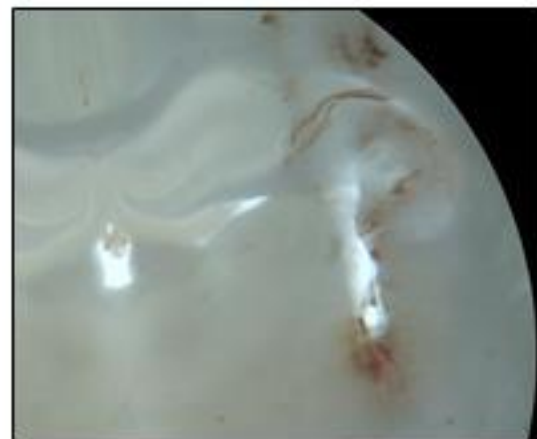
Sujeto de estudio #35-Control de O1602



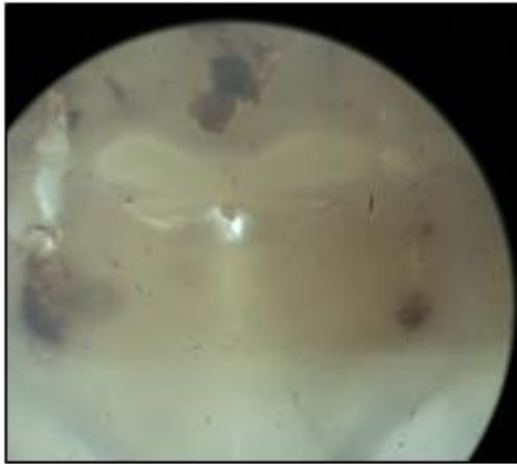
Sujeto de estudio #41-Control de O1602



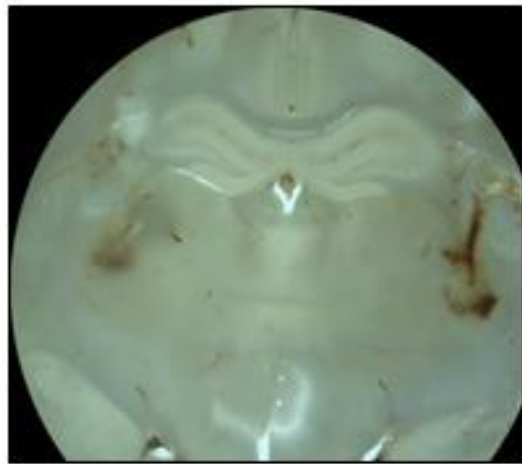
Sujeto de estudio #45, derecho-Control de O1602



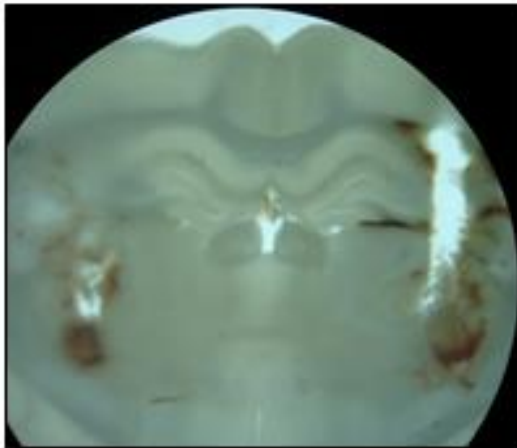
Sujeto de estudio #45, izquierdo-Control de O1602



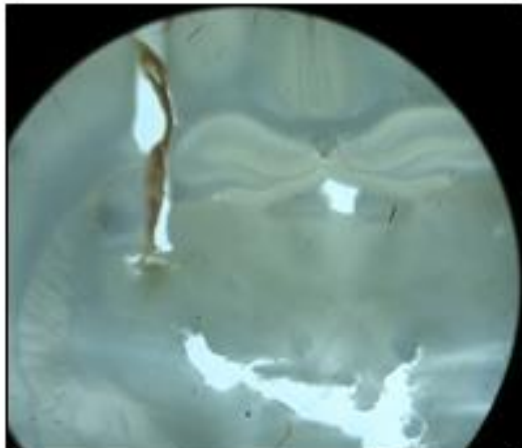
Sujeto de estudio #23-O1602



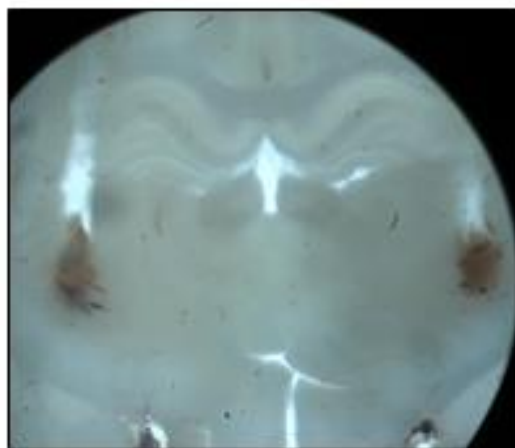
Sujeto de estudio #31-O1602



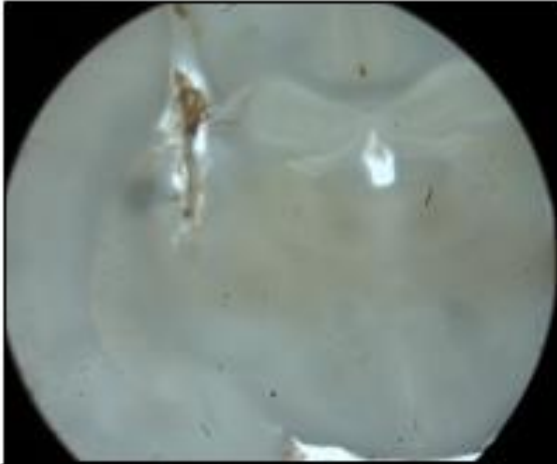
Sujeto de estudio #34-O1602



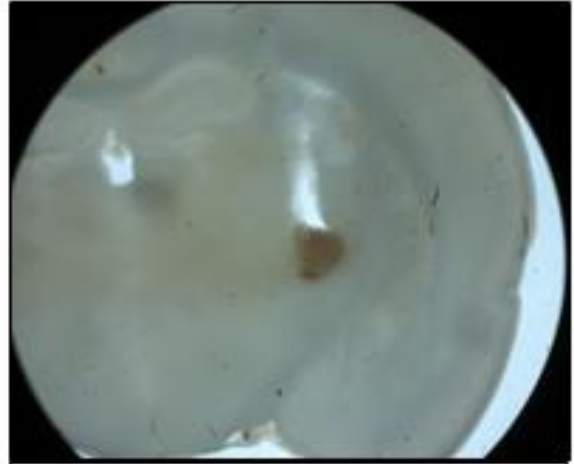
Sujeto de estudio #38-O1602



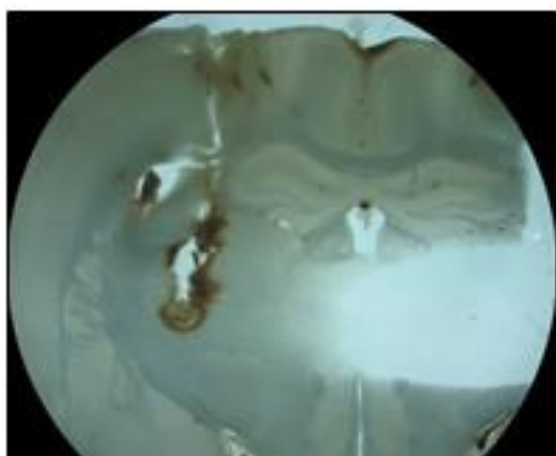
Sujeto de estudio #42-O1602



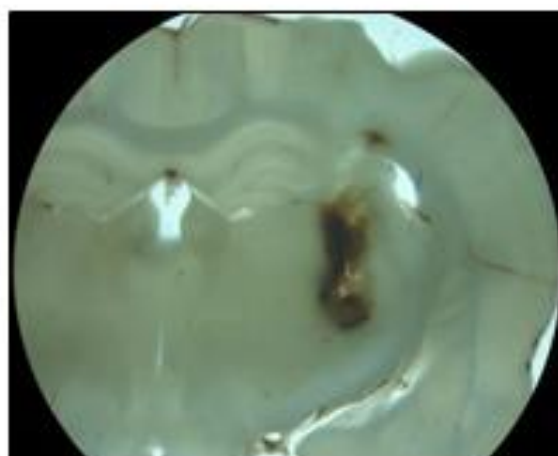
Sujeto de estudio #43, derecho-O1602



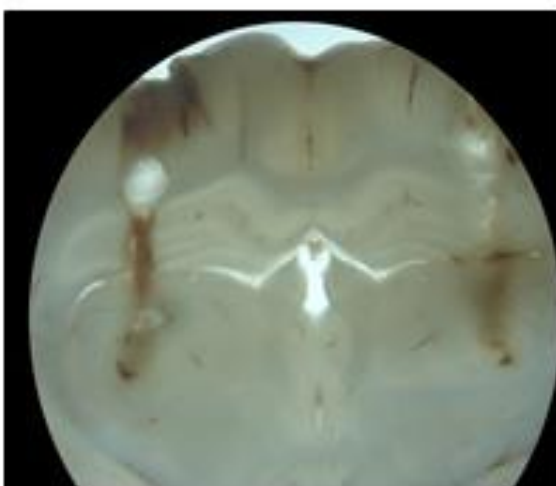
Sujeto de estudio #43, izquierdo-O1602



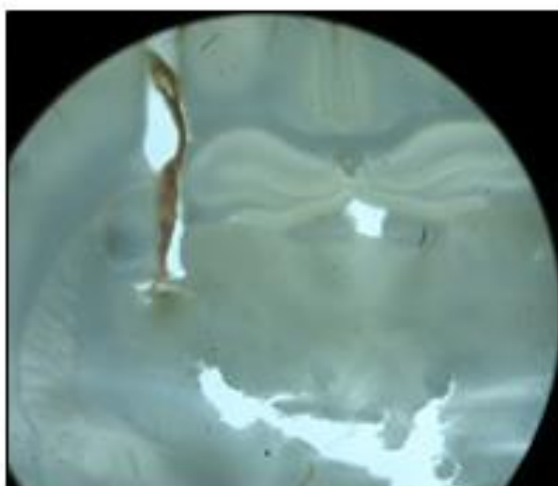
Sujeto de estudio #27, derecho-Control JWH133



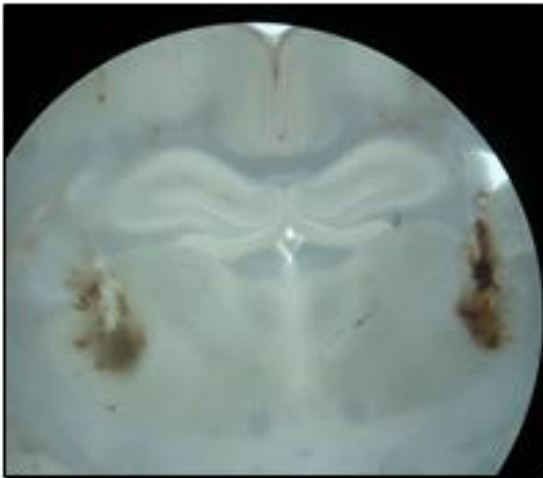
Sujeto de estudio #27, izquierdo-Control JWH133



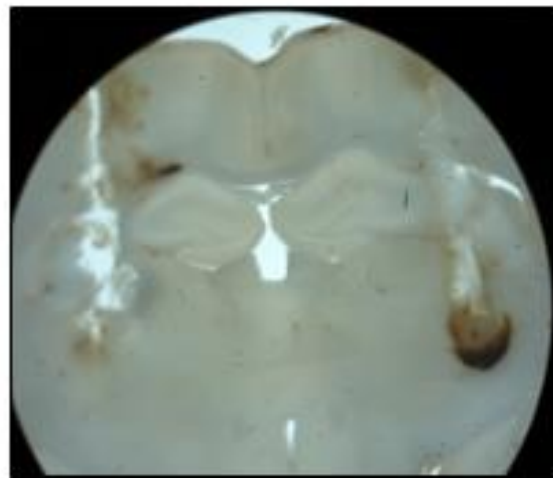
Sujeto de estudio #28-Control de JWH133



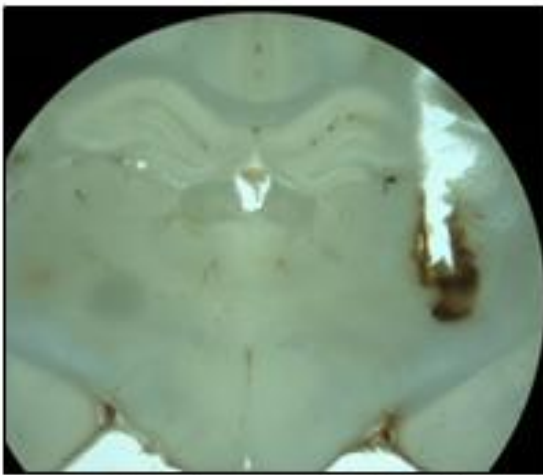
Sujeto de estudio #38-Control de JWH133



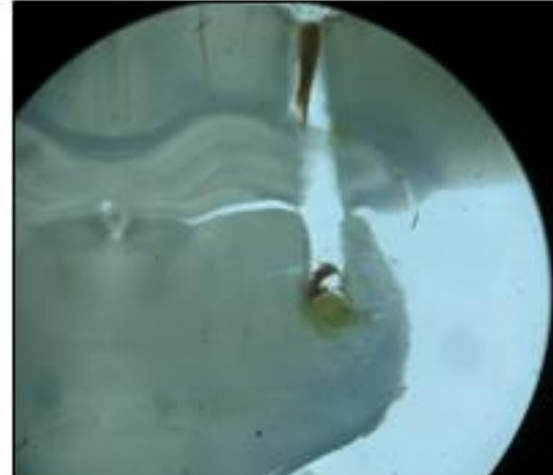
Sujeto de estudio #16-JWH133



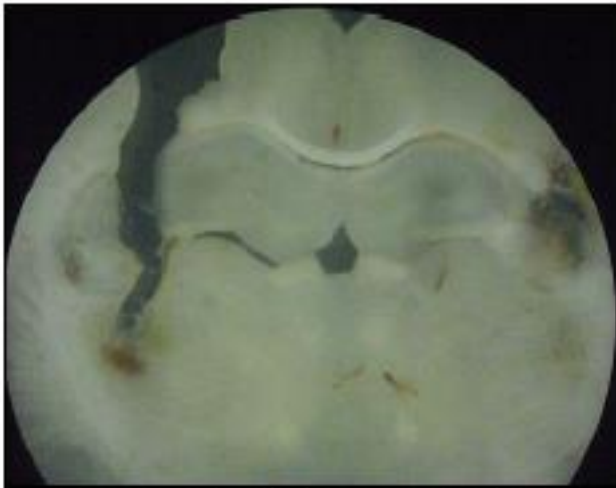
Sujeto de estudio #29-JWH133



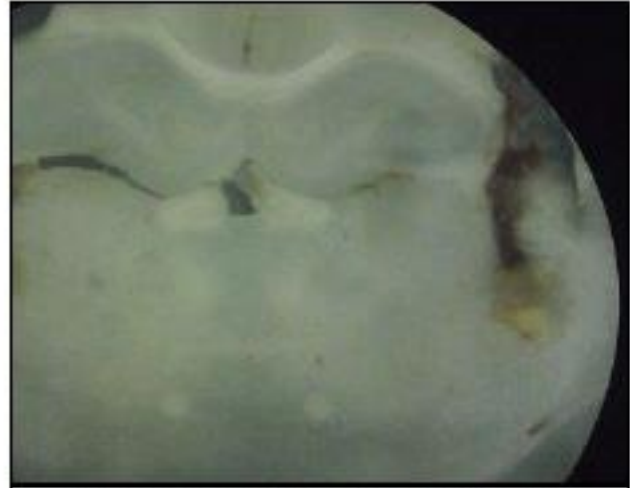
Sujeto de estudio #30-JWH133



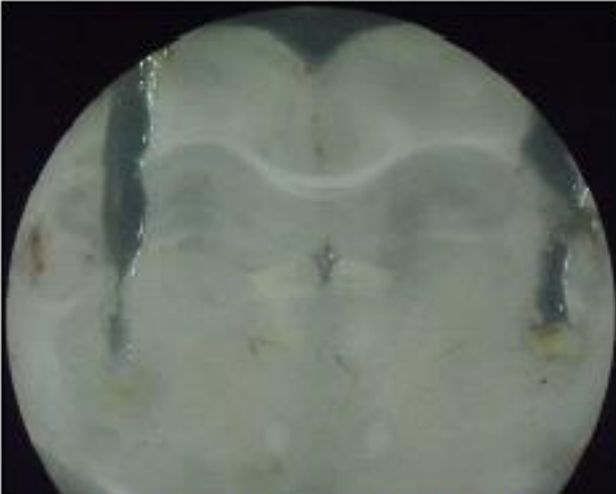
Sujeto de estudio #39-JWH133



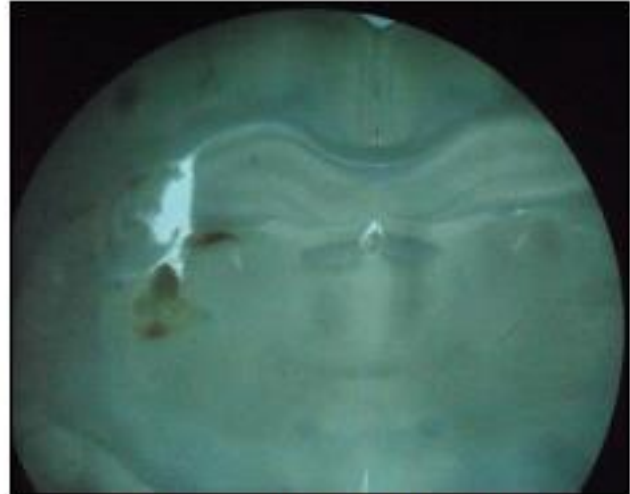
Sujeto de estudio #46, derecho-JWH133+O1602



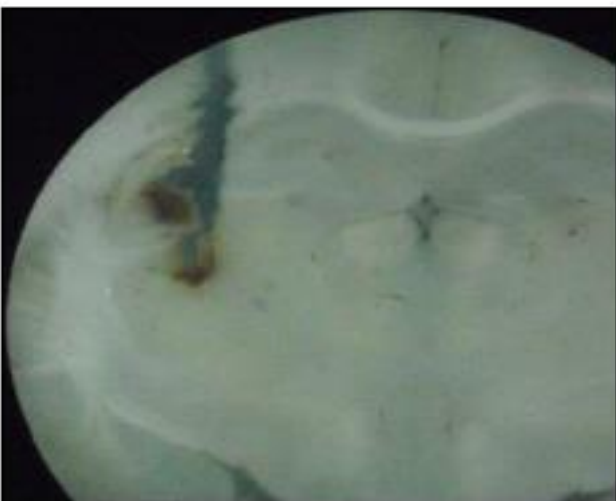
Sujeto de estudio #46, izquierdo-JWH133+O1602



Sujeto de estudio #47-Control de JWH133+O1602



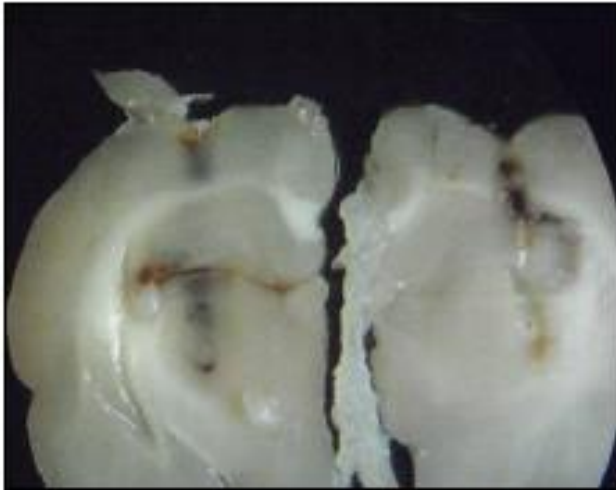
Sujeto de estudio #48, derecho-JWH133+O1602



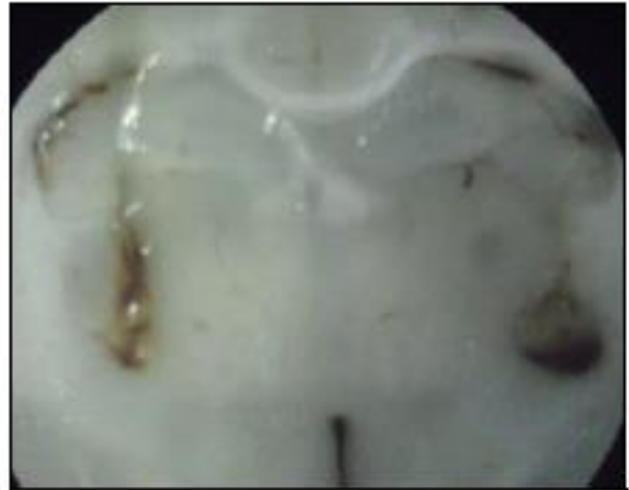
Sujeto de estudio #49, derecho-JWH133+O1602



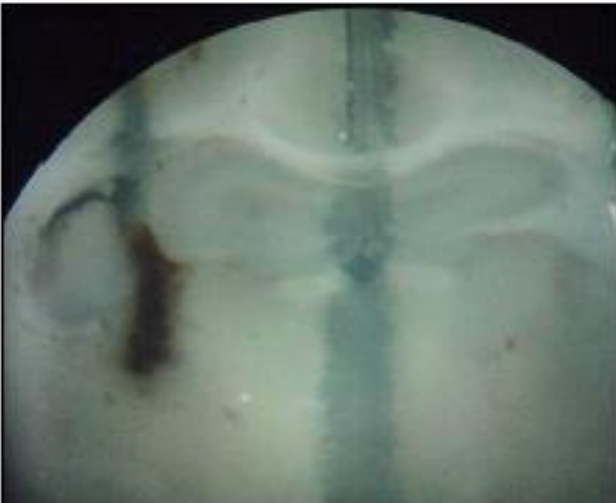
Sujeto de estudio #50-JWH133+O1602



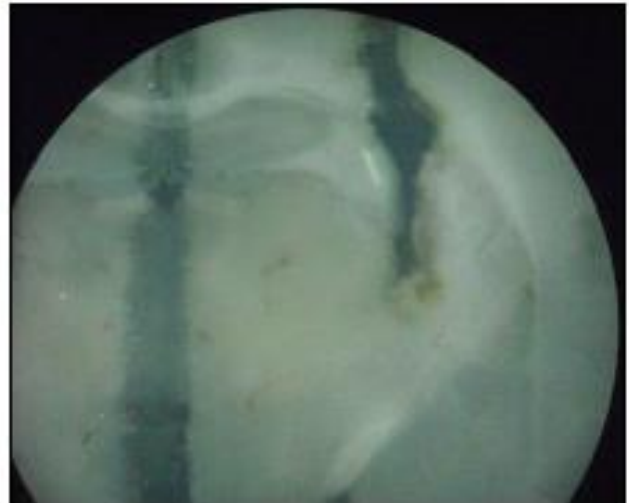
Sujeto de estudio #52-Control de AM630+JWH133



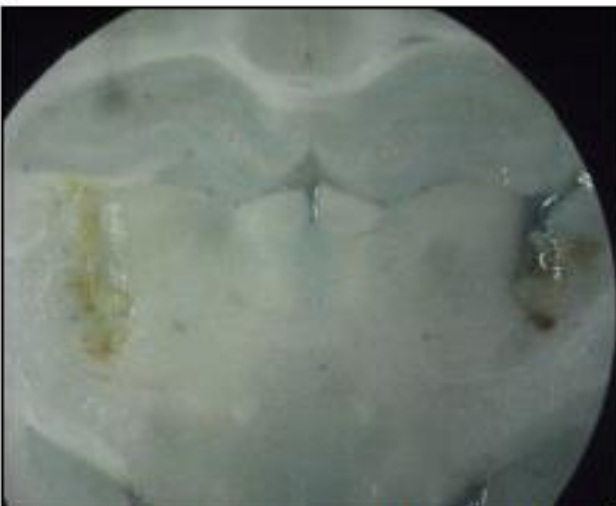
Sujeto de estudio #55-AM630+JWH133



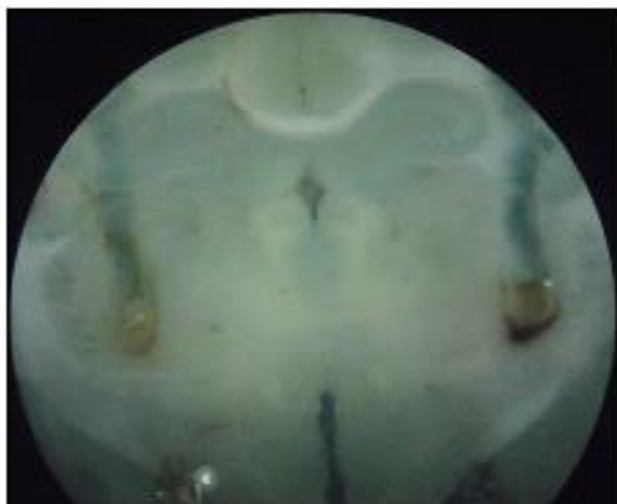
Sujeto de estudio #56, derecho-AM630+JWH133



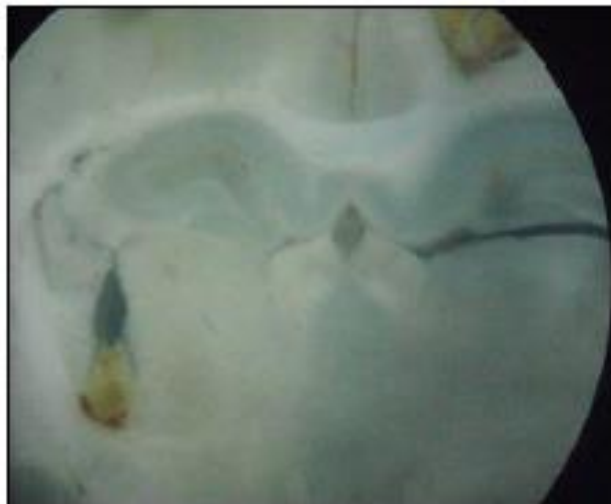
Sujeto de estudio #56, izquierdo-AM630+JWH133



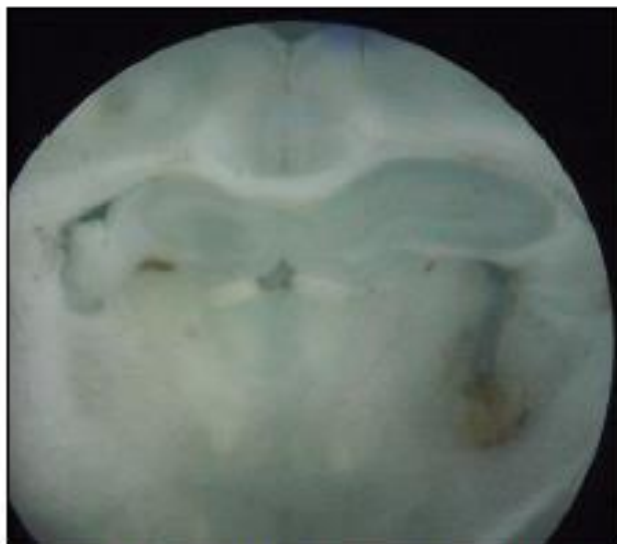
Sujeto de estudio #57,-AM630+JWH133



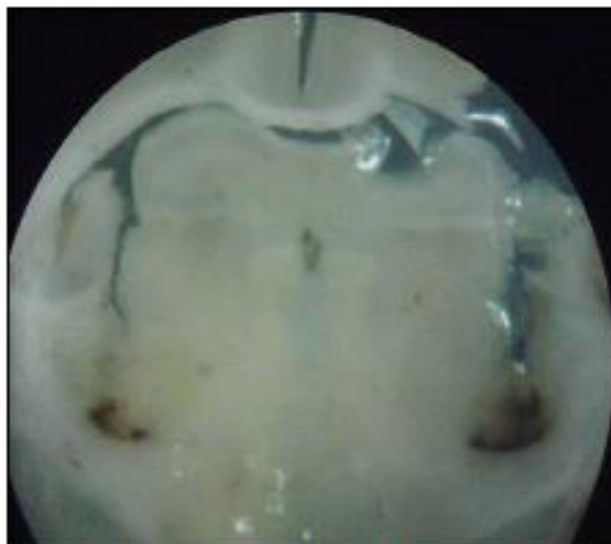
Sujeto de estudio #58-Control de CID16020046+O1602



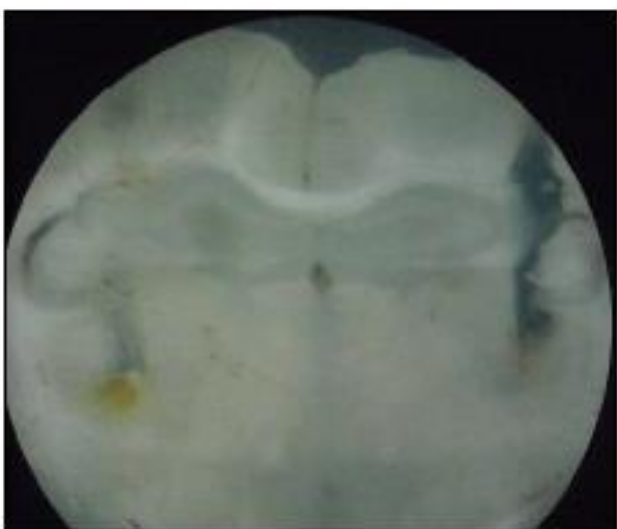
Sujeto de estudio #59, derecho-CID16020046+O1602



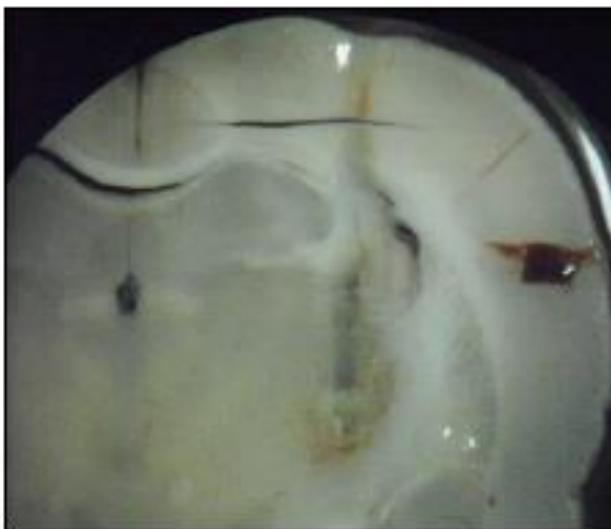
Sujeto de estudio #59, izquierdo-CID16020046+O1602



Sujeto de estudio #81-CID16020046+O1602



Sujeto de estudio #62-CID16020046+O1602



Sujeto de estudio #63-CID16020046+O1602

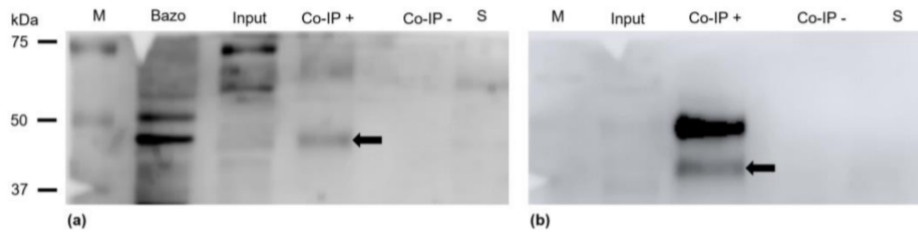


Figura 5. Se observó la presencia del dímero en ambos revelados realizados a partir de homogenizados del núcleo ventral posterolateral del tálamo de la rata. (a) Co-IP representativa de CB2 por el anticuerpo GPR55 (carril **Co-IP +**). Carril **Bazo** indica el control positivo utilizado para el anticuerpo CB2. (b) Co-IP representativa de GPR55 por el anticuerpo CB2 (carril **Co-IP +**). Las flechas muestran los pesos moleculares de las bandas para cada proteína de los revelados, 45 kDa y 37 kDa, respectivamente para (a) y (b). Carril **M** es el marcador de peso molecular; carril **Input** muestra la cantidad de proteína presente antes de realizar la IP; en carriles **Co-IP -** y **S**, no se adicionó anticuerpo correspondiente a cada IP. Cada IP se repitió tres veces.

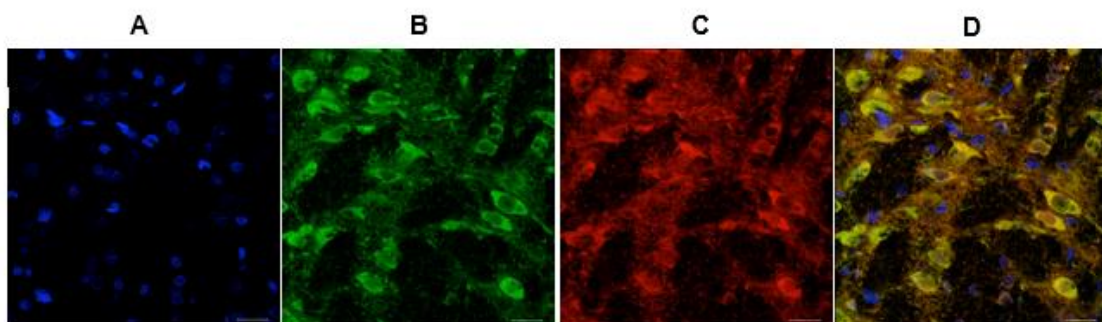
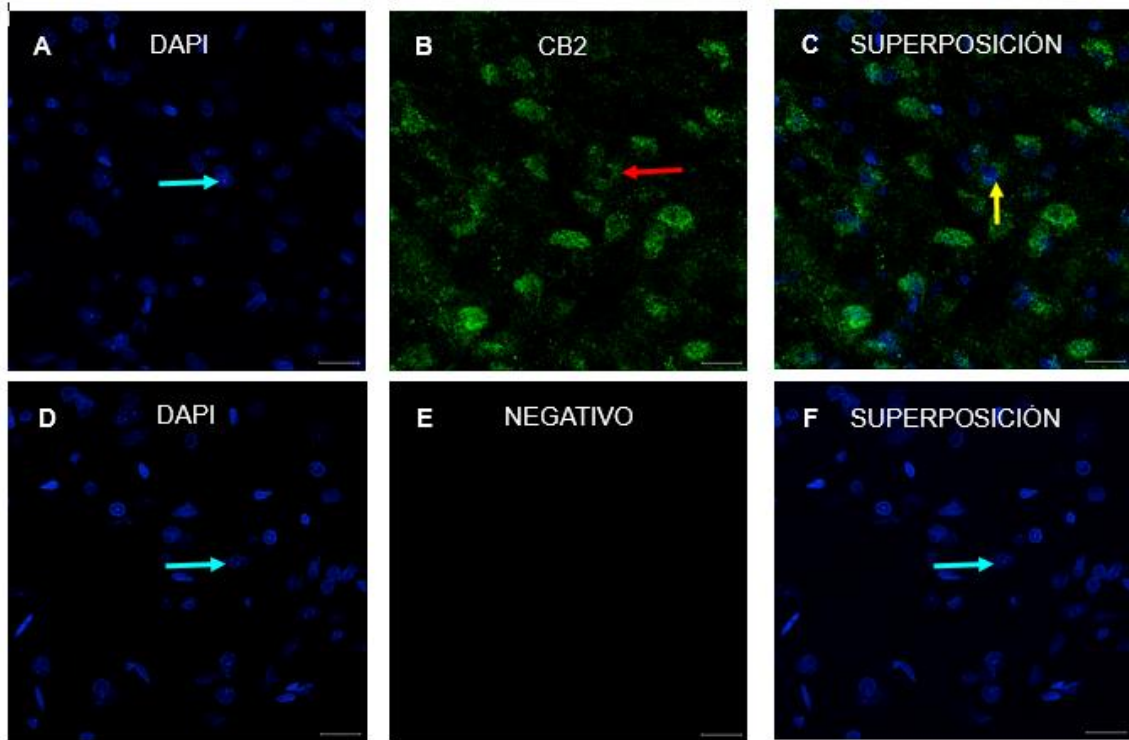
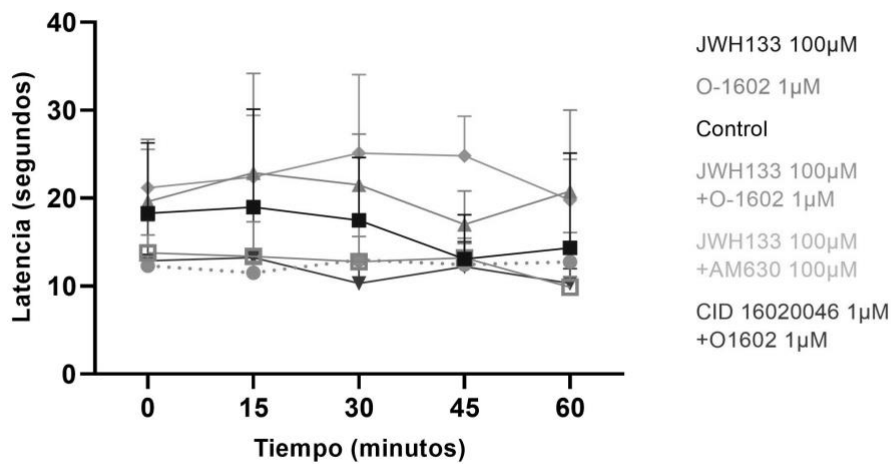


Figura 8. Marcaje de neuronas de tálamo ventral posterolateral (VPL) de la rata con marcador de transportador vesicular de glutamato tipo 2 (vGLUT2). A: Identificación de los núcleos celulares teñidos con el colorante DAPI (azul), el cual es un marcador fluorescente nuclear. B: se observa el receptor canabinoide tipo 2 (CB2) teñido de verde. C: se observa la tinción de vGLUT2 teñido de rojo. D: se observa la superposición de las imágenes A – C. Los puntilleos color naranja indican que hay una superposición de la tinción verde con la tinción roja, lo cual sugiere una localización presináptica del receptor CB2 en neuronas de VPL. Imágenes obtenidas mediante microscopio confocal con objetivo 63x.

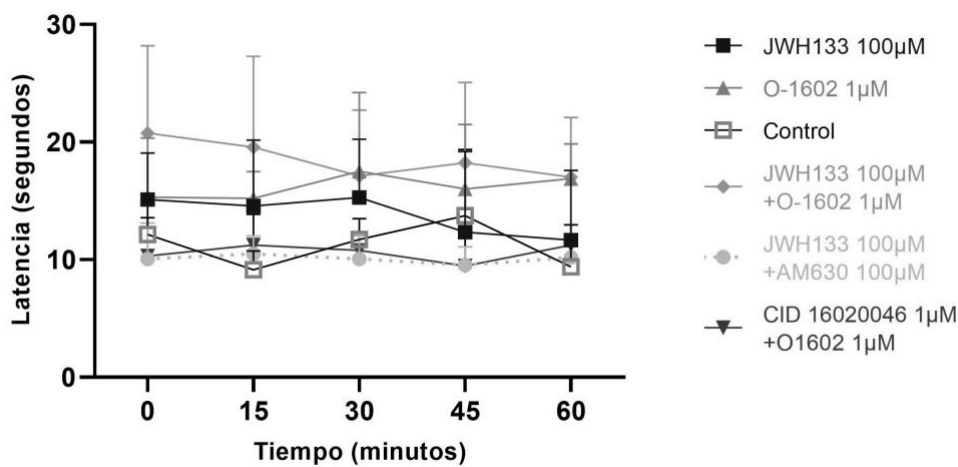


Barra de escala: 20 μ m

Figura 7. Expresión del receptor canabinoide tipo 2 (CB2) en el tálamo ventral posterolateral (VPL) de la rata. A-C: Identificación celular de CB2. A: se observan los núcleos celulares teñidos con el colorante DAPI (azul, flecha azul claro). B: se observa la tinción de CB2 (verde, flecha roja). En este caso, la muestra fue incubada con el anticuerpo correspondiente a la proteína de interés, CB2. C: se observa la superposición de las imágenes A y B; los colorantes no se superponen por lo que se observa la distribución membranar y citoplasmática del receptor (flecha amarilla). D-F: Control negativo. D: se observan los núcleos celulares teñidos con el colorante DAPI (azul, flecha azul claro). E: no se observa la tinción (verde) de CB2 en las neuronas. En este caso, la muestra no fue incubada con el anticuerpo correspondiente a la proteína de interés, CB2. F: se observa la superposición de las imágenes D y E. Solo se observan los núcleos de las neuronas (flecha azul claro).

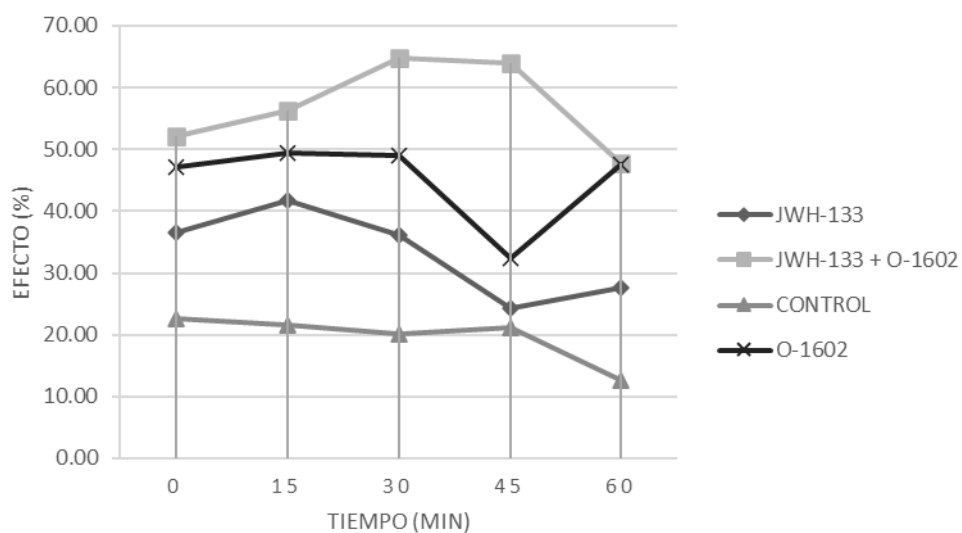


1a



1b

Gráficas 1a y 1b. 1a: La medición de la latencia de retirada de la cola fue realizada a 1.5 cm de la parte dorsal distal a partir de la punta de la cola. 1b: La medición de la latencia de retirada de la cola fue realizada a 5 cm de la parte dorsal distal a partir de la punta de la cola. Las latencias (media \pm S. E.), después de la administración intratálámica de 100 μ M de JWH-133, 1 μ M de O-1602 y 100 μ M de JWH-133 + 1 μ M de O-1602, medidas desde el minuto 0 al 60, mediante la prueba de retirada de la cola. JWH-133 fue administrado con el antagonista selectivo de CB2, AM630; O-1602 fue administrado con el antagonista de GPR55, CID 16020046. Prueba de ANOVA, seguida de prueba de comparación múltiple de Dunnett. O-1602, y JWH-133 + O-1602, $p < 0.001$ respecto al Control; JWH-133, $p < 0.05$ respecto al Control. En la Gráfica 1b, JWH-133 + O-1602, $p < 0.001$ respecto al Control. El resto de los tratamientos en 1ª y 1b no mostraron diferencias significativas respecto al Control.



Gráfica 2. El cambio en el efecto antinociceptivo calculado mediante la Ecuación 1, posterior a la administración intratálamica de 100 μM de JWH-133, 1 μM de O-1602, y 100 μM de JWH-133 + 1 μM O-1602, medido desde el minuto 0 al 60. El efecto antinociceptivo es medido usando la prueba de retirada de la cola, en la medición realizada a 1.5 cm de la parte dorsal distal desde la punta de la cola.

11 Bibliografía.

- Ahn, K., McKinney, M. K., & Cravatt, B. F. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chemical Reviews*, 108(5), 1687–1707. <https://doi.org/10.1021/cr0782067>.
- Arnone, L. E., Delgorge, C., Trillou, C. R., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J., Soubrie, P., Trillou, R., Gonalons, N., Keane, P., & Soubrie, P. (2003). *Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice.* 345–353.
- Avalos-Fuentes, A., Loya-López, S., Flores-Pérez, A., Recillas-Morales, S., Cortés, H., Paz-Bermúdez, F., Aceves, J., Erlij, D., & Florán, B. (2013). Presynaptic CaMKII α modulates dopamine D3 receptor activation in striatonigral terminals of the rat brain in a Ca²⁺ dependent manner. *Neuropharmacology*, 71, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.010>
- Balenga, N. A., Aflaki, E., Kargl, J., Platzer, W., Schröder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A. J., Heinemann, A., & Waldhoer, M. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Research*, 21(10), 1452–1469. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.60>
- Balenga, N. A. B., Henstridge, C. M., Kargl, J., & Waldhoer, M. (2011). Pharmacology, Signaling and Physiological Relevance of the G Protein-coupled Receptor 55. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 62). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00004-X>
- Balenga, N. A., Martínez-Pinilla, E., Kargl, J., Schröder, R., Peinhaupt, M., Platzer, W., Bálint, Z., Zamarbide, M., Dopeso-Reyes, I. G., Ricobaraza, A., Pérez-Ortiz, J. M., Kostenis, E., Waldhoer, M., Heinemann, A., & Franco, R. (2014). Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. *British Journal of Pharmacology*, 171(23), 5387–5406. <https://doi.org/10.1111/bph.12850>
- Bannon, A. W., & Malmberg, A. B. (2007). Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, October, 1–16. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41>
- Battista, N., Tommaso, M. Di, Bari, M., & Maccarrone, M. (2012). *The endocannabinoid system: an overview.* 6(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00009>
- Beltramo, M., Bernardini, N., Bertorelli, R., Campanella, M., Nicolussi, E., Fredduzzi, S., & Reggiani, A. (2006). CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *European Journal of Neuroscience*, 23(December 2005), 1530–1538. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04684.x>
- Berge, O., Garcia-cabrera, I., & Hole, K. (1988). *Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature.* 284–288.
- Boon, F. S. Den, Chameau, P., Schaafsma-zhao, Q., Aken, W. Van, Bari, M., Oddi, S., Kruse, C. G., Maccarrone, M., Wadman, W. J., Werkman, R., Boon, F. S. Den, Chameau, P., Schaafsma-zhao, Q., Aken, W. Van, Barib, M., Oddicd, S., Kruse, C. G., Maccarronec, M., Wadman, W. J., &

- Werkman, T. R. (2012). *Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111111111>
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., & Casellas, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 237(3), 704–711. <https://doi.org/10.1046/j.1462-8651.1996.00341.x>
- Bouskila, J., Javadi, P., Casanova, C., & Ptito, M. (2013). *Rod Photoreceptors Express GPR55 in the Adult Vervet Monkey Retina*. 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081080>
- Brown, S. M., Wager-Miller, J., & Mackie, K. (2002). Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1576(3), 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00341-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00341-X)
- Brusco, A., Tagliaferro, P. A., Saez, T., & Onaivi, E. S. (2008). *Ultrastructural Localization of Neuronal Brain CB2 Cannabinoid Receptors*. 457, 450–457. <https://doi.org/10.1196/annals.1432.037>
- Bürkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation). *BioEssays*, 23(9), 795–806. <https://doi.org/10.1002/bies.1115>
- Cabral G. A., G.-T. L. (2009). Emerging Role of the CB2 Cannabinoid Receptor in Immune Regulation and Therapeutic Prospects. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11(804), 1–31. <https://doi.org/10.1017/S1462399409000957>
- Cabral, G. A., Rogers, T. J., & Lichtman, A. H. (2015). *Turning Over a New Leaf: Cannabinoid and Endocannabinoid Modulation of Immune Function*. 193–203. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9615-z>
- Cannabinoides, S. (n.d.). *Guía Básica sobre los Cannabinoides*.
- Cerebral, F., & Rom, F. (n.d.). *Neuropsicología TEMA 2: ORGANIZACIÓN Y FUNCION CEREBRAL*.
- Cherif, H., Argaw, A., Cécyre, B., Bouchard, A., Gagnon, J., Javadi, P., Desgent, S., Mackie, K., & Bouchard, J. (2015). *Role of GPR55 during Axon Growth and Target*. 2(October).
- Chiurchiù, V., Lanuti, M., Bardi, M. De, Battistini, L., & Maccarrone, M. (2014). *The differential characterization of GPR55 receptor in human peripheral blood reveals a distinctive expression in monocytes and NK cells and a proinflammatory role in these innate cells*. 27(3), 153–160. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu097>
- Craig, A. D., Bushnell, M. C., Zhang, E.-T., & Blomqvist, A. (1994). A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature*, 372(6508), 770–773. <https://doi.org/10.1038/372770a0>
- Curto-Reyes, V., Llamas, S., Hidalgo, A., Menéndez, L., & Baamonde, A. (2010). Spinal and peripheral analgesic effects of the CB2 cannabinoid receptor agonist AM1241 in two models of bone cancer-induced pain. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 561–573. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00629.x>
- Deliu, E., Sperow, M., Console-Bram, L., Carter, R. L., Tilley, D. G., Kalamarides, D. J., Kirby, L. G., Brailoiu, G. C., Brailoiu, E., Benamar, K., & Abood, M. E. (2015). The Lysophosphatidylinositol Receptor GPR55

- Modulates Pain Perception in the Periaqueductal Gray. *Molecular Pharmacology*, 88(2), 265–272. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099333>
- Di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12(4), 692–698. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6>
- Fernández-ruiz, J. (2009). *The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction*. 1029–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00088.x>
- Ferré, S., & Franco, R. (2011). Oligomerization of G protein-coupled receptors: A reality. *Curr Opin Pharmacol*, 10(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.11.002>. Oligomerization
- Friedman, E., Jin, L. Q., Cai, G. P., Hollon, T. R., Drago, J., Sibley, D. R., & Wang, H. Y. (1997). D₁-like dopaminergic activation of phosphoinositide hydrolysis is independent of D_{1A} dopamine receptors: Evidence from D_{1A} knockout mice. *Molecular Pharmacology*, 51(1), 6–11.
- Gasperi, V., Dainese, E., Oddi, S., Sabatucci, a, & Maccarrone, M. (2013). GPR55 and its interaction with membrane lipids: comparison with other endocannabinoid-binding receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 20(1), 64–78. <https://doi.org/10.2174/09298673130108>
- Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A., & Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. In *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (Vol. 89, Issues 3–4, pp. 105–111). <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001>
- Gomes, I., Jordan, B. A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V., & Devi, L. A. (2000). Heterodimerization of μ and δ Opioid Receptors: A Role in Opiate Synergy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(22), RC110–RC110. <https://doi.org/20004736> [pii]
- Gong, J.-P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, 1071(1), 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.035>
- Gonzalez, B., Paz, F., Florán, L., Aceves, J., Erlij, D., & Florán, B. (2009). Cannabinoid agonists stimulate [3H]GABA release in the globus pallidus of the rat when G_j protein-receptor coupling is restricted: Role of dopamine D₂ receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(3), 822–828. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145425>
- Greco, R., Mangione, A. S., Sandrini, G., Nappi, G., & Tassorelli, C. (2014). Activation of CB₂ receptors as a potential therapeutic target for migraine: evaluation in an animal model. *Journal of Headache and Pain*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1129-2377-15-14>
- Green, A. L., Wang, S., Owen, S. L. F., Xie, K., Liu, X., Paterson, D. J., Stein, J. F., Bain, P. G., & Aziz, T. Z. (2005). Deep brain stimulation can regulate arterial blood pressure in awake humans. *NeuroReport*, 16(16), 1741–1745. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000183904.15773.47>
- Grotenhermen, F. (2006). *Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide*. 1(1), 10–14.
- Gui, H., Liu, X., Wang, Z.-W., He, D.-Y., Su, D.-F., & Dai, S.-M. (2014). Expression of cannabinoid receptor 2 and its inhibitory effects on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 53(January), 802–809. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket447>

- Hamm, H. E., & Hamm, H. E. (1998). *Signaling* *. 669–672. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.669>
- Hazekamp, A., Ware, M. a, Muller-Vahl, K., Abrams, D., & Grotenhermen, F. (2013). The medicinal use of cannabis and cannabinoids—An international cross-sectional survey on administration forms. *Journal of Psychoactive Drugs*, 45(3), 199–210. <https://doi.org/10.1080/02791072.2013.805976>
- Hole, K., & Tj, A. (1993). *Review Article The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor*. 53, 247–254.
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 161–202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Ishiguro, H., Horiuchi, Y., Ishikawa, M., Koga, M., Imai, K., Suzuki, Y., Morikawa, M., Inada, T., Watanabe, Y., Takahashi, M., Someya, T., Ujike, H., Iwata, N., Ozaki, N., Onaivi, E. S., Kunugi, H., Sasaki, T., Itokawa, M., Arai, M., ... Arinami, T. (2010). Brain Cannabinoid CB2 Receptor in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 67(10), 974–982. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.024>
- Iwamura, H., Suzuki, H., Ueda, Y., Kaya, T., & Inaba, T. (2001). In Vitro and in Vivo Pharmacological Characterization of JTE- 907, a Novel Selective Ligand for Cannabinoid CB 2 Receptor. *Pharmacology*, 296(2), 420–425.
- Iyer, V., Slivicki, R. A., Thomaz, A. C., Crystal, J. D., Mackie, K., & Hohmann, A. G. (2020). The cannabinoid CB2 receptor agonist LY2828360 synergizes with morphine to suppress neuropathic nociception and attenuates morphine reward and physical dependence. *European Journal of Pharmacology*, 886(September), 173544. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173544>
- Izzo, A. A., Piscitelli, F., Capasso, R., Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Petrosino, S., & Marzo, V. Di. (2009). *Peripheral endocannabinoid dysregulation in obesity: relation to intestinal motility and energy processing induced by food deprivation and re-feeding Abbreviations: October 2008*, 451–461. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00183.x>
- J Irving, A., Rae, M., & A Coutts, A. (2002). Cannabinoids on the Brain. In *TheScientificWorldJournal* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.139>
- Jhaveri, M. D., Elmes, S. J. R., Richardson, D., Barrett, D. a., Kendall, D. a., Mason, R., & Chapman, V. (2008). Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB2 receptors in the thalamus of neuropathic rats. *European Journal of Neuroscience*, 27(7), 1722–1730. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06162.x>
- Karginov, A., & Agaphonov, M. (2016). *Benchmarks IN IT IS IO*. 261(November), 260–261. <https://doi.org/10.2144/000114474>
- Kreitzer, F. R., & Stella, N. (2009). The therapeutic potential of novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.*, 122(2), 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.01.005>
- Lauckner, J. E., Hille, B., & Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19144–19149.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0509588102>
- Lee, M. A. (2012). The discovery of the Endocannabinoid System. *O'Shaughnessy's Online*, 2. <http://www.beyondthc.com/wp-content/uploads/2012/07/eCBSSystemLee.pdf>
- López-Ramírez, G., Sánchez-Zavaleta, R., Ávalos-Fuentes, A., José Sierra, J., Paz-Bermúdez, F., Leyva-Gómez, G., Segovia Vila, J., Cortés, H., & Florán, B. (2020). D2 autoreceptor switches CB2 receptor effects on [3H]-dopamine release in the striatum. *Synapse*, 74(3), 1–20. <https://doi.org/10.1002/syn.22139>
- Mallat, A., Teixeira-clerc, F., & Lotersztajn, S. (2013). Clinical Application of Basic Science Cannabinoid signaling and liver therapeutics. *Journal of Hepatology*, 59(4), 891–896. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.032>
- Manzanares, J., Julian, M. D., & Carrascosa, A. (2006). *Role of the Cannabinoid System in Pain Control and Therapeutic Implications for the Management of Acute and Chronic Pain Episodes*. 239–257.
- Marchalant, Y., Brownjohn, P. W., Bonnet, A., Kleffmann, T., & Ashton, J. C. (2014). *Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody Specificity*. 62(6). <https://doi.org/10.1369/0022155414530995>
- Maresz, K., Carrier, E. J., Ponomarev, E. D., Hillard, C. J., & Dittel, B. N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*, 95(2), 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x>
- Marinissen, M. J., & Gutkind, J. S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(7), 368–376. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01678-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01678-3)
- Martin, W. J., Hohmann, a G., & Walker, J. M. (1996). Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(20), 6601–6611.
- Martinez, A. (2015). Anatomía del sistema nervioso. *Anatomía*, 27. http://recursosbiblio.url.edu.gt/publicjlg/Libros_y_mas/2015/08/biop/cap/03.pdf
- Montes, Á., Villarreal, D. O., Silva, R. C., & Chávez, C. (2009). *el cierre y reparación de heridas superficiales provocadas por trauma*. 1, 51–54.
- Moreno, E., Andradas, C., Medrano, M., Caffarel, M. M., Pérez-Gómez, E., Blasco-Benito, S., Gómez-Cañas, M., Pazos, M. R., Irving, A. J., Lluís, C., Canela, E. I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., McCormick, P. J., & Sánchez, C. (2014). Targeting CB2-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 21960–21972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.561761>
- Munro S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61–65.
- No Title. (n.d.). <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n4/v11n4a15.pdf>
- Nurmikko, T. J., Serpell, M. G., Hoggart, B., Toomey, P. J., Morlion, B. J., & Haines, D. (2007). Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Pain*, 133(1–3), 210–220.

- <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.028>
- Ouellet, D. M. C., & Pollack, G. M. (1995). A pharmacokinetic-pharmacodynamic model of tolerance to morphine analgesia during infusion in rats. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, *23*(6), 531–549. <https://doi.org/10.1007/BF02353460>
- Perena, M. J., Perena, M. F., & Romera, M. D. R. E. (2000). *Neuroanatomía del dolor*. 5–10.
- Pertwee, R. G. (2015). Endocannabinoids. In *Endocannabinoids*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1>
- Pope, H. G., Gruber, A. J., Hudson, J. I., Cohane, G., Huestis, M. A., & Yurgelun-todd, D. (2003). *Early-onset cannabis use and cognitive deficits : what is the nature of the association ?* 69.
- Romero-Zerbo, S. Y., Rafacho, A., Díaz-Arteaga, A., Suárez, J., Quesada, I., Imbernon, M., Ross, R. A., Dieguez, C., de Fonseca, F. R., Nogueiras, R., Nadal, A., & Bermúdez-Silva, F. J. (2011). Role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology*, *211*(2), 177–185. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0166>
- Russo, E. B. (2008). Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, *4*(1), 245–259. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S1928>
- Russo, M., Naro, A., Aleo, G. D., & Bramanti, P. (2016). Evaluating Sativex in Neuropathic Pain Management: A Clinical and Neurophysiological Assessment in Multiple Sclerosis. *Pain Medicine*, *17*, 1145–1154. <https://doi.org/10.1093/pm/pnv080>
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, *152*(7), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
- Sagar, D. R., Kelly, S., Millns, P. J., Shaughnessey, C. T. O., Kendall, D. A., & Chapman, V. (2005). *Inhibitory effects of CB 1 and CB 2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats*. *22*(March), 371–379. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04206.x>
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D. K., Lynch, K. R., Cheng, R., Heng, H. H. Q., George, S. R., & Dowd, B. F. O. (1999). *Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52 , C GPR53 and GPR55 : GPR55 is extensively expressed in human brain 1*. 193–198.
- Schatz, A. R., Lee, M., Condie, R. B., Pulaski, J. T., & Kaminski, N. E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, *142*(142), 278–287. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8034>
- Schusdziarra, V., Zyznar, E., Rouiller, D., Boden, G., & Brown, J. C. (1980). *Laminar Organization*. *207*(February), 532–536.
- Selvarajah, D., Gandhi, R., Emery, C. J., & Tesfaye, S. (2010). Randomized placebo-controlled double-blind clinical trial of cannabis-based medicinal product (Sativex) in painful diabetic neuropathy: Depression is a major confounding factor. *Diabetes Care*, *33*(1), 128–130. <https://doi.org/10.2337/dc09-1029>
- Serpell, M. G., Notcutt, W., & Collin, C. (2013). Sativex long-term use: An open-label trial in patients with spasticity due to multiple sclerosis. *Journal of*

- Neurology*, 260(1), 285–295. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6634-z>
- Seyer, B., Pham, V., Albiston, A. L., & Yeen, S. (2016). Neuroscience Letters Cannula implantation into the lateral ventricle does not adversely affect recognition or spatial working memory. *Neuroscience Letters*, 628, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.034>
- Shore, D. M., & Reggio, P. H. (2015). The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Frontiers in Pharmacology*, 6(April), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00069>
- Staton, P. C., Hatcher, J. P., Walker, D. J., Morrison, A. D., Shapland, E. M., Hughes, J. P., Chong, E., Mander, P. K., Green, P. J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H. C., Smith, J. C., Bailey, L. T., Wise, A., Brown, A. J., Richardson, J. C., & Chessell, I. P. (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 139(1), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.006>
- Suárez, G. R. (2008). *Gustavo Ramón S .**. Instituto Universitario de Educación Física, Universidad de Antioquia. http://viref.udea.edu.co/contenido/menu_alterno/apuntes/ac19-diencefalo.pdf
- U-, I., France, D. L. B., Bristol-myers-squibb, L. U., Grande, L., Nord, A., & De, P. La. (2014). *Animal Models of Nociception Animal Models of Nociception*. August.
- Uso, C. Y., & Laboratorio, D. E. L. O. S. A. D. E. (2001). *Nom-062*.
- V, M. Á. V. (2008). *Instilación ocular casual con cianoacrilato*. 4–7.
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., & Sharkey, K. A. (2005). Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB_2 Receptors. *Science*, 310(September), 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>
- Wilson, R. I., Nicoll, R. A., Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2012). *Endocannabinoid Signaling in the Brain*. 678(2002), 678–682. <https://doi.org/10.1126/science.1063545>
- Wu, D., Wang, S., Stein, J. F., Aziz, T. Z., & Green, A. L. (2014). Reciprocal interactions between the human thalamus and periaqueductal gray may be important for pain perception. *Experimental Brain Research*, 232(2), 527–534. <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3761-4>
- Yu, S.-J., Reiner, D., Shen, H., Wu, K.-J., Liu, Q.-R., & Wang, Y. (2015). Time-Dependent Protection of CB2 Receptor Agonist in Stroke. *Plos One*, 10(7), e0132487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132487>