

LA LODOXAMIDA INTRAESTRIATAL PRODUCE PREFERENCIA DE LUGAR CONDICIONADA EN RATAS A TRAVÉS DE MECANISMOS INDEPENDIENTES DE GPR35

Díaz-Barba Alejandro¹ | Guerrero-Alba Raquel¹ | Quintanar J. Luis¹ | Marichal-Cancino Bruno A.^{1✉}

1. Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes

Correspondencia

Dr. Bruno A. Marichal Cancino
Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Ciudad Universitaria, 20100, Aguascalientes, Ags., México.

✉ bruno.marichal@edu.uaa.mx

Resumen

La función del receptor acoplado a proteínas 35 (GPR35) en el sistema nervioso central (SNC) sigue siendo en gran medida desconocida. Debido a su expresión en el estriado ventral, una zona clave en el sistema de recompensa cerebral, se cuestiona la función de GPR35 en las acciones reforzantes. Para analizar si la activación de GPR35 en el estriado ventral está relacionada con las acciones reforzantes, ratas Wistar macho (250-300 g) recibieron cirugía estereotáctica para colocar cánulas guía en el estriado ventral. Se injectó lodoxamida (un agonista completo de GPR35 de rata) o vehículo (DMSO 10%) (intraestriado ventral) en ausencia y durante el pretratamiento con ML-194 (un antagonista selectivo de GPR35). La lodoxamida (100 pmol) indujo un aumento significativo de la preferencia por la cámara de acondicionamiento farmacológico ($p < 0,05$), pero no el vehículo ni el ML-194 por sí ($p > 0,05$). Por otra parte, el pretratamiento con ML-194 no impidió los efectos reforzantes de la lodoxamida. Por lo tanto, las acciones reforzantes de la lodoxamida (estriado intraventral) implican mecanismos probablemente independientes de la GPR35 que quedan por identificar.

Palabras clave: GPR35, lodoxamida, ML-194, paradigma de preferencia de lugar condicionado.

Introducción

El GPR35 se descubrió inicialmente en el intestino de la rata.¹ Este receptor está acoplado a las proteínas G α i/o y G α 13.²⁻⁵ El ácido cinurénico (KYNA) sigue siendo el ligando agonista endógeno más probable para el GPR35.^{3,5} Curiosamente, también parece regular negativamente los niveles de dopamina en el estriado ventral,⁶ así como los niveles de glutamato en el hipocampo.⁷ Sin embargo, los mecanismos de acción de estos efectos siguen sin estar claros. Informes anteriores han implicado acciones sobre: i) el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 (alfa7nAChR); ii) el receptor de ácido N-metil-D-aspártico (NMDAR); iii) el GPR35; iv) entre otros (por ejemplo, los canales GABA).⁸⁻¹⁰ Además, recientemente se ha propuesto la importante participación de la vía de la cinurenina en los fenómenos de adicción.¹¹ Existen numerosas pruebas del papel de los canales alfa7nAChR, NMDA y GABA en las adicciones, pero no del GPR35.

En el sistema nervioso, se ha descrito la presencia de GPR35 en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal,⁹ y una expresión moderada en el cerebro y la médula espinal.¹²

En las neuronas sensoriales, sus funciones están relacionadas con la inhibición del dolor, mientras que su papel en el sistema nervioso central (SNC) está menos claro, aunque se ha demostrado que la pérdida de GPR35 puede subyacer al menos a un tipo de retraso mental (es decir, la Osteodistrofia hereditaria de Albright).¹³ Este estudio piloto se creó para explorar los efectos farmacológicos de las inyecciones intraestriatales de lodoxamida (un agonista completo de GPR35) en el paradigma de preferencia de lugar condicionado.

Métodos

Animales

Cincuenta ratas Wistar macho (250-300 g) en su etapa adulta joven (~ 8 semanas)¹⁴ se obtuvieron del vivero de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Todos los protocolos experimentales y de manipulación fueron aprobados por nuestro Comité de Ética Institucional (CE-UAA) y siguieron la Norma Mexicana para el Cuidado de los Animales (NOM-062-ZOO-1999) en severa armonía con la guía ARRIVE¹⁵ y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en EUA.¹⁶



“2022 © Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Esta obra está bajo una licencia de acceso abierto Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el trabajo original sea correctamente citado. No se permite la reutilización comercial.”

Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a agua y alimento.

Cirugía estereotáctica

Todas las ratas fueron anestesiadas con 1 mL/kg (i.p.) del cóctel Zoletil®50 (35 mg/mL + Xilacina 8 mg/mL). Se colocó estereotácticamente una cánula guía de dos lados en el estriado ventral (P: 1,28 mm, L: 3 mm y V: 7 mm) según Paxinos y Watson.¹⁷ La cánula guía se sujetó al cráneo con dos tornillos y acrílico dental, y se insertó un estilete en la guía. Tras la cirugía, los animales se encontraban en una fase de recuperación postoperatoria de al menos siete días, tal y como se informó anteriormente.^{18,19}

Las microinyecciones se realizaron durante un periodo de 60 s utilizando una bomba de jeringa (Sage Instruments, modelo 355); la cánula de inyección se dejó inmóvil durante otros 60s para evitar el reflujo del fármaco. El ácido 2,2'-[(2-cloro-5-ciano-1,3-fenileno)diimino]bis-2-oxoacético (lodoxamida) y el CID-9581011 (ML194) se disolvieron en dimetilsulfóxido al 10% (DMSO al 10%). Se prepararon soluciones frescas cada día experimental y se consideró la base libre para calcular las concentraciones indicadas. Los fármacos utilizados en el presente estudio se adquirieron a Sigma Aldrich® (Saint Louis, Missouri, EE.UU.).

Procedimiento conductual

El aparato de preferencia de lugar condicionado (CPP) consistía en dos grandes cámaras laterales (41,5 cm X 32,5 cm X 30,5 cm) y una cámara intermedia entre ambos compartimentos (27,5 cm X 15 cm X 12,5 cm). Las dos cámaras laterales diferían en las texturas del suelo (rugoso frente a fino) y en las señales somatosensoriales (negro frente a blanco). El paradigma CPP constaba de tres fases diferentes: preacondicionamiento, con una duración de 3 días continuos, acondicionamiento, con una duración de 5 días continuos, y el día de la prueba. El aparato CPP se colocó en una habitación aislada y tranquila que se iluminó con luz roja, y cada procedimiento se grabó en vídeo para su posterior análisis.

Durante la fase de condicionamiento, los animales fueron tratados y colocados en la cámara opuesta (preferida) durante la fase de preacondicionamiento. La diferencia entre el tiempo pasado en el compartimento con la droga a lo largo del día de prueba y el tiempo pasado en el compartimento con la droga durante el preacondicionamiento (cambio de preferencia lateral) se tomó como grado de condicionamiento. Por lo tanto, un aumento estadísticamente significativo del tiempo pasado en la cámara con el fármaco emparejado sugiere un

efecto de condicionamiento inducido por los tratamientos, como se informó anteriormente.²⁰

Fase de preacondicionamiento

La línea de base y la preferencia de compartimento se determinaron colocando a cada animal en el pasillo central del aparato CPP y, a continuación, retirando las barreras para permitir el libre acceso a todo el aparato durante 15 min los días 1 a 3. El tiempo medio pasado en la cámara no preferida (es decir, la cámara en la que los animales pasaron menos tiempo) durante estos días se utilizó como línea de base.^{20,21}

Fase de acondicionamiento del contrabalanceo

Esta fase consistió en 5 días de sesiones de acondicionamiento. Cinco minutos antes de realizar cada sesión de compartimentos emparejados, se microinyectó a través de las cánulas en el estriado ventral el vehículo de los pretratamientos (10% DMSO), lodoxamida (56 pmol), lodoxamida (100 pmol), ML-194 (300 pmol), o ML194 (300 pmol) + lodoxamida (100 pmol) (Figura 1).

Experimental Design



Figura 1. Diseño experimental. Creado con BioRender.com.

El condicionamiento se llevó a cabo dos veces al día (7:00 a.m. y 11 a.m.) con un intervalo de 4 horas entre cada sesión de 15 minutos. Se aplicó un esquema de contrabalanceo inyectando tratamiento/vehículo en la cámara emparejada y no emparejada, respectivamente. El acceso a otros compartimentos se bloqueó con puertas de guillotina durante esta fase.

Día de la prueba

Al día siguiente de la fase de condicionamiento, se llevó a cabo la fase de prueba. Se retiraron las puertas de guillotina y las ratas tuvieron acceso a todo el aparato. Se grabó en vídeo el tiempo que cada rata pasó en los compartimentos durante un periodo de 15 minutos. Se registró la diferencia entre el tiempo pasado en el compartimento con la droga durante el día de la prueba y el tiempo pasado en el compartimento con la droga durante el preacondicionamiento (cambio de preferencia lateral).

Histología

Al final del procedimiento conductual, se administró a los animales una sobredosis letal de pentobarbital sódico (70–100 mg/kg, i.p.). Se realizó una perfusión intracardíaca con solución salina isotónica al 0,9% seguida de formaldehído al 4%; se extrajo el cerebro y se conservó en formaldehído al 10%. Posteriormente, el cerebro se montó en un baño de sacarosa al 30% y se seccionó coronalmente (60 µm) utilizando un criostato. Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo (Sigma®, St Louis, MO) y se examinaron con microscopio para identificar el lugar de microinyección, en consulta con Paxinos y Watson.¹⁷ Sólo se incluyeron en este estudio las ratas canuladas en el estriado ventral.

Análisis de datos

Para todas las pruebas, la medida de tendencia central fue el valor medio, y la medida de dispersión fue el error estándar de la media (SEM). Todos los datos mostraron una distribución normal. Las comparaciones para el protocolo CPP se obtuvieron con un análisis de varianza de dos vías con medidas repetidas (ANOVA-RM de dos vías). Si procedía, este análisis iba seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Para todos los experimentos, la significación estadística se consideró $P < 0,05$.

Resultados

La figura 2 muestra el tiempo transcurrido en el paradigma CPP en función de las distintas concentraciones de lodoxamida. La concentración de 100 pmol de lodoxamida aumentó el tiempo de permanencia en la cámara de

acondicionamiento farmacológico durante el ensayo [$F(1, 27) = 6,328, p = 0,018$] en comparación con el valor basal, mientras que no se detectaron cambios en este valor en los grupos vehículo y 56 pmol de lodoxamida ($p > 0,05$; figura 2).

La Figura 3 muestra los efectos de un antagonista selectivo del receptor GPR35 per se y sobre las acciones reforzantes de 100 pmol de lodoxamida. Por sí mismo, el ML194 no modificó el tiempo de permanencia en la cámara de acondicionamiento de la droga durante la prueba en comparación con el valor basal. Además, no pudo evitar el incremento de este valor durante la prueba con los animales que recibieron 100 pmol de lodoxamida [$F(1, 18) = 5,198, p = 0,035$] (Figura 3). Adicionalmente, el tiempo pasado en la cámara de acondicionamiento al fármaco durante la prueba fue mayor en ML194 (300 pmol) + lodoxamida (100 pmol) en comparación con ML194 (300 pmol) ($P < 0,05$, Figura 3).

Debate

General

En informes anteriores, las inyecciones sistémicas de ácido cinurénico (un agonista completo de GPR35) atenuaron los efectos gratificantes de la morfina en el paradigma CPP²³. Una dosis baja de ácido cinurénico produjo una tendencia a aumentar el tiempo de permanencia en el brazo emparejado con la droga en el paradigma CPP (no reportado con dosis más altas), sugiriendo un posible efecto reforzador de este ácido.²³ Curiosamente, los efectos preventivos del ácido cinurénico sobre las acciones reforzantes de la morfina se han relacionado con su papel como antagonista de los canales NMDA.²³ Esta premisa puede apoyarse en el hecho de que el bloqueo de los receptores NMDA previno tanto los efectos reforzantes como aversivos de diversas sustancias en el paradigma CPP.²⁴ Sin embargo, se había omitido la evaluación de la posible participación del GPR35. En nuestro estudio, una dosis baja de lodoxamida (100 pmol) — un agonista completo del receptor GPR35 sin actividad descrita sobre los canales NMDA — en el estriado ventral produjo un aumento de la preferencia de lugar en el paradigma CPP (Figura 2). Este efecto reforzador fue altamente reproducible (Figuras 2 y 3), pero resistente al bloqueo con un antagonista selectivo de GPR35 (es decir, ML-194; Figura 3). Por lo tanto, el mecanismo de acción probablemente implique vías independientes de GPR35 que permanecen indeterminadas.

Mecanismos hipotéticos implicados en las acciones reforzantes de la lodoxamida

Clínicamente, el principal uso de la lodoxamida en oftalmología está relacionado con sus acciones

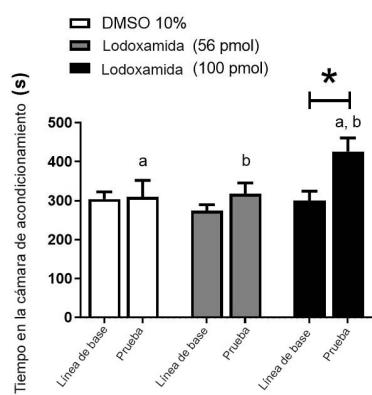


Figura 2. Efecto de las inyecciones intraestriatales de vehículo (DMSO 10%) o lodoxamida (56 y 100 pmol) sobre el tiempo de permanencia en la cámara emparejada con fármacos.*, p < 0,05 frente a la línea de base respectiva; a, p < 0,05 lodoxamida (100 pmol, durante la prueba) frente a vehículo (durante la prueba); b, p < 0,05 lodoxamida (100 pmol, durante la prueba) frente a lodoxamida (56 pmol, durante la prueba).

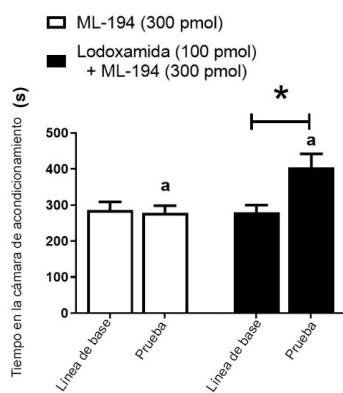


Figura 3. Efecto de las inyecciones intraestriatales ventrales de ML-194 (antagonista selectivo de GPR35) per se y sobre el cambio en la preferencia de lugar inducido por lodoxamida (100 pmol intra-ventral-striatum). *, p < 0,05 lodoxamida (100 pmol) + ML-194 (300 pmol; durante la prueba) frente a ML-194 (300 pmol; durante la prueba).

antiinflamatorias a través de la disminución de mastocitos, linfocitos T y otras células inmunitarias.²⁵ La lodoxamida también se ha descrito como fármaco antifibrogénico en un modelo de daño hepático.²⁶ Del mismo modo, se ha descrito que otros agonistas de GPR35, como el ácido pamoico, ejercen acciones neuroprotectoras.²⁷ Por lo tanto, las acciones de la lodoxamida van más allá de los receptores GPR35.

Se ha informado ampliamente de que los agentes analgésicos y antiinflamatorios pueden producir preferencia

de lugar condicionada y otras manifestaciones de acciones reforzantes.²⁸ De ahí que, como la lodoxamida puede producir acciones neuroprotectoras y antiinflamatorias, una idea especulativa lógica sea que sus efectos reforzadores pueden estar relacionados con ambos efectos. No obstante, nuestros animales permanecieron entre 7 y 10 días en tiempo de recuperación tras la cirugía, por lo que los procesos inflamatorios postoperatorios son poco probables. Dado que la lodoxamida incluye múltiples vías y modulación en la secreción de diferentes mediadores (histamina, serotonina, adenosina, etc.),^{29,30} la participación indirecta de otros compuestos que podrían alterar el sistema dopaminérgico también debería considerarse y estudiarse para determinar los mecanismos de acción de la lodoxamida.

Hay que admitir que este estudio no logró encontrar los mecanismos de acción de los efectos reforzantes inducidos por la lodoxamida. No obstante, nuestros datos pueden motivar nuevos protocolos de investigación dirigidos a comprender estos mecanismos y sus posibles efectos farmacológicos sobre el sistema de recompensa cerebral.

Conclusión

Nuestros datos mostraron que las inyecciones intracerebrales de lodoxamida a una concentración de 100 pmol en el estriado ventral provocan un aumento en el cambio de preferencia de lugar a través de mecanismos que aún no se han identificado, pero que son muy probablemente independientes de GPR35.

Conflictos de intereses

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses que revelar.

Contribuciones de los autores

AD-B llevó a cabo los protocolos experimentales y contribuyó a la curación de datos, redacción, revisión y edición del manuscrito; RG-A y JLQ contribuyeron a la conceptualización, redacción, revisión y edición; BAM-C redactó el borrador original y contribuyó al análisis formal, la obtención de fondos y la administración del proyecto.

Financiación

AD-B recibió una beca de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. B.A.M.C. recibió el apoyo de la beca PIFF21-1 de la Dirección General de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Referencias

1. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998;47(2):310-3. doi: [10.1006/geno.1998.5095](https://doi.org/10.1006/geno.1998.5095)
2. Fallarini S, Magliulo L, Paoletti T, de Lalla C, Lombardi G. Expression of functional GPR35 in human iNKT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(3):420-5. doi: [10.1016/j.bbrc.2010.06.09](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.09)
3. Guo J, Williams DJ, Puhl HL, 3rd, Ikeda SR. Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor, heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(1):342-51. doi: [10.1124/jpet.107.127266](https://doi.org/10.1124/jpet.107.127266)
4. Jenkins L, Alvarez-Curto E, Campbell K, de Munnik S, Canals M, Schlyer S, et al. Agonist activation of the G protein-coupled receptor GPR35 involves transmembrane domain III and is transduced via $\text{G}\alpha_{i3}$ and β -arrestin-2. *Br J Pharmacol*. 2011;162(3):733-48. doi: [10.1111/j.1476-5381.2010.01082.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01082.x)
5. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, et al. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem*. 2006;281(31):22021-8. doi: [10.1074/jbc.M603503200](https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200)
6. Amori L, Wu HQ, Marrazzo M, Pellicciari R, Guidetti P, Schwarcz R. Specific inhibition of kynurenine synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum. *Neuroscience*. 2009;159(1):196-203.
7. Pocivavsek A, Wu HQ, Potter MC, Elmer GI, Pellicciari R, Schwarcz R. Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory. *Neuropharmacology*. 2011;56(11):2357-67. doi: [10.1038/npp.2011.127](https://doi.org/10.1038/npp.2011.127)
8. Wonodi I, Schwarcz R. Cortical kynurenone pathway metabolism: a novel target for cognitive enhancement in Schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2010;36(2):211-8.
9. Ohshiro H, Tonai-Kachi H, Ichikawa K. GPR35 is a functional receptor in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365(2):344-8.
10. Mok MH, Fricker AC, Weil A, Kew JN. Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. 2009;57(3):242-9.
11. Morales-Puerto N, Giménez-Gómez P, Pérez-Hernández M, Abuin-Martínez C, Gil de Biedma-Elduayen L, Vidal R, et al. Adicción y vía de la cinurenila: ¿Una nueva pareja de baile? *Pharmacol Ther*. 2021;223:107807. doi: [10.1016/j.pharmthera.2021.107807](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107807)
12. Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinarast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Letters*. 2006;580(21):5003-8. doi: [10.1016/j.febslet.2006.08.015](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.015)
13. Shrimpton AE, Braddock BR, Thomson LL, Stein CK, Hoo JJ. Molecular delineation of deletions on 2q37.3 in three cases with an Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Clin Genet*. 2004;66(6):537-44. doi: [10.1111/j.1399-0004.2004.00363.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00363.x)
14. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624-30.
15. McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1573-6.
16. Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. Sociedad Americana de Fisiología. *Physiologist*. 1996;39(4):199, 208-11.
17. Paxinos G, Watson C. El cerebro de rata en coordenadas estereotáxicas. 7th ed. Nueva York: Academic Press; 2014.
18. Vázquez-León P, Miranda-Páez A, Calvillo-Robledo A, Marichal-Cancino BA. El bloqueo de GPR55 en el gris periacueductal dorsal produce comportamientos similares a la ansiedad y evoca respuestas agresivas defensivas en ratas preexpuestas al alcohol. *Neurosci Lett*. 2021;136218.
19. Vázquez-León P, Ramírez-San Juan E, Marichal-Cancino BA, Campos-Rodríguez C, Chávez-Reyes J, Miranda-Páez A. NPY-Y(1) receptors in dorsal periaqueductal gray modulate anxiety, alcohol intake, and relapse in Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2020;199:173071.
20. Liu J, Tao X, Liu F, Hu Y, Xue S, Wang Q, et al. Comportamiento y señalización Epac hipocampal a la nicotina CPP en ratones. *Transl Neurosci*. 2019;10:254-9.
21. Díaz-Barba A, Calvillo-Robledo A, Vázquez-León P, Gallegos-Vieyra E, Quintanar JL, Marichal-Cancino BA. Central GPR55 may prevent nicotine reinforcing actions: a preliminary study. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2022;82(3):304-14. doi: [10.55782/ane-2022-029](https://doi.org/10.55782/ane-2022-029)
22. Sun Y, Chen G, Zhou K, Zhu Y. A Conditioned Place Preference Protocol for Measuring Incubation of Craving in Rats. *J Vis Exp*. 2018(141).
23. Bespalov A, Dumpis M, Piotrovsky L, Zvartau E. Excitatory aminoacid receptor antagonist kynurenic acid attenuates rewarding potential of morphine. *Eur J Pharmacol*. 1994; 264(3):233-9.
24. Bespalov A. The expression of both amphetamine-conditioned place preference and pentylenetetrazole-conditioned place aversion is attenuated by the NMDA receptor antagonist (\pm)-CPP. *Drug Alcohol Depend*. 1996;41(1):85-8.
25. Avunduk AM, Avunduk MC, Dayanir V, Tekelioğlu Y, Dayioğlu YS. Pharmacological mechanism of topical lodoxamide treatment invernal keratoconjunctivitis: a flow-cytometric study. *Ophthalmic Res*. 1998; 30(1):37-43. doi: [10.4062/biomolther.2018.227](https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.227)
26. Kim MJ, Park SJ, Nam SY, Im DS. Lodoxamide Attenuates Hepatic Fibrosis in Mice: Involvement of GPR35. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019; 28(1):92-97. doi: [10.4062/biomolther.2018.227](https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.227). Epub ahead of print.
27. Sharmin O, Abir AH, Potol A, Alam M, Banik J, Rahman AFMT, Tarannum N, Wadud R, Habib ZF, Rahman M. Activation of GPR35 protects against cerebral ischemia by recruiting monocyte-derived macrophages. *Sci Rep*. 2020; 10(1):9400. doi: [10.1038/s41598-020-66417-8](https://doi.org/10.1038/s41598-020-66417-8).
28. Navratilova E, Xie JY, King T, Porreca F. Evaluation of reward from pain relief. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1282:1-11. doi: [10.1111/nyas.12095](https://doi.org/10.1111/nyas.12095)
29. Parenteau GL, Clark RE. Prevention of ischemia-reperfusion injury by the allergy drug lodoxamide tromethamine. *Ann Thorac Surg*. 1991; 52(4):832-8.
30. MacKenzie AE, Caltabiano G, Kent TC, Jenkins L, McCallum JE, Hudson BD, Nicklin SA, Fawcett L, Markwick R, Charlton SJ, Milligan G. The antiallergic mast cell stabilizers lodoxamide and bufrolin as the first high and equipotent agonists of human and rat GPR35. *Mol Pharmacol*. 2014; 85(1):91-104. doi: [10.1124/mol.113.089482](https://doi.org/10.1124/mol.113.089482).

Article without conflict of interest

© Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez