

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRÍA CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E  
INGENIERÍA GENÉTICA**



**TÍTULO:**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CERAMIDAS DE CADENA LARGA EN LA  
CORTEZA PREFRONTAL, SU PAPEL EN LA NEUROINFLAMACIÓN Y EL  
DESARROLLO DE UNA CONDUCTA SIMILAR A LA ANSIEDAD EN UN MODELO  
MURINO.**

**PRESENTADO POR:**

**L.B.G. LUIS ARMANDO VALENZUELA AHUMADA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA  
GENÉTICA.**

**MONTERREY, N.L.**

**JULIO 2025**

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CERAMIDAS DE CADENA LARGA EN LA CORTEZA PREFRONTAL, SU PAPEL EN LA NEUROINFLAMACIÓN Y EL DESARROLLO DE UNA CONDUCTA SIMILAR A LA ANSIEDAD EN UN MODELO MURINO.

**Aprobación de la tesis:**



---

**DR. C. ALBERTO CAMACHO MORALES**

Director de Tesis



---

**DR. C. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS**

Codirector de Tesis



---

**DR. C. ANTONIO ALÍ PÉREZ MAYA**

Miembro de la Comisión de Tesis



---

**DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**

Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

A mis padres, Leonor y Armando, mis pilares, mis anclas, y el más claro ejemplo de esfuerzo y entrega. Esta meta también es suya. Siempre seré su niño.

A mis hermanos, Oscar Uriel y Sebastian, por ser mi impulso constante. Todo esto lo hice pensando en ustedes, con la ilusión de que se sientan orgullosos de su hermano mayor.

A Dios, por su presencia en el silencio, por no dejarme solo ni un instante.

**"Ellos no lo saben, pero todo lo que soy comenzó en su abrazo."**

**-Luis Valdez**

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a **Dios**, por ser mi refugio en los momentos de incertidumbre y mi fuerza en los días de cansancio. Gracias por abrir caminos donde no los veía, por sostenerme cuando sentí que no podía más y por recordarme siempre que no estoy solo.

**Dr. Alberto Camacho**, gracias por abrirme las puertas de su equipo de trabajo, por darme la oportunidad de concretar mis primeras publicaciones como primer autor, por guiarme a mejorar como investigador y por estar siempre abierto a mis ideas. Lo volvería a elegir como mi asesor las veces que sea necesario.

**Dr. Gerardo Padilla y Dr. Alí Pérez**, gracias por su tiempo, sus valiosas observaciones y el rigor académico con el que enriquecieron este trabajo. Su compromiso y disposición fueron fundamentales para fortalecer esta investigación.

**Dra. Ana María Rivas**, gracias porque nunca me faltó su apoyo en mi vida profesional y académica, pero tampoco en la personal. Gracias por estar siempre dispuesta a escuchar y por empatizar con nosotros.

**Dra. Carmen Barboza**, gracias por ser un ejemplo a seguir dentro de la investigación. Algún día quiero ser un docente tan extraordinario como usted, al mismo tiempo que me soy fiel a mí mismo. Gracias por sus retroalimentaciones, por las palabras de aliento y por siempre echarme porras. La llevo a usted y al **Dr. Dector** siempre en el corazón.

**A los docentes del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular**, gracias por creer en mí y en mi trabajo, por aquel reactivo que me prestaron, por ayudarme a comprender mis resultados, por perdonar las faltas y llegadas tarde, por guiarme por el camino correcto. También gracias al personal administrativo, principalmente a Deya: gracias por explicarme todos los trámites cien veces y por tanto cariño.

**A mis compañeros de generación**, por siempre estar para mí. ¡Lo logramos!

**Dra. Sheila Villa**, esto no hubiera sido posible sin su enseñanza y paciencia. Gracias por adoptarme como su estudiante, por estar siempre pendiente de mi siguiente paso y, sobre todo, por confiar y ver lo mejor de mí, incluso cuando a mí se me complicaba hacerlo. Dra. Odila Saucedo y al Departamento de Morfología, gracias por abrirme la puerta de sus áreas, conocimientos y reactivos. Ha sido un honor trabajar con ustedes.

Y bien, una vez terminados los agradecimientos a quienes directamente contribuyeron con el proceso de mi tesis, toca el turno de aquellos que indirectamente me sostuvieron durante estos dos años.

**Al deporte**, y con ello **a mis entrenadores Mónica y Juan**, gracias por darle la oportunidad a este veterano de seguir haciendo lo que ama. Gracias por cada entrenamiento, regaño y oportunidad para mejorar, por aceptarme dentro de su familia y por siempre creer en mí, por darme ese lugar como colocador titular y como punta en los saltos y el baile. Sus palabras de aliento dentro y fuera del ámbito deportivo me hicieron crecer como deportista, investigador y, más importante aún, como persona.

**A mis compañeros de equipo, principalmente a Pollo, Checo Max, Emi y Sebas** gracias por brindarme un espacio en el cual puedo ser yo, por admirarme como yo los admiro, por todo el amor que siento cuando estoy con ustedes y por el vínculo fuerte que hemos logrado en estos dos años.

A la ya **Dra. C. Sofía Bernal**, gracias por tanto. Como ya lo he dicho, eres la persona que más admiro dentro de la ciencia, y aun así te tomaste el tiempo para enseñarme desde cero todo lo que sabes, de forma paciente, activa y empática. Jamás dejaré de estar agradecido contigo por tanto conocimiento, amor, amistad y regaños brindados. Esta tesis es mitad tuya y mitad mía.

A mis compañeros **Rob y Marce**, por brindarme su amistad dentro del laboratorio, por todas las risas, llantos e historias compartidas, por levantarse temprano un sábado para

acompañarme al bioterio y quedarse conmigo hasta tarde, por cubrirme la espalda, por entenderme y apapacharme. Los quiero en mi vida siempre.

A mi gran amigo **Eddie**, gracias por mostrarme partes de mí que no conocía, por abrirme las puertas de tu casa, de tu corazón, por estar siempre en los momentos buenos y malos, por ser un ancla durante este posgrado. Es un honor compartir contigo.

A mi familia en Monterrey, mis amigos: **Víctor, Karlita, Catalina, Michelle, Marco (Sierra e Ibarra), Eliezer, Wendy, Roberto, Pakin, Citla**. Gracias por caminar conmigo, por tomarme de la mano y no soltarme, por siempre preocuparse por mí, por demostrarme su interés y amor, por estar en los momentos importantes, por sus palabras de afirmación y tiempo de calidad. Los voy a extrañar muchísimo, pero en mi corazón sé que nuestra amistad es para toda la vida.

A mi persona favorita en el mundo, **Cristina**, no me alcanzan las palabras para explicar cuán agradecido estoy contigo por todo. Creo que nuestra amistad es de esas que solo suceden una vez en la vida, y Cristi, estoy sumamente feliz y completo de que seas tú mi persona. Estoy orgulloso de ti, te admiro y te amo, y quiero que, independientemente de la distancia, la vida adulta y nuestro camino futuro, seamos Cristi y Armando en esta vida, en todas y en todos los universos.

A mis compañeras de vida **Renata, Anyb, Jessica y Camila**, gracias por tantos años de amistad y hermandad, por aplaudir mis logros y por no dejar que nuestra amistad se base en la distancia, por trascender fronteras y siempre apoyarme. Las amo.

**A mi tía Margarita**, porque cada vez que te veo se me llena el corazón de alegría, por tus consejos, por escucharme y aceptarme.

**Óscar y Sebas**, son mi motor de vida y mayor orgullo. Gracias por creer en mí. Ha sido un regalo crecer a su lado. Gracias por siempre presumir a su hermano mayor; eso me

da la fuerza necesaria para seguir adelante. Espero nunca decepcionarlos y que siempre puedan acudir a mí para cualquier cosa que necesiten. Los amo, son lo mejor que tengo.

Finalmente, el agradecimiento más importante es para mis padres. **Mamá y Papá**, sé que no fue fácil para ustedes dejar ir a su hijo de 18 años a estudiar lejos, a más de 1,500 km de distancia, pero miren: siete años después, su niño, su flaco, ya tiene una maestría en ciencias. Gracias por todos los sacrificios, por todas las veces que me quisieron de regreso con ustedes pero decidieron seguir creyendo en mí y apoyándome desde allá. Por comprarme vuelos de un día para otro porque tenía fiebre y estaba solo, por visitarme y entender mis tiempos. Gracias por todas las llamadas. Imagino que si fue difícil para mí, también lo fue para ustedes. Me perdí de sus cumpleaños, del Día de las Madres y del Padre, de un Año Nuevo y de muchas carnes asadas, y aun así decidieron apoyarme. Les estaré agradecido toda la vida, y ojalá les pueda retribuir al menos un 10% de todo lo que han hecho por mí. Los amo, los extraño, los admiro y estoy orgulloso de ser su hijo.

# ÍNDICE.

	Página
<i>Índice de figuras</i> .....	III
<i>Índice de tablas</i> .....	V
<i>Abreviaciones</i> .....	VI
<i>Resumen</i> .....	VIII
<i>Abstract</i> .....	IX
<b>1. Antecedentes</b> .....	<b>1</b>
1.1. Ansiedad.....	1
1.2. Ceramidas.....	6
1.3. Funciones de las ceramidas en el Sistema Nervioso.....	9
1.4. Ceramidas en los Trastornos de Ansiedad.....	14
1.5. Ceramidas y neuroinflamación.....	16
<b>2. Antecedentes directos</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Justificación</b> .....	<b>21</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
5.1. Objetivo General.....	24
5.2. Objetivos Específicos.....	24
<b>6. Estrategia experimental</b> .....	<b>25</b>
<b>7. Metodología</b> .....	<b>25</b>
7.1. Modelo animal.....	25
7.2. Definición de los grupos de estudio.....	25
7.2.1. Cálculo de la población por grupo de estudio.....	26
7.3. Administración estereotáxica de la mezcla de ceramidas.....	27
7.4. Pruebas conductuales.....	28
7.4.1. Laberinto Elevado.....	28

7.4.2. Campo Abierto.....	29
7.4.3. Caja Luz-Oscuridad .....	29
7.4.4. Suspensión de la cola.....	30
7.4.5. Cálculo de los niveles relacionados a la ansiedad (Z-score). .....	30
<b>7.5. Cuantificación relativa de la expresión de genes relacionados a la inflamación y la activación de la microglía.....</b>	<b>30</b>
7.5.1. Sacrificio de los animales.....	31
7.5.2. Extracción de ARN con Trizol. ....	31
7.5.3. Cuantificación de los genes blanco.....	32
<b>7.6. Tinciones histológicas e inmunohistoquímica para Iba1.....</b>	<b>34</b>
7.6.1. Perfusión de los animales. ....	34
7.6.2. Técnica histológica convencional. ....	34
7.6.3. Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE).....	35
7.6.4. Tinción especial de Nissl. ....	35
7.6.5. Inmunohistoquímica para Iba1.....	35
7.6.6. Toma de fotografías y análisis morfométricos.....	36
<b>7.7. Análisis estadístico.....</b>	<b>37</b>
<b>8. Resultados.....</b>	<b>38</b>
8.1. La administración localizada de una mezcla de ceramidas de cadena larga induce una conducta similar a la ansiedad en ratones. ....	38
8.2. Los ratones con un fenotipo ansioso muestran una conducta similar a la depresión en la prueba de la suspensión de la cola. ....	43
8.3. Los ratones del grupo CER muestran una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y señales de neuroinflamación. ....	44
8.4. La administración de la mezcla de ceramidas de cadena larga induce un aumento en el conteo de células gliales por campo sin pérdida neuronal.....	50
8.5. Las ceramidas de cadena larga son capaces de activar a la microglía en un fenotipo reactivo de morfología ameboides relacionado a la inflamación.....	52
8.6. La neuroinflamación reportada, el aumento de la activación de células de la glía y el menor conteo de ramificaciones microgliales se relacionan con conductas similares a la ansiedad. ...	55
<b>9. Discusión.....</b>	<b>59</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>11. Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
<b>12. Literatura citada.....</b>	<b>71</b>

## Índice de figuras

	Página
Figura 1. Mecanismos moleculares relacionados a la ansiedad.....	3
Figura 2. Estructura de las ceramidas.....	6
Figura 3. Funciones de las ceramidas en el cerebro. Reproducido de Valenzuela-Ahumada et al., 2025, con permiso del autor.....	10
Figura 4. Análisis lipodómico de las especies de ceramidas en ratones con conductas ansiosas.....	19
Figura 5. Los ratones con una administración periférica de una mezcla de ceramidas de cadena larga presentaron una conducta similar a la ansiedad, un aumento de células microgliales y la expresión de marcadores de inflamación.....	21
Figura 6. Número de transiciones y tiempo dispuesto en cada uno de los brazos del laberinto elevado.....	38
Figura 7. Distancia total recorrida, tiempo de inactividad y tiempo que disponen los ratones analizados en el centro y la periferia del campo abierto.....	39
Figura 8. Número de transiciones, tiempo de latencia y tiempos en la zona iluminada y oscura de la caja luz-oscuridad.....	41
Figura 9. Simulaciones de los recorridos realizados por los ratones del grupo CER en las pruebas conductuales relacionadas a un fenotipo ansioso.....	42
Figura 10. Intentos de escape y tiempo de escape de los murinos en la suspensión de la cola.....	43
Figura 11. Expresión de genes relacionados a la inflamación en la corteza prefrontal de los ratones.....	44
Figura 12. Microfotografías a 40X de la corteza prefrontal de los ratones con la tinción de Hematoxilina y Eosina.....	46
Figura 13. Microfotografías a 10X de la corteza prefrontal de los ratones con método de Nissl.....	47

<b>Figura 14. Microfotografías a 40X de la corteza prefrontal de los ratones con método de Nissl.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15. Expresión de genes relacionados a la inflamación en la corteza prefrontal de los ratones. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 16. Expresión de genes relacionados a la activación de la microglía en la corteza prefrontal de los ratones. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 17. Microfotografías a 40X de la corteza prefrontal de los ratones con una inmunohistoquímica para Iba1 y contratinción con Hematoxilina.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 18. Número de células microgliales, promedio de sus ramificaciones y promedio de sus uniones por campo. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 19. Gráficos de las regresiones simples realizadas para correlacionar los resultados obtenidos de conducta, inflamación y microglía. ....</b>	<b>57</b>

## Índice de tablas

	Página
<b>Tabla 1. Características y edad de incidencia de los TA más prevalentes.....</b>	<b>2</b>
<b>Tabla 2. Expresión de las isoformas de CerS en el organismo y el ácido graso preferente para cada caso.....</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 3. Concentración final de las ceramidas dispuestas en la mezcla de ceramidas de cadena larga administrada a los ratones del grupo CER. ....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 4. Volúmenes por reacción para la retrotranscripción. ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 5. Volúmenes por reacción para la PCR cuantitativa.....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 6. Secuencias de primers. ....</b>	<b>33</b>

## Abreviaciones

<b>CerS</b>	Ceramida sintasa
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>HPA</b>	Eje hipotálamo-pituitario-adrenal
<b>IL</b>	Interleucina (ej. IL-1 $\beta$ , IL-6)
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral (ej. TNF- $\alpha$ )
<b>iNOS</b>	Sintasa inducible de óxido nítrico
<b>TA</b>	Trastornos de ansiedad
<b>TAG</b>	Trastorno de ansiedad generalizada
<b>TAS</b>	Trastorno de ansiedad social
<b>TP</b>	Trastorno de pánico
<b>gpc</b>	Gramo de peso corporal
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>CON</b>	Control (grupo experimental)
<b>VEH</b>	Vehículo (grupo experimental)
<b>CER</b>	Ceramidas (grupo experimental)
<b>C1P</b>	Ceramida-1-fosfato
<b>S1P</b>	Esfingosina-1-fosfato
<b>SM</b>	Esfingomielina
<b>SMase</b>	Esfingomielinasa
<b>GCS</b>	Glucosilceramida sintasa
<b>SMS</b>	Esfingomielina sintasa
<b>ETC</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>NOX2</b>	NADPH oxidasa 2
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>TREM2</b>	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 2

<b>CD68</b>	Molécula de superficie asociada a microglía/macrófagos
<b>CD86</b>	Glicoproteína coestimuladora
<b>S1PR1/S1PR2</b>	Receptores de esfingosina-1-fosfato
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>CCL2</b>	Quimioquina ligando 2
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>TFEB</b>	Factor de transcripción EB
<b>AP, ML, DV</b>	Coordenadas estereotáxicas: anteroposterior, mediolateral, dorsoventral
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis autoinmune experimental
<b>ASM</b>	Esfingomielinasa ácida
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central

## Resumen.

Las ceramidas son una familia de lípidos bioactivos involucrados en la regulación de diversas vías de señalización la inflamación, la respuesta al estrés y la modulación del sistema inmune. Un desequilibrio en los niveles de ceramidas a nivel cerebral podría estar asociado con procesos inflamatorios y el desarrollo de ansiedad. En este estudio, se tuvo el objetivo de determinar el efecto de la administración de una mezcla de ceramidas (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1) en la corteza prefrontal (CPF) de ratones macho, en el desarrollo de conductas similares a la ansiedad, mediadas por neuroinflamación inducida por microglía reactiva. Para evaluar la conducta ansiosa, se emplearon las pruebas de laberinto en cruz elevado, campo abierto y caja luz-oscuridad. Adicionalmente, se aplicó la prueba de suspensión de la cola para detectar posibles conductas similares a la depresión. Se cuantificó la expresión relativa de genes proinflamatorios (IL6, IL1B y TNF $\alpha$ ) y de activación microglial (TREM2 y CD68). Mediante tinciones de H&E y Nissl, se examinó la morfología de la CPF y las poblaciones celulares de neuronas y glía; además, se utilizó inmunohistoquímica con Iba1 para trazar y analizar la morfología de la microglía. Los resultados conductuales mostraron que los ratones tratados con ceramidas pasaron más tiempo en los brazos cerrados del laberinto elevado, permanecieron preferentemente en la periferia del campo abierto y exhibieron mayor permanencia en la zona oscura de la caja luz-oscuridad, patrones consistentes con una conducta similar a la ansiedad. A nivel molecular, se observó la sobreexpresión significativa de TNF $\alpha$ , IL6, IL1B, TREM2 y CD68 en la CPF de los animales tratados. Las técnicas histológicas revelaron un aumento en la densidad de células gliales sin pérdida neuronal evidente, y la microglía mostró una morfología ameboide característica del fenotipo M1, asociada a un estado reactivo proinflamatorio. En conclusión, la administración de ceramidas de cadena larga en la corteza prefrontal de ratones indujo un fenotipo ansioso, probablemente mediado por un proceso de neuroinflamación asociado a la activación de la microglía reactiva.



---

Dr. C. Alberto Camacho Morales

Director de Tesis

## **Abstract.**

Ceramides are a family of bioactive lipids involved in the regulation of multiple signaling pathways, including inflammation, stress response, and immune system modulation. An imbalance in ceramide levels in the brain may be associated with inflammatory processes and the development of anxiety. In this study, we evaluated the effect of the local administration of a mixture of ceramides (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0, and C24:1) into the prefrontal cortex (PFC) of a murine model, with the aim of determining their potential role in the development of anxiety-like behaviors mediated by neuroinflammation driven by proinflammatory microglia. To assess anxiety-like behavior, we employed the elevated plus maze, open field, and light–dark box tests. In addition, the tail suspension test was used to evaluate potential depression-like behaviors. We quantified the relative expression of proinflammatory genes (IL6, IL1B, and TNF $\alpha$ ) and microglial activation markers (TREM2 and CD68). Using H&E and Nissl staining, we examined the morphology of the PFC and the neuronal and glial cell populations. Furthermore, Iba1 immunohistochemistry was performed to trace and analyze microglial morphology. Behavioral results showed that ceramide-treated mice spent more time in the closed arms of the elevated plus maze, remained predominantly in the periphery of the open field, and exhibited increased time spent in the dark compartment of the light-dark box, patterns consistent with anxiety-like behavior. At the molecular level, significant overexpression of TNF $\alpha$ , IL6, IL1B, TREM2, and CD68 was observed in the PFC of treated animals. Histological analyses revealed an increase in glial cell density without evident neuronal loss, and microglia exhibited an amoeboid morphology typical of the M1 phenotype, indicative of a reactive proinflammatory state. In conclusion, the administration of long-chain ceramides into the prefrontal cortex of mice induces an anxiety-like phenotype, likely mediated by neuroinflammation associated with reactive microglial activation.



---

Dr. C. Alberto Camacho Morales

Thesis Director



## **1. Antecedentes.**

### **1.1. Ansiedad.**

Los trastornos de ansiedad (TA) constituyen un grupo de afecciones de la salud mental caracterizadas por sentimientos de miedo, preocupación e inquietud persistentes, intensos e irracionales que superan el nivel real de amenaza. Estas alteraciones provocan reacciones emocionales y físicas como tensión muscular, fatiga, irritabilidad y dificultad para concentrarse. Entre los síntomas físicos más comunes se incluyen taquicardia, sudoración, mareos y problemas gastrointestinales (Park & Kim, 2020). Estas afecciones impactan significativamente la vida diaria, las relaciones personales, el desempeño laboral y las interacciones sociales, favoreciendo conductas de evitación e hipervigilancia (Vanderlind et al., 2021).

En el DSM-5, los TA incluyen el trastorno de ansiedad por separación, el mutismo selectivo, las fobias específicas, el trastorno de ansiedad social, el trastorno de pánico, la agorafobia y el trastorno de ansiedad generalizada (Kupfer, 2015). Los TA más comunes son, el trastorno de ansiedad generalizada (TAG), el trastorno de ansiedad social (TAS) y el trastorno de pánico (TP), con o sin agorafobia. El TAG tiene una prevalencia a lo largo de la vida del 6.2%, el TAS del 13% y el TP del 5.2% (Szuhany & Simon, 2022). El TAG se caracteriza por una preocupación excesiva e incontrolable sobre múltiples aspectos de la vida, generalmente acompañada de búsqueda constante de seguridad. El TAS implica un temor persistente o evitación de situaciones sociales en las que la persona podría ser evaluada por otros. El TP se manifiesta como ataques de pánico repentinos e intensos, acompañados de temor a nuevos episodios y cambios de comportamiento para prevenirlos. Estos ataques incluyen síntomas como disnea, dolor torácico, mareos y sensación de muerte inminente (Horenstein & Heimberg, 2020). A nivel mundial, el impacto de los TA ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Se estima que los casos recién diagnosticados pasaron de 31.13 millones en 1990 a 45.82 millones en 2019, con una tasa de incidencia estandarizada por edad de 5.8 por cada 1,000 habitantes.

Trastorno	Prevalencia (%)	Características clínicas	Edad de mayor incidencia
<b>TAG</b>	6.2	Preocupación constante, somatización	30-50 años
<b>TAS</b>	13.0	Miedo a juicio social, evitación	Adolescencia
<b>TP</b>	5.2	Crisis súbitas, síntomas físicos intensos	20-40 años

**Tabla 1. Características y edad de incidencia de los TA más prevalentes.**

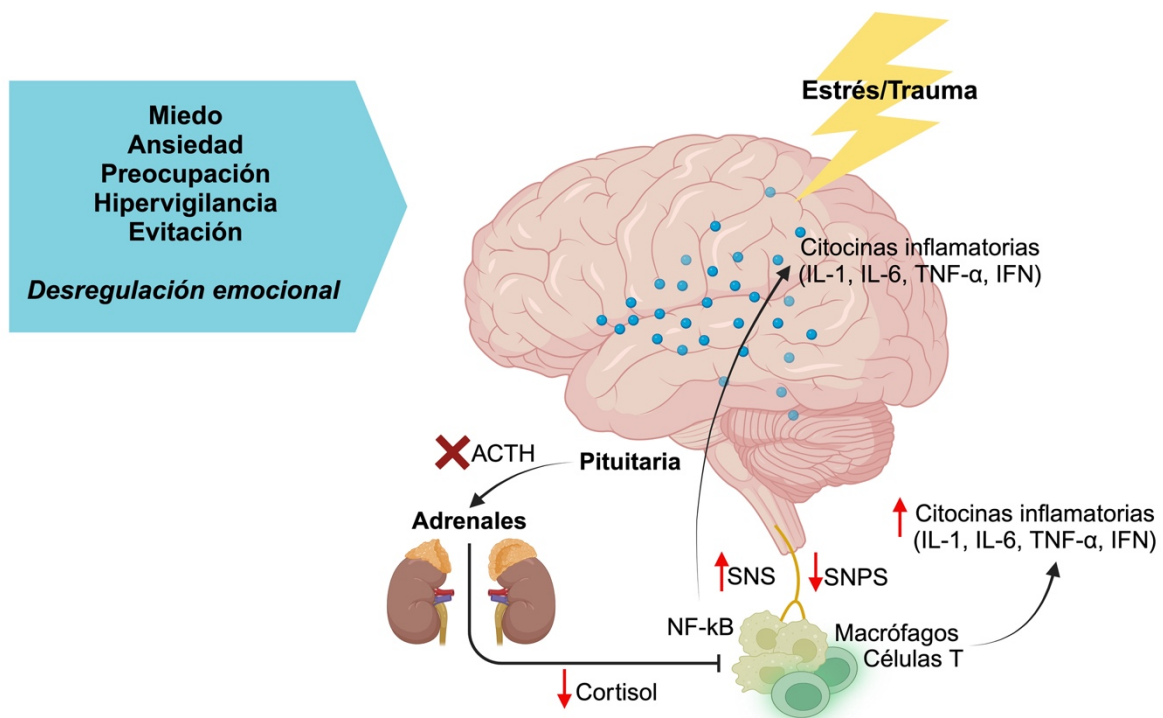
Asimismo, el número total de casos acumulados creció de 194.92 millones en 1990 a 301.39 millones en 2019, manteniéndose una prevalencia de aproximadamente 37.8 por cada 1,000 habitantes (Yang et al., 2021). La prevalencia alcanza su punto máximo en adolescentes de 10 a 14 años, se mantiene elevada hasta los 44 años y disminuye gradualmente después de los 60 años (Grenier et al., 2019).

Datos epidemiológicos documentan la existencia de diferencias de género en la prevalencia de los trastornos de ansiedad, por ejemplo, las mujeres son más propensas que los hombres a desarrollar estas afecciones, con una prevalencia dos a tres veces mayor en el TAG y el TP, así como tasas más altas de TAS. Las mujeres también presentan síntomas más severos y una mayor cantidad de miedos relacionados con la ansiedad social. Fluctuaciones hormonales, como las de progesterona y estrógeno, influyen notablemente en la evolución y severidad de estos trastornos (Bangasser & Cuarenta, 2021). Además, estudios neuroanatómicos indican diferencias estructurales en regiones como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala, que pueden estar asociadas con los síntomas de ansiedad, pues son algunas de las regiones relacionadas al miedo en el cerebro del humano. El estrés o trauma infantil, especialmente durante períodos sensibles del desarrollo, también aumenta el riesgo de padecer TAG y TAS, con mayor impacto en mujeres (Irle et al., 2010).

Los TA son heterogéneos y suelen coexistir con otros trastornos psiquiátricos, como los del estado de ánimo o el abuso de sustancias. No obstante, ya se han descrito

algunos mecanismos neurobiológicos y moleculares relacionados. Los TA pueden estar vinculados a las alteraciones en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), que regula la respuesta al estrés a través de la liberación de cortisol (Packard et al., 2016). Bajo condiciones de estrés crónico, este eje puede desensibilizarse, por el desequilibrio entre los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides, esto provoca una disminución en su capacidad de respuesta y resulta en niveles reducidos de cortisol a largo plazo. Estas alteraciones han sido observadas en personas con ansiedad crónica, quienes muestran niveles de cortisol más bajos que los individuos sin esta condición (Hek et al., 2013).

Las alteraciones en el eje HPA no solo afectan la regulación del cortisol, sino que también generan un estado de inflamación sistémica que incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Estas moléculas no solo mantienen los síntomas ansiosos, sino que también impactan negativamente la plasticidad neuronal, lo que puede exacerbar los déficits cognitivos y emocionales asociados a los TA (Figura 1) (Sha et al., 2023). Se destaca que las experiencias adversas durante la infancia juegan un papel crucial en la regulación del eje HPA y aumentan la vulnerabilidad en el desarrollo del TAG y TP, asociados con mayores tasas de recaída incluso después del tratamiento (Jurruena et al., 2020).



**Figura 1. Mecanismos moleculares relacionados con la ansiedad.** En la ansiedad patológica se reporta un ambiente de neuroinflamación dado por varios mecanismos asociados. Existe un incremento de la actividad de las células del Sistema Inmune, principalmente la microglía, en el Sistema Nervioso Central y Periférica. Simultáneamente hay una activación de NF- $\kappa$ B, ambos fenómenos promueven la liberación de citocinas proinflamatorias. Además, existe una capacidad reducida de los glucocorticoides y una pérdida de la sensibilidad al cortisol para modular la respuesta al estrés. Finalmente, se reporta una sobreactividad de Sistema Nervioso Simpático y un decremento en la actividad del Sistema Nervioso Parasimpático, manteniendo síntomas relacionados al miedo en los pacientes.

Otros mecanismos implicados involucran neurotransmisores y redes neuronales. Entre los principales se encuentran el GABA, la serotonina y la dopamina (Nuss, 2015). GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, disminuye la excitabilidad neuronal y ayuda a frenar respuestas excesivas al estrés. Disminuciones en su actividad se han asociado con mayor excitación neuronal y la aparición de trastornos de ansiedad, dado que el cerebro pierde la capacidad de mantener el equilibrio emocional adecuado (Ghasemi et al., 2022). La serotonina regula el ánimo, las emociones y las respuestas al miedo. Alteraciones en los sistemas de serotonina, particularmente en los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, se asocian con TA, ya que afectan la forma en que se procesa el miedo y la estabilidad emocional (Zangrossi & Graeff, 2014). Por último, la dopamina, asociada principalmente al sistema de recompensa y el placer, también juega un papel importante en la regulación emocional y las respuestas al estrés (Bromberg-Martin et al., 2010). En los TA, los desequilibrios dopaminérgicos, especialmente en su interacción con la amígdala, pueden alterar las respuestas emocionales y la reactividad ante situaciones percibidas como amenazantes. La amígdala depende de una modulación adecuada de la dopamina para regular las respuestas emocionales, y una disfunción en este sistema puede desencadenar una mayor sensibilidad y reactividad emocional (Zarrindast & Khakpai, 2015).

El circuito neuronal del miedo es una red compleja de estructuras cerebrales y vías neuronales que trabajan en conjunto para detectar, procesar y responder a estímulos percibidos como amenazantes. El circuito del miedo se compone por tres grandes

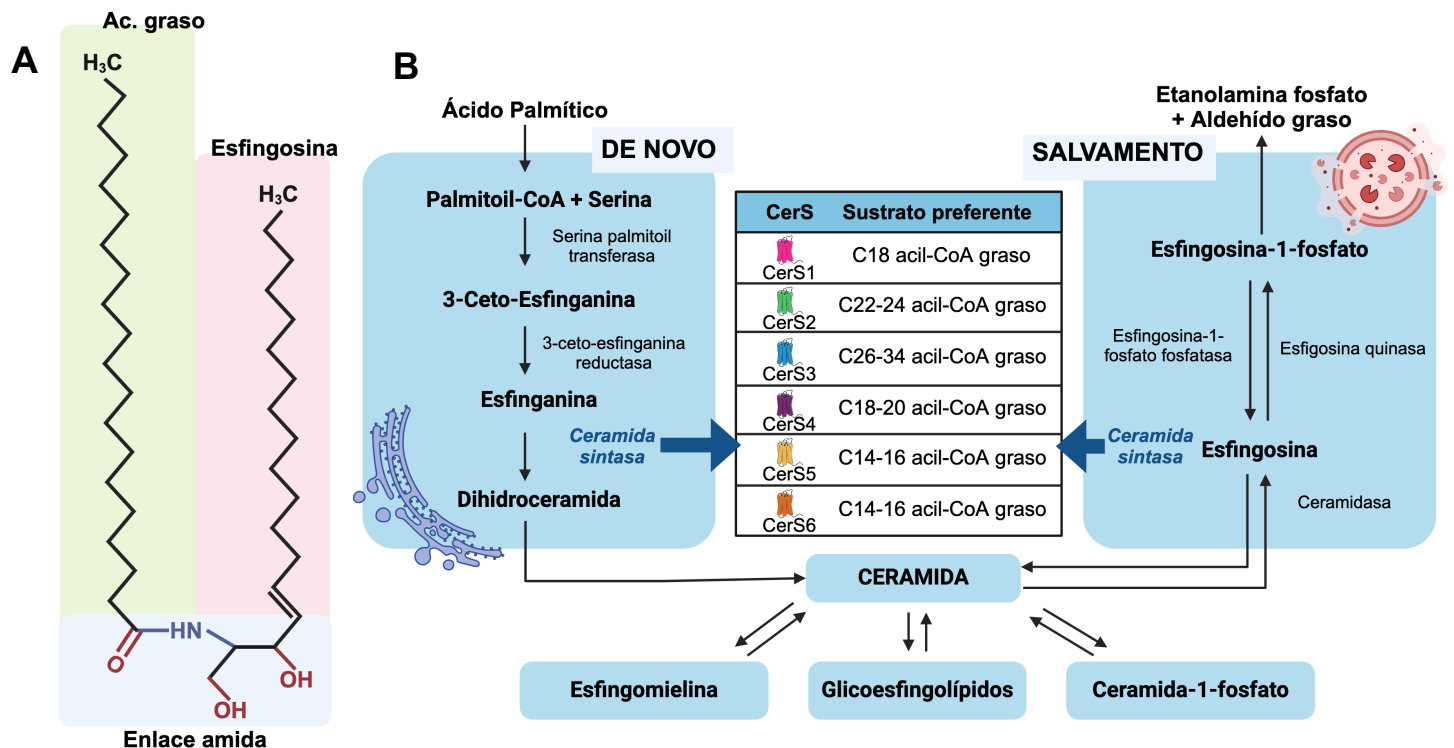
regiones, la amígdala, el tálamo, la corteza prefrontal (CPF) y el hipotálamo (Tovote et al., 2015). La amígdala es el núcleo central de este circuito, su función es detectar estímulos amenazantes y activar de manera inmediata respuestas fisiológicas y conductuales, como el aumento del ritmo cardíaco, la dilatación pupilar y la movilización de energía a través del eje HPA (Raio & Phelps, 2014). El tálamo actúa como un centro de retransmisión sensorial, enviando señales rápidas a la amígdala para generar respuestas inmediatas antes de que los estímulos sean procesados de manera consciente en la corteza (Kirouac, 2021). La CPF tiene un papel modulador crítico. En particular, la CPF ventromedial inhibe la actividad de la amígdala, ayudando a extinguir respuestas de miedo cuando los estímulos dejan de ser amenazantes. A su vez, la CPF dorsolateral participa en la evaluación cognitiva de las amenazas y en la planificación de respuestas adaptativas. En condiciones de ansiedad, se observa una hiperactividad de la amígdala y una disfunción en la CPF, lo que dificulta la regulación de las respuestas de miedo y perpetúa la ansiedad (Kenwood et al., 2022).

Finalmente, el circuito del hipotálamo regula las respuestas fisiológicas al activar el sistema nervioso autónomo y el eje HPA, lo que lleva a la liberación de cortisol (Herman et al., 2016). En los TA, las alteraciones en los circuitos se traducen en respuestas desproporcionadas al miedo y en una dificultad para extinguir recuerdos traumáticos o miedos aprendidos (Duval et al., 2015). Por ejemplo, la hiperactividad de la amígdala puede intensificar la percepción de amenazas, mientras que una función reducida del hipocampo afecta la capacidad de contextualizar los estímulos. La disfunción de la CPF contribuye a la incapacidad de regular estas respuestas, exacerbando la ansiedad.

Recientemente, se ha sugerido que lípidos bioactivos, como las ceramidas de cadena larga, podrían participar activamente en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo, incluida la ansiedad (Müller et al., 2015). En este contexto, alteraciones en la homeostasis lipídica cerebral serían capaces de modular funciones cognitivas, emocionales y conductuales.

## 1.2. Ceramidas.

Las ceramidas son una familia de lípidos bioactivos compuestas por una base de cadena larga esfingoide unida a una cadena de acilo mediante un enlace amida (Figura 2A). Se diferencian entre sí por la longitud, grado de hidroxilación y saturación tanto de la base esfingoide como de los residuos de ácidos grasos (Alonso & Goñi, 2018). Estas moléculas anfipáticas se encuentran principalmente en el hígado, tejido adiposo y tejido neural, donde regulan múltiples vías de señalización celular relacionadas con el crecimiento, el ciclo y la muerte celular, la senescencia, la inflamación, la modulación inmune, la adhesión celular, la migración, la autofagia y la respuesta al estrés (Olsen & Færgeman, 2017).



**Figura 2. Estructura y síntesis de las ceramidas.** (A) Estructura básica de una ceramida: esfingosina unida a un ácido graso por enlace amida. (B) Vías de biosíntesis: la vía **de novo** inicia con palmitoil-CoA y serina, generando dihidroceramidas que son procesadas por CerS específicas. La vía de **salvamento** recicla esfingolípidos complejos en esfingosina, que puede reingresar al ciclo para formar ceramidas. La vía de la **esfingomielina** las libera desde

membranas celulares. Distintas isoformas de CerS (CerS1 a CerS6) definen la longitud de la ceramida sintetizada.

Existen tres rutas metabólicas principales involucradas en la biosíntesis de ceramidas (Figura 2B):

- **Vía de novo:** localizada en el retículo endoplásmico, inicia con la condensación de L-serina y palmitoil-CoA (u otros acil-CoA) para formar 3-cetoesfinganina, que se reduce a dihidroesfinganina y es posteriormente acilada por CerS. La dihidroceramida resultante se convierte en ceramida por una desaturasa (Grösch et al., 2012; Quinville et al., 2021; Bernal-Vega et al., 2023).
- **Vía de salvamento:** los esfingolípidos complejos son degradados en el lisosoma, generando esfingosina, que puede fosforilarse (formando S1P) o reacilarse para regenerar ceramidas (Kihara, 2016; Bernal-Vega et al., 2023).
- **Vía de la esfingomielina:** implica la hidrólisis de esfingolípidos complejos de membranas celulares por esfingomielinasas (SMase), liberando ceramidas que pueden ser convertidas en glucosilceramidas por la glucosilceramida sintasa (GCS), incorporadas en esfingomielina por la esfingomielina sintasa (SMS) o fosforiladas para formar ceramida-1-fosfato (C1P). Además, las ceramidas pueden ser transportadas al complejo de Golgi para generar esfingolípidos complejos como cerebrósidos, gangliósidos, sulfátidos y globósidos (Bernal-Vega et al., 2023).

Se han identificado seis isoformas de ceramida sintasa (CerS), cada una con especificidad por diferentes longitudes de acil-CoA. CerS1 cataliza la unión de C18; CerS2 tiene afinidad por cadenas muy largas como C22–C24; CerS3 se encarga de acilos ultra-largos como C26; CerS4 especifica C18–C20; y CerS5 y CerS6 tienen especificidad por C14–C16 (Bernal-Vega et al., 2023). La expresión de estas isoformas varía por tejido: CerS1 predomina en cerebro, CerS2 en hígado y riñón, CerS3 en testículos y piel, CerS4 en piel, corazón, hígado y leucocitos, CerS5 en epitelio pulmonar

y cerebro, y CerS6 en intestino (Brachtendorf et al., 2019; Levy & Futerman, 2010). Notablemente, la expresión de ARNm de CerS no se correlaciona siempre con los niveles de ceramidas, lo que sugiere regulación postranscripcional (Canals et al., 2018).

<b>Isoforma CerS</b>	<b>Ácido graso preferente</b>	<b>Tejido principal de expresión</b>
<b>CerS1</b>	C18	Cerebro
<b>CerS2</b>	C22-C24	Hígado, riñón
<b>CerS3</b>	C26-C34	Testículos, piel
<b>CerS4</b>	C18-C20	Piel, corazón, hígado
<b>CerS5</b>	C14-C16	Pulmón, cerebro
<b>CerS6</b>	C14-C16	Intestino

**Tabla 2. Expresión de las isoformas de CerS en el organismo y el ácido graso preferente para cada caso.**

Las ceramidas también se sintetizan localmente en las mitocondrias. En modelos murinos, se han identificado CerS1, CerS2 y CerS6 en las mitocondrias del cerebro (Novgorodov et al., 2011; Ding et al., 2024). CerS2 colocaliza con TOM20 en la membrana mitocondrial externa, mientras que CerS6 se asocia con ANT en la membrana interna. Además, la mitocondria recluta enzimas relacionadas con el metabolismo de ceramidas, como la esfingomielinasa neutra y la ceramidasa neutra (Rajagopalan et al., 2015; Ding et al., 2024), lo que sugiere que este orgánulo integra una maquinaria enzimática autónoma para regular localmente las ceramidas y su actividad biológica.

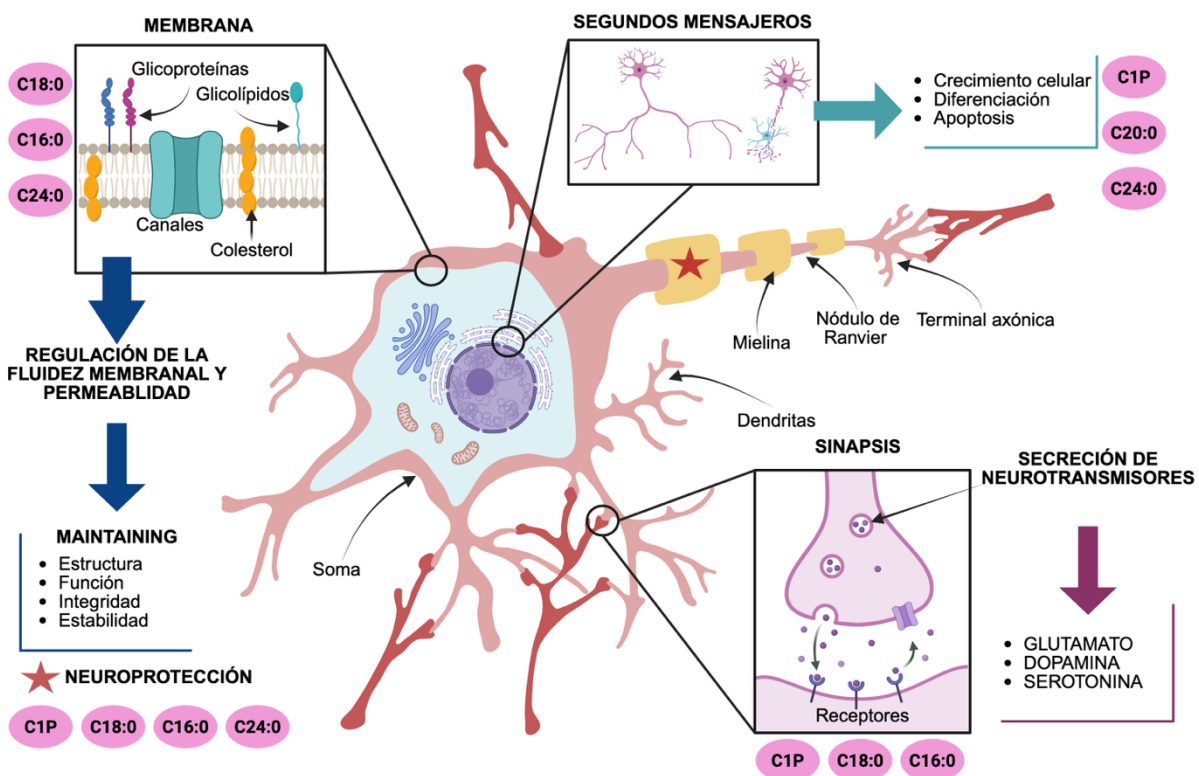
### **1.3. Funciones de las ceramidas en el Sistema Nervioso.**

En el sistema nervioso central, las ceramidas son moléculas esenciales para la estructura y función de las membranas celulares, asegurando su integridad y estabilidad (Figura 3). Regulan la fluidez y permeabilidad de las membranas. Por ejemplo, la ceramida C24:0 mejora el empaquetamiento lipídico y la rigidez de la membrana, mientras que la sustitución por ceramidas de cadena corta como C16:0 aumenta la permeabilidad, destacando el papel de las ceramidas de cadena muy larga en la función de barrera (DiPasquale et al., 2022; Ventura et al., 2020). También actúan como segundos mensajeros (Figura 3) en procesos de señalización intracelular como crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y respuesta al estrés, esenciales para la supervivencia neuronal y la función sináptica (Cruciani-Guglielmacci et al., 2017; Chaurasia et al., 2019; Mullen et al., 2012).

Durante el desarrollo neuronal, las ceramidas regulan el crecimiento de los neuritos, la guía axonal y la formación de sinapsis, además de mantener las redes neuronales durante el desarrollo cerebral. C16:0, producida por CerS6, facilita la liberación sináptica de glutamato al organizar balsas lipídicas que estabilizan la agregación de proteínas SNARE y promueven la exocitosis dependiente de calcio (Sapoń et al., 2023). La ceramida C18:0, enriquecida en neuronas del hipocampo y corteza, se ha relacionado con una eficiente liberación de dopamina y funciones relacionadas con la memoria y la plasticidad sináptica (Sonnino & Prinetti, 2016). C1P regula funciones celulares al activar vías como PI3K/Akt, ERK1/2 y NF- $\kappa$ B, promoviendo la supervivencia celular y la respuesta antiinflamatoria (Gangoiti et al., 2008). C1P y C2 también regulan la dinámica del citoesqueleto y la guía axonal mediante efectos sobre receptores acoplados a proteínas G y señalización de GTPasas Rho, además de modular la actividad de factores neurotróficos como BDNF (Dent & Gertler, 2003; Gómez-Muñoz, 2006).

Asimismo, las ceramidas modulan la liberación de neurotransmisores clave (Figura 3), incluyendo glutamato, dopamina y serotonina, fundamentales para la comunicación neuronal y la plasticidad sináptica (Farsi et al., 2023; Teleanu et al., 2022).

C1P puede regular la señalización asociada a receptores de serotonina y vías relacionadas con la producción de serotonina, posiblemente a través de la modulación de la actividad de la triptófano hidroxilasa (TPH) en respuesta a estrés celular (Ji et al., 2011; Sinenko et al., 2023). Una función clave de las ceramidas radica en su efecto neuroprotector (Figura 3). Estas protegen a las neuronas de múltiples formas de estrés, como el estrés oxidativo, la inflamación y la excitotoxicidad, en parte mediante el recubrimiento de las terminaciones neuronales y la preservación de las sinapsis (Buccoliero & Futerman, 2003; Mencarelli & Martinez-Martinez, 2013).



**Figura 3. Funciones de las ceramidas en el cerebro. Reproducido de Valenzuela-Ahumada et al., 2025, con permiso del autor.** Las ceramidas modulan el desarrollo, la función y la protección neuronal. Las especies C18:0, C16:0 y C24:0 mantienen la integridad y fluidez de la membrana plasmática. Las ceramidas C20:0, C24:0 y la ceramida-1-fosfato (C1P) también están involucradas en la regulación fina de procesos como el crecimiento celular, la diferenciación, la neuroplasticidad y la apoptosis. La ceramida C24:0 favorece la mielinización y la salud axonal, protegiendo indirectamente las terminaciones neuronales y facilitando la propagación del impulso

hacia las terminales sinápticas. Las ceramidas, en particular C16:0, C18:0 y C24:0, desempeñan roles importantes en la modulación de la liberación de neurotransmisores, coordinando la excitotoxicidad y asegurando una comunicación neuronal adecuada.

En las células gliales, que incluyen astrocitos, microglía y oligodendrocitos, las ceramidas desempeñan funciones críticas y, a menudo, específicas de cada tipo celular, influenciando tanto la homeostasis como la patología del sistema nervioso central (SNC) (McInnis et al., 2024). El estudio de McInnis y colaboradores (2024) reveló que las ceramidas C16 y C18 se encuentran en mayor concentración en el citoplasma de las neuronas motoras, mientras que los astrocitos presentaron los niveles más altos de ceramida C24 y las microglías de C24:1. Además, tanto astrocitos como microglía mostraron niveles significativamente más altos de ceramidas C22 y C24 en comparación con las neuronas motoras. Por otro lado, estudios in vivo han mostrado que la CerS1 se localiza predominantemente en neuronas y es responsable de la síntesis de ceramida C18 (Cai et al., 2016). La desregulación del metabolismo de ceramidas en las células gliales ha sido implicada en múltiples trastornos del SNC, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, condiciones desmielinizantes y estados neuroinflamatorios (Afridi et al., 2022).

Los astrocitos son actores clave en la respuesta neuroinflamatoria, y las ceramidas participan principalmente en procesos como la astrogliosis y la autofagia (Oksanen et al., 2019). Derivados de las ceramidas como la esfingosina-1-fosfato (S1P) pueden modular vías inflamatorias importantes, como la translocación del factor NF- $\kappa$ B al núcleo en astrocitos (Rajagopalan et al., 2015). Tras su activación, los astrocitos incrementan la expresión del receptor S1PR1, y la eliminación condicional de este receptor en astrocitos ha demostrado reducir la severidad de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), mejorando la supervivencia neuronal (Linnerbauer et al., 2020). Rothhammer y Quintana (2015) demostraron que la modulación de S1PR1 atenúa la astrogliosis al disminuir la producción de mediadores proinflamatorios como IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CCL2 y óxido nítrico (NO). Otro esfingolípido bioactivo derivado de ceramidas, la lactosilceramida (LacCer), ha surgido como un regulador crítico de las

respuestas astrocíticas durante la inflamación en el SNC (Yu et al., 2021). En astrocitos, la LacCer activa factores de transcripción como IRF-1 y NF- $\kappa$ B, promoviendo la expresión de genes proinflamatorios clave como Ccl2, Csf2 y Nos2 (Giovannoni & Quintana, 2020). Esta cascada molecular conduce a la producción de citocinas, activación microglial y reclutamiento de monocitos proinflamatorios, amplificando aún más la respuesta inflamatoria (Linnerbauer et al., 2020).

Además, se ha propuesto un modelo patológico en el que la resistencia a la insulina, la acumulación de ceramidas y el estrés del retículo endoplasmático (ER) forman un bucle de retroalimentación negativa que acelera la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) (de la Monte et al., 2012). El análisis de tejido cerebral humano post mortem en diferentes etapas de la EA revelaron que la resistencia a la insulina/IGF se correlaciona con la sobreexpresión de genes pro-ceramida, niveles elevados de ceramidas y un aumento de marcadores pro-apoptóticos relacionados con el estrés del ER.

En las células microgliales, las ceramidas están implicadas directamente en la regulación de la inflamación. Factores nutricionales como dietas altas en grasas pueden inducir un estado proinflamatorio caracterizado por la activación de NF- $\kappa$ B y una mayor producción de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Alexaki, 2021). Específicamente, la exposición al ácido palmítico (C16:0) incrementa la expresión de marcadores proinflamatorios en microglía, incluyendo IL-6, TNF- $\alpha$  y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Duffy et al., 2015).

Además, esfingolípidos esenciales para la estabilidad de la mielina como la galactosilceramida (GalCer), la sulfátido (ST) y la esfingomielina (SM) se sintetizan a partir de ceramidas de cadena muy larga (C22–C24) producidas por la CerS2 (Ho et al., 2022). La eliminación genética de CerS2 en ratones causa la pérdida de estas ceramidas en la mielina, lo que activa una población microglial especializada. Estas microglías muestran una elevada expresión de marcadores fagocíticos como CD64, CD11c, MHC clase II y CD68, lo que contribuye a atrofia progresiva de la mielina, disfunción motora y

presencia de “beading” axonal, un marcador temprano de degeneración axonal (Teo et al., 2023). También se ha observado que en microglía los niveles de ceramida C16:0 están inversamente correlacionados con los de C24:1, lo que indica una transición hacia un ambiente más proapoptótico (de Wit et al., 2019). Recientemente, se ha descrito que la regulación de ceramidas C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1 por mediadores neuroinflamatorios liberados por la microglía activa la enzima neuronal NOX2 (NADPH oxidasa 2), la cual provoca estrés oxidativo perjudicial (Arsenault et al., 2021). Así, esta vía mediada por esfingolípidos conecta directamente la inflamación neuroglial con el daño neurodegenerativo.

En los oligodendrocitos, las ceramidas cumplen funciones esenciales en la integridad de la mielina y en la regulación de la muerte celular. Las ceramidas precursoras de esfingolípidos complejos como la esfingomielina y la GalCer son principalmente de cadena muy larga, en especial C22:0, C24:0 y C24:1 (Hammerschmidt & Brüning, 2022). Un desequilibrio en estas ceramidas puede inducir estrés del ER, promover la apoptosis de oligodendrocitos y activar microglía, lo cual contribuye a procesos de desmielinización y neurodegeneración (García-González et al., 2018). Kim y colaboradores (2012) observaron una acumulación de ceramidas en astrocitos reactivos tanto en lesiones activas como en modelos animales de desmielinización, acompañada de un aumento de esfingosina y una disminución de esfingosina-1-fosfato. Finalmente, Qin et al., (2010) demostraron que los oligodendrocitos diferenciados poseen un metabolismo esfingolipídico activo, convirtiendo rápidamente ceramidas de cadena corta (C2, C6) en esfingosina y S1P, aunque con escasa conversión hacia ceramidas de cadena larga (C16–C24). La S1P exógena se metaboliza principalmente hacia esfingosina y ceramida C18. La desregulación de esta vía, como el exceso de C2-ceramida o S1P, provoca muerte celular por apoptosis, lo que evidencia el equilibrio delicado que rige la vía de reciclaje de esfingolípidos (Young et al., 2013).

La desregulación del metabolismo de ceramidas tiene implicaciones significativas para diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas. En la enfermedad de Alzheimer, se ha observado que niveles elevados de ceramidas están asociados con

disfunción sináptica y neuroinflamación, dos rasgos característicos de la enfermedad (Chowdhury et al., 2022). En el caso de la enfermedad de Parkinson, las ceramidas inducen respuestas inflamatorias que exacerban la degeneración neuronal y afectan negativamente la función motora (Vos et al., 2021). Además, cambios en el metabolismo de ceramidas se han documentado en trastornos psiquiátricos como la ansiedad, depresión y esquizofrenia que pueden alterar la comunicación entre células cerebrales y la actividad de neurotransmisores, contribuyendo al desarrollo de los síntomas psiquiátricos (Bernal-Vega et al., 2023). Cuando se altera el metabolismo de ceramidas, pueden verse afectados procesos como la sinapsis y la plasticidad neuronal, esenciales para el bienestar emocional y cognitivo.

Finalmente, en contextos de daño neurológico agudo, como accidentes cerebrovasculares o traumatismos craneoencefálicos, se ha observado una alteración en el metabolismo de ceramidas como parte de la respuesta celular al estrés. Este desequilibrio puede contribuir a la muerte celular y agravar el daño neuronal, dificultando la recuperación cerebral (Lei et al., 2025).

#### **1.4. Ceramidas en los Trastornos de Ansiedad.**

En los últimos años, se ha demostrado que el metabolismo sistémico impacta significativamente en la función cerebral. Diversos estudios han confirmado que señales periféricas, incluidos los mediadores lipídicos, pueden modular la actividad neuronal a través de la infiltración celular y los metabolitos circulantes (Custers et al., 2022).

En la amígdala, una región clave en el procesamiento emocional y del miedo, se han asociado niveles elevados de ceramidas de cadena larga y muy larga (como C18:0 y C20:0) con respuestas emocionales exacerbadas, características de los trastornos de ansiedad. Estas ceramidas activan vías de señalización que incrementan la excitabilidad neuronal, favoreciendo la hiperactividad de las neuronas amigdalinas y promoviendo la propagación de señales ansiógenas. Además, su participación en la modulación de la neuroinflamación, ha sido relacionada con disfunciones en áreas cerebrales críticas para

la regulación emocional, como la corteza prefrontal y la corteza orbitofrontal (Jana et al., 2009).

Un estudio lipidómico reveló una correlación inversa entre los síntomas de ansiedad y la proporción de esfingomielina C23:1 a esfingomielina C16:0, así como entre la fosfatidilcolina O-36:4 y la ceramida C20:0 en plasma. Además, se observó que los bajos niveles de N-(hexadecanoyl)-deoxysfingosina-1-sulfonato en plasma se correlacionaron negativamente con los puntajes en la Escala de Calificación de Ansiedad de Hamilton. Los análisis de plasma de pacientes con síntomas depresivos/ansiosos indican niveles elevados de ceramidas C20:0 y C22:0, junto con una mayor actividad de esfingomielinasa en comparación con los controles sanos, independientemente del uso de medicamentos antidepresivos o ansiolíticos (S. Wang et al., 2025).

En modelos preclínicos que exhiben conductas similares a la ansiedad, también se han observado alteraciones significativas en el perfil de ceramidas plasmáticas y cerebrales. En particular, se han reportado aumentos en las ceramidas C16:0, C16:1, C18:1, C22:1 y C26:1, junto con niveles elevados de lactosilceramida C18:0, C24:0 y C26:1 en la corteza prefrontal y el hipocampo (Sambolín-Escobales et al., 2022). Cabe destacar que la infusión de ceramida C16:0 en la amígdala basolateral puede inducir un fenotipo ansiógeno en ratones (Zoicas et al., 2020).

El estrés también regula la expresión de receptores de esfingolípidos en el sistema nervioso central. Por ejemplo, en el hipocampo de ratas ansiosas se ha observado una reducción en los niveles del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 2 (S1PR2), el cual desempeña un papel crucial en varios procesos biológicos, como la proliferación celular, la angiogénesis, la migración celular, la organización del citoesqueleto, el tráfico de células inmunitarias y la mitogénesis (van Echten-Deckert, 2023).

La evidencia sugiere que las ceramidas pueden modular la susceptibilidad al desarrollo de trastornos de ansiedad. Los hallazgos más consistentes indican que los altos niveles de ceramidas de cadena larga y muy larga en regiones como la amígdala y

la corteza prefrontal son significativos. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales las ceramidas se relacionan con los trastornos del estado de ánimo siguen siendo inciertos. Un modelo propuesto sugiere que la neuroinflamación mediada por lípidos podría jugar un papel importante en esta relación (Bernal-Vega et al., 2023).

### **1.5. Ceramidas y neuroinflamación.**

Como se ha mencionado, alteraciones en el metabolismo de ceramidas se asocian al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (EA) y el Parkinson (EP). En este contexto, la inflamación crónica y la disfunción mitocondrial desempeñan mecanismos patogénicos clave. Específicamente, la acumulación de ceramidas en las mitocondrias ha demostrado afectar directamente la integridad y funcionalidad de las membranas, contribuyendo a la disfunción mitocondrial y a procesos inflamatorios cerebrales. Además, especies específicas como la C16:0 y la C2:0 pueden aumentar la permeabilidad mitocondrial y favorecer la liberación de citocromo c, un evento proapoptótico que activa la cascada de caspasas y amplifica la neuroinflamación (García-Ruiz et al., 1997; Siskind & Colombini, 2000). En modelos animales y en cerebros de pacientes con EA, se ha observado un contenido elevado de ceramidas mitocondriales asociado con alteraciones estructurales en las mitocondrias y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales inducen daño neuronal e inflamación (Crivelli et al., 2024).

Estudios recientes han revelado que especies de ceramidas de cadena larga como C18:0, C22:0 y C24:1 reducen la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (ETC) e incrementan la producción de ROS, tanto en mitocondrias sinápticas como no sinápticas (Carr et al., 2023; Kennedy et al., 2016). Estas ROS pueden desencadenar respuestas inflamatorias a través de la liberación de señales de daño intracelular (DAMPs), que promueven el reclutamiento de microglía y la secreción de citocinas proinflamatorias. Además, las ceramidas regulan procesos mitocondriales críticos como la mitofagia, esencial para la eliminación de mitocondrias disfuncionales. Se ha reportado que la ceramida C18:0, sintetizada por la CerS1, regula la mitofagia mediante su interacción con el transportador p17/PERMIT, contribuyendo al

mantenimiento del control de calidad mitocondrial en el cerebro (Oleinik et al., 2023). Por su parte, la enzima esfingomielinasa ácida (ASM), encargada del catabolismo de esfingomielina a ceramidas, modula rutas celulares como el complejo LYNUS y la vía mTOR-TFEB, que integran señales de estrés con respuestas autofágicas e inflamatorias (Justice et al., 2018; J. K. Lee et al., 2014).

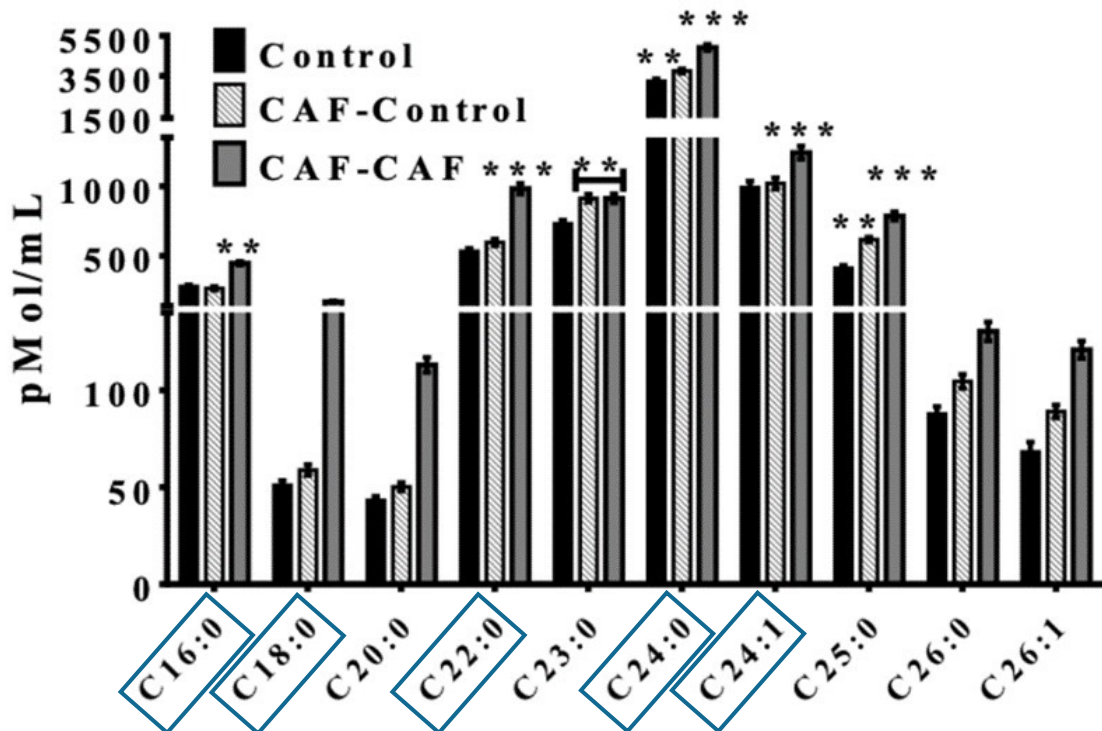
En enfermedades neurodegenerativas como la EP, la disfunción del sistema PINK1/Parkin, encargado de la degradación mitocondrial, se ha vinculado con la acumulación de ceramidas y la activación de procesos apoptóticos e inflamatorios en neuronas dopaminérgicas (Vos et al., 2021; Vos & Klein, 2022). La ceramida C16:0, sintetizada por la CerS6, también ha sido implicada en la amplificación de la apoptosis y el deterioro de la dinámica mitocondrial tras eventos como la hemorragia intracerebral. Esta disrupción afecta negativamente la mitofagia y exacerba la neuroinflamación (Xu et al., 2024). Asimismo, estímulos metabólicos como la insulina pueden inducir la síntesis de ceramidas proinflamatorias en el cerebro, particularmente en modelos con predisposición genética, como aquellos portadores del alelo ApoE4, exacerbando el estrés mitocondrial y la inflamación (Carr et al., 2023).

Más allá de sus efectos sobre las mitocondrias, las ceramidas juegan un papel activo en la regulación de la neuroinflamación. En el cerebro, modulan eventos intracelulares asociados a la señalización de citoquinas, producción de eicosanoides, activación de la apoptosis, astrogliosis y migración de células T (Yin et al., 2013). Estas funciones son fundamentales para la respuesta inmunitaria cerebral, y su disrupción ha sido relacionada con patologías neuroinflamatorias como EA y EP. Específicamente, las ceramidas pueden activar moléculas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 e IL-6, probablemente a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (de Wit et al., 2019). La activación de este factor también puede ser inducida por ceramidas de cadena larga (C16–C24), generadas por la esfingomielinasa microglial (J. Y. Lee et al., 2020). Por el contrario, ciertas ceramidas de cadena corta han demostrado efectos antiinflamatorios, particularmente en la modulación de la microglía, lo que sugiere que su actividad puede ser dependiente de la longitud de la cadena.

Se conocen diversos mecanismos moleculares que vinculan a las ceramidas con la generación de un perfil proinflamatorio. Por ejemplo, se ha documentado que las ceramidas facilitan la ensamblaje del inflamasoma NLRP3, promoviendo la secreción de IL-1 $\beta$ , una citoquina activada por caspasa-1 que amplifica la inflamación cerebral (Scheiblich et al., 2017, 2021). Asimismo, se ha sugerido que las ceramidas favorecen la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B tras su fosforilación, desencadenando la expresión génica proinflamatoria (Zheng et al., 2021).

## 2. Antecedentes directos.

En el grupo de trabajo, al utilizar ratones C57BL/6 alimentados con una dieta rica en grasas y ultraprocesados, se observó la manifestación de un fenotipo conductual relacionado con la ansiedad. Este fenotipo se evaluó mediante pruebas estándar, como el laberinto elevado y el campo abierto, que son modelos comunes para medir el comportamiento ansioso en roedores. Los resultados indicaron que los ratones con dieta alta en grasas mostraron un comportamiento característico de ansiedad, con un aumento en el tiempo de permanencia en las áreas cerradas del laberinto y una menor exploración del centro en el campo abierto. En paralelo a estas observaciones conductuales, se llevó a cabo un análisis lipidómico del plasma de los ratones, el cual reveló un aumento significativo en las concentraciones de ceramidas de cadena larga, específicamente C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 y C25:0 (Figura 4). Estos resultados sugieren que las ceramidas de cadena larga podrían estar involucradas en la modulación de respuestas ansiosas, posiblemente mediadas por alteraciones en la estructura y función de las membranas celulares, especialmente en áreas cerebrales críticas para la regulación emocional.



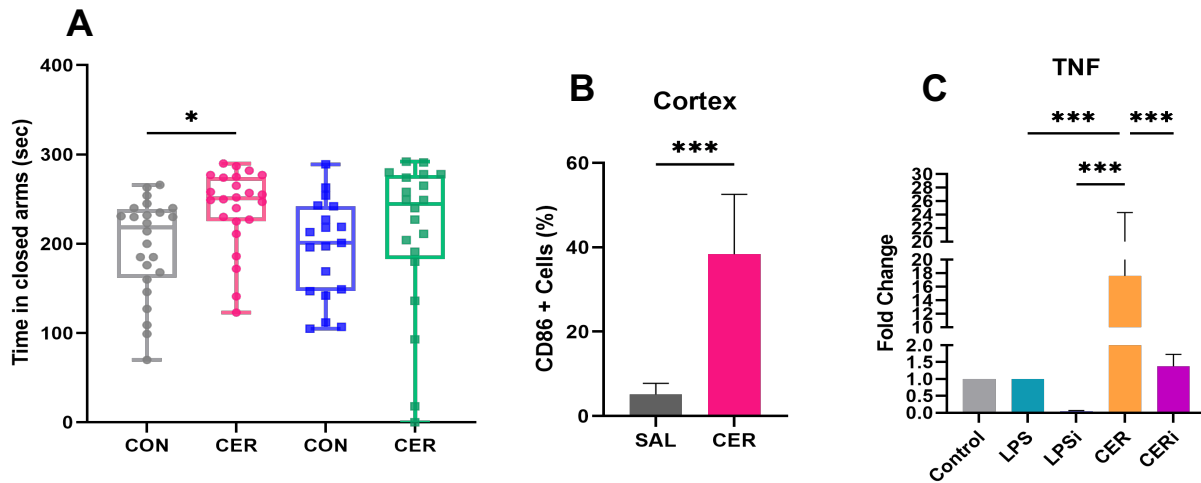
**Figura 4. Análisis lipodómico de las especies de ceramidas en ratones con conductas ansiosas.** Se reportó un aumento significativo de las ceramidas C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 y C25:0 en los ratones que tuvieron una dieta de cafetería (CAF) y que además provinieron de madres CAF. El aumento significativo de las ceramidas se correlacionó con conductas similares a la ansiedad en comparación a los controles.

Finalmente, una de las preguntas que permanece sin respuesta, es el demostrar si el incremento de ceramidas en sangre induce disfunción cerebral y el desarrollo de ansiedad. Con esta información, se administró una mezcla de ceramidas por vía intravenosa, ajustando las concentraciones de acuerdo con los datos obtenidos en el perfil lipodómico. Como resultado, se observó que la administración de intravenosa de ceramidas indujo un fenotipo ansioso en las hembras, pero no en machos (Figura 5A). Este hallazgo refuerza la hipótesis de que las ceramidas de cadena larga podrían desempeñar un papel clave en la modulación de la ansiedad, posiblemente mediando una disfunción en las vías de señalización cerebral relacionadas con el estrés y las emociones.

Adicionalmente, se identificó incremento en la población de células microgliales en el cerebro de los ratones tratados con ceramidas, destacando la corteza prefrontal, lo anterior con el marcador de superficie CD86+ (Figura 2B), CD86 es una glicoproteína de membrana que se expresa principalmente en células inmunes como macrófagos, células dendríticas y microglía. Su función principal es proporcionar una señal coestimuladora necesaria para la activación de linfocitos T al unirse a CD28 o CTLA-4 en células T (Zhang et al., 2023). La microglía son células del sistema inmunológico del cerebro que desempeñan un papel fundamental en la respuesta a la inflamación y en la homeostasis neuronal. Este aumento en la activación de la microglís sugiere que las ceramidas pueden estar involucradas en procesos de neuroinflamación, lo que podría contribuir al desarrollo y mantenimiento del fenotipo ansioso observado en los animales tratados.

Finalmente, se evaluaron perfiles transcriptómicos en un cultivo de células cerebrales. Se cuantificaron genes inflamatorios como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , los cuales son esenciales en la respuesta inmunitaria del SNC. Los resultados revelaron una mayor

expresión de marcadores inflamatorios en comparación a los controles, lo que respalda la hipótesis de que una las ceramidas puede inducir alteraciones en el metabolismo de lípidos y promover la activación neuroinmune. TNF tuvo mayor expresión en el grupo CER aún cuando se dió el estímulo con LPS (Figura 5C).



**Figura 5. Los ratones con una administración periférica de una mezcla de ceramidas de cadena larga presentaron una conducta similar a la ansiedad, un aumento de células microgliales y la expresión de marcadores de inflamación.** (A) Los ratones hembra administrados periféricamente con una mezcla de ceramidas de cadena larga tuvieron un incremento significativo en los brazos cerrados del laberinto elevado, característico de una conducta ansiosa, reportándose una tendencia similar en machos. (B) Los ratones administrados con la mezcla de ceramidas presentaron mayor población CD86+, lo que se traduce en una mayor activación de la microglía en la corteza de los animales. (C) El marcador de inflamación TNF tuvo una mayor expresión cuando las células cerebrales se pusieron en contacto con la mezcla de ceramidas en comparación a cuando se les dio el estímulo con LPS.

En su conjunto, los resultados proponen que la administración estereotáxica en la corteza prefrontal de la mezcla de ceramidas de cadena larga en ratones C57BL/6. A los ratones se les realizaron pruebas conductuales en búsqueda de una conducta similar a la ansiedad, cuantificación de genes relacionados a inflamación y activación de la microglía y tinciones histológicas en conjunto con un marcaje para Iba1 con el fin de analizar signos de inflamación y activación de la microglía.

### **3. Justificación.**

**Los trastornos de ansiedad (TA)** son los desórdenes psiquiátricos más prevalentes a nivel mundial, afectando significativamente la calidad de vida de quienes los padecen. Investigaciones recientes han identificado niveles elevados de ceramidas de cadena larga en el suero de individuos con TA en comparación con controles sanos. Sin embargo, el mecanismo por el cual las ceramidas contribuyen al desarrollo de la ansiedad y la neuroinflamación aún no está completamente dilucidado.

Por esta razón, el presente estudio se enfoca en evaluar el impacto de la administración local de una mezcla de ceramidas de cadena larga en la modulación de la neuroinflamación y su relación con conductas ansiosas en un modelo murino. Los hallazgos de esta investigación podrían respaldar el papel de las ceramidas de cadena larga como biomarcadores de neuroinflamación en pacientes con TA.

#### **4. Hipótesis.**

La administración de una mezcla de ceramidas de cadena larga (**C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1**) en la corteza prefrontal de ratones induce una conducta similar a la ansiedad mediante la expresión de genes proinflamatorios y la activación de la microglía.

## **5. Objetivos.**

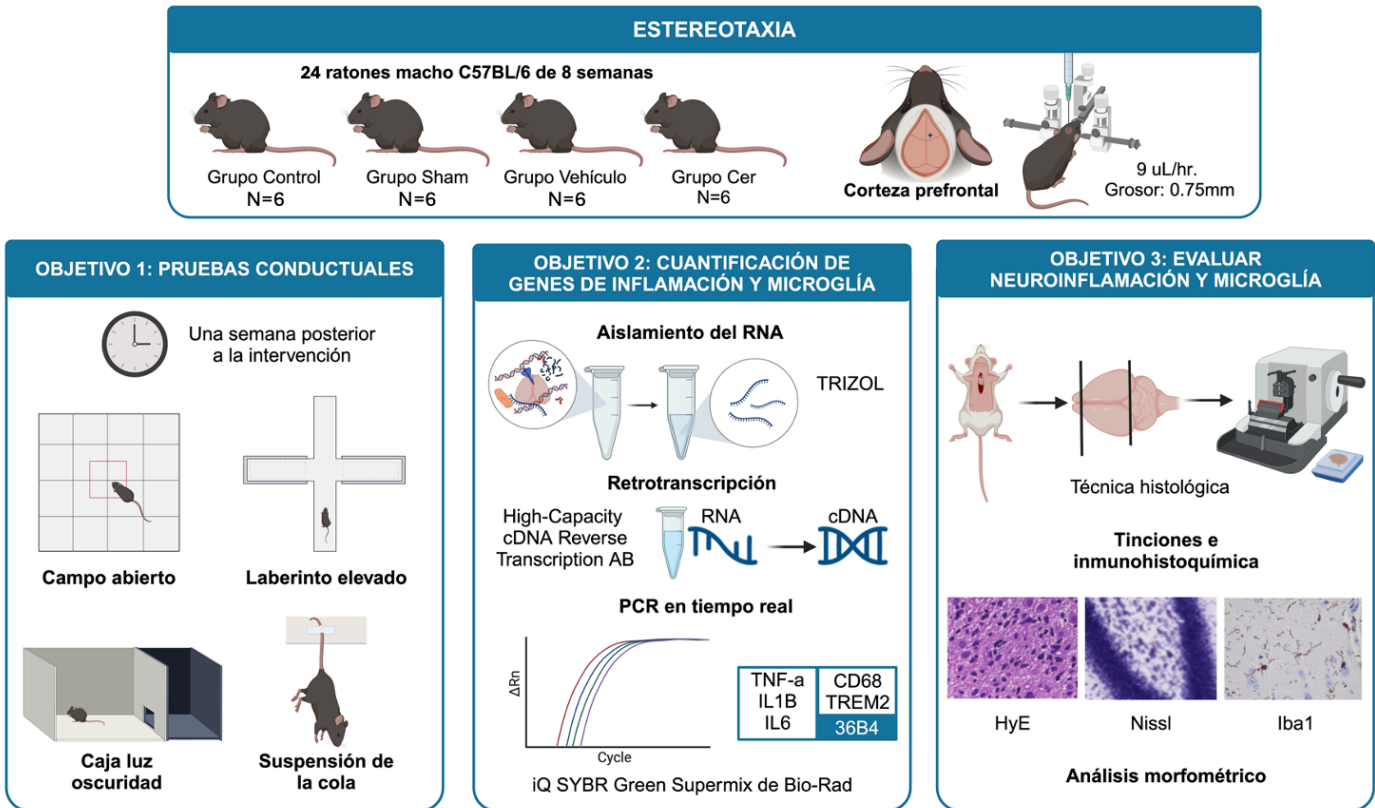
### **5.1. Objetivo General:**

Evaluar el papel de la administración de ceramidas de cadena larga/muy larga (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1) en la corteza prefrontal de un modelo murino en el desarrollo de una conducta similar a la ansiedad mediante neuroinflamación inducida por microglia proinflamatoria.

### **5.2. Objetivos Específicos:**

1. Analizar la conducta similar a la ansiedad en ratones administrados con una mezcla de ceramidas de cadena larga en la corteza prefrontal.
2. Cuantificar la expresión relativa de genes relacionados con la inflamación y la activación microglial en ratones administrados con una mezcla de ceramidas de cadena larga en la corteza prefrontal.
3. Evaluar los cambios morfológicos y la activación de la microglía en la corteza prefrontal de ratones localmente administrados con una mezcla de ceramidas de cadena larga, mediante análisis histológico.

## 6. Estrategia experimental.



## 7. Metodología.

**7.1. Modelo animal.** Todos los experimentos se realizaron empleando ratones macho de la cepa C57BL/6J de 8-10 semanas de edad, con un peso de 20-25 g. Los ratones fueron alojados por pares en jaulas de plexiglás, mantenidas a 23 °C en una habitación con temperatura controlada con un ciclo luz / oscuridad de 12 horas. El agua y comida (Labdiet 5000) se dispusieron ad libitum en la jaula.

**7.2. Definición de los grupos de estudio.** Se trabajó con cuatro grupos de estudio para validar que la conducta similar a la ansiedad es inducida por la administración de ceramidas de cadena larga respecto al vehículo.

- Grupo CON: Ratones que no tuvieron ninguna intervención quirúrgica.

- Grupo SHAM: Ratones que se trataron únicamente con la punción con la aguja durante el tiempo correspondiente a la cirugía (el tejido fue hidratado constantemente con solución fisiológica).
- Grupo VEH: Ratones administrados con la 5µL de una solución de cloruro de sodio al 0.9% con 1% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (Equitech-Bio, BAH66).
- Grupo CER: Ratones administrados con 5µL de la solución de ceramidas de cadena larga que contiene a C:16, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1 (Avanti Polar Lipids Inc) en las concentraciones dispuestas en la tabla 1. Las ceramidas fueron diluidas en una solución de cloruro de sodio al 0.9% con 1% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (Equitech-Bio, BAH66).

Nomenclatura	Longitud (Carbonos)	Concentración final
d18:1/16:0	16	0.47 nM
d18:1/18:0	18	0.60 nM
d18:1/22:0	22	0.50 nM
d18:1/24:0	24	3.5 nM
d18:1/24:1	24	0.9 nM

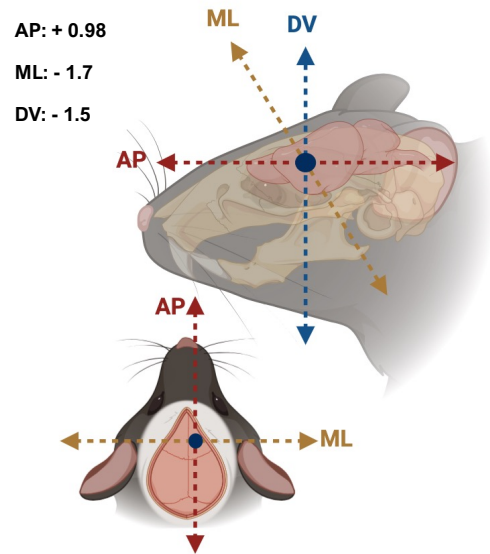
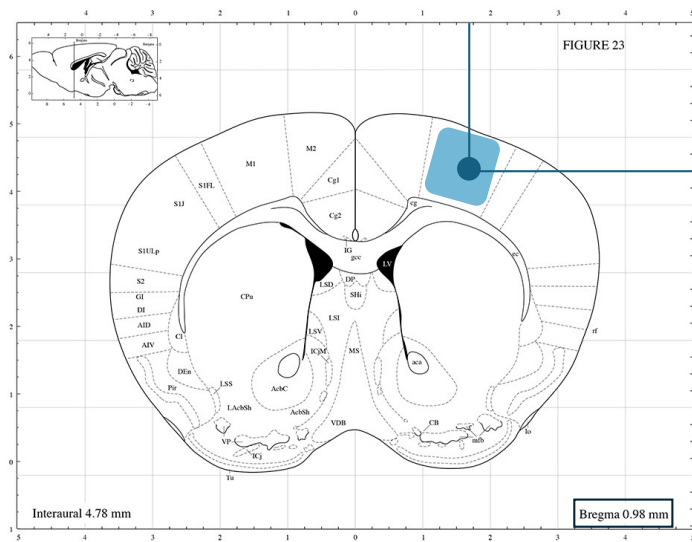
**Tabla 3. Concentración final de las ceramidas dispuestas en la mezcla de ceramidas de cadena larga administrada a los ratones del grupo CER.** Las ceramidas dispuestas en la mezcla tienen un esqueleto de esfingosina (d18:1) y 16-24 carbonos de longitud de su ácido graso. Las concentraciones utilizadas son en base a las obtenidas en el plasma de ratones con una conducta similar a la ansiedad (Figura 4).

**7.2.1. Cálculo de la población por grupo de estudio.** Para el cálculo de la  $N$  de los individuos por grupo se utilizó la siguiente fórmula:  $X = N / ((A/100) \times (B/100))$ , donde,  $N$  (6) es el número final de animales necesarios para el tratamiento.  $A$  es la resta del 100% de los roedores y el porcentaje que no genera una conducta similar a la ansiedad con la administración de ceramidas, según Zoicas y colaboradores (2020) es de aproximadamente del 15%.  $B$  es la resta del 100% de los roedores y el porcentaje que

muere posterior a la intervención estereotáxica realiza correctamente, según Fornari y colaboradores (2012) es el 5%. Entonces:  $X = 6 / [(100-15)/100] \times [(100-5)/100]$ .  $X = 7.43$  (7 ratones).

**7.3. Administración estereotáxica de la mezcla de ceramidas.** Para la administración del complejo de ceramidas de cadena larga en la corteza prefrontal de los ratones, se realizó la anestesia con Zoletil 100/Xilacina (Virbac) vía intraperitoneal. Los ratones se colocaron en el equipo estereotáxico con la barra de incisivos a 10 mm por debajo de la línea interaural (Doccol corporation). Posteriormente se despejó el área de cirugía, para ello, se rasuró la cabeza con una rasuradora eléctrica. Después, con ayuda de un bisturí se expuso el cráneo de los animales para identificar el bregma (intersección de las comisuras del cerebro). Partiendo del bregma, con las coordenadas AP +0.98 mm desde la línea interaural, ML -1.7 mm desde la línea media se ubicó al núcleo M1 de la corteza prefrontal, siendo el más extenso de dicha región cerebral. Con ayuda de un taladro dental se perforó el cráneo (fresa dental D3.35) en el sitio de la intervención. Y se procedió con la última coordenada DV: -1.5 mm desde la línea vertical. Se microinyectarán 5  $\mu$ L del complejo lipídico a una velocidad de 9  $\mu$ L / hora con ayuda de una bomba de flujo conectada (Fermelo biotec; NE-1002X) a una jeringa de 0.675mm de grosor (Hamilton Company; 0.775mm). Posterior a la administración se moldeó nuevamente el cráneo con cera de hueso (Stock Salud; UNIWAX) y se unió el tejido con ayuda de pegamento de contacto (Industrias KolaLoka). Posterior a una semana de la administración se procedió con las pruebas conductuales tomando en cuenta el tiempo necesario para la recuperación de los animales después de la intervención quirúrgica.

La selección del punto de administración se basó en el centro del núcleo más extenso de la corteza prefrontal, es decir el M1. Para el AP, se seleccionó +0.98 en función a la densidad presentada de la corteza prefrontal en relación al cuerpo estriado. Para las coordenadas ML y DV, -1.7 y -1.5, respectivamente, se utilizó el criterio de administrar en el centro del núcleo. Lo anterior se describe con la siguiente figura:



**7.4. Pruebas conductuales.** Para confirmar una conducta similar a la ansiedad en los CER, los ratones se sometieron a cuatro pruebas conductuales. Las pruebas tuvieron lugar una semana posterior a la cirugía, teniendo un espacio de 24 horas entre cada prueba. Se realizaron en el siguiente orden: Laberinto Elevado, Campo Abierto, Caja Luz-Oscuridad y Suspensión de la Cola. La primera fase de cada una de las pruebas es el periodo de aclimatación, en el cuál, los ratones pasarón una hora en el cuarto dispuesto para las grabaciones antes de iniciar el tiempo de prueba.

**7.4.1. Laberinto Elevado.** La prueba del laberinto elevado es el estándar de oro para evaluar la conducta similar a la ansiedad en ratones. Se basa en los estímulos naturales, miedo a los espacios abiertos y el miedo a caminar sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha. Para ello, se tuvo una plataforma de plexiglás elevada del suelo (38.5 cm) en forma de cruz con dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (15 cm de cada extremo). Los ratones comenzaron la prueba en el centro de la prataforma con dirección hacia uno de los brazos cerrados, de forma aleatoria, para evitar el sesgo. Se grabó su recorrido durante 5 minutos. Los datos fueron analizados con el Software AnyMaze del cuál se extrajeron el número de transiciones (desde un brazo abierto a uno cerrado y viceversa) y el tiempo que pasan en cada uno de los brazos (Kraeuter et al.,

2019a). Los ratones con un fenotipo ansioso disponen mayores tiempos en los brazos cerrados de la prueba en comparación a los controles.

**7.4.2. Campo Abierto.** La prueba de campo abierto consiste en una zona amplia abierta limitada por paredes. Esta prueba evalúa la respuesta innata del roedor a los espacios abiertos y su impulso exploratorio, basada en la tendencia de los roedores con una conducta similar a ansiedad a evitar áreas expuestas. Para ello, se dispuso de una caja de plexiglás transparente (50 x 50 x 50 cm) con cuadrantes de 12 x 12 cm delimitados por el software ToxTrac V.1.0. Se colocó a los animales en una esquina al azar de la arena en dirección a la pared y se les permitió explorar la arena durante 10 minutos. Su recorrido fue grabado durante 10 minutos complementaron los datos utilizando un sistema automático de detección de movimiento (ToxTrac V.1.0.). Los datos recopilados fueron la velocidad promedio, la distancia total recorrida, el porcentaje de inactividad, y el tiempo que pasaron en la periferia y el centro de la arena . Los ratones con un fenotipo ansioso pasan más tiempo en la periferia del campo en comparación a los controles. Además, los datos de velocidad promedio e inactividades se relacionan con la actividad locomotora de los animales (Kraeuter et al., 2019b).

**7.4.3. Caja Luz-Oscuridad.** El principal factor ansiogénico se fundamenta en el conflicto entre el comportamiento exploratorio del ratón y la aversión natural hacia el área abierta e iluminada. La prueba se basó en una caja de plexiglás (44 x 21 x 21 cm) con una zona de color negro, denominada área/zona oscura que abarcó la tercera parte de la caja, con una abertura de 13 x 5 cm que separa la zona oscura de la zona iluminada la cual fue irradiada con una lámpara de 22 W. El ratón comenzó su recorrido en la zona oscura y se grabó durante 5 minutos. Los datos se obtuvieron con el software AnyMaze y constaron del tiempo de latencia, que se define como el tiempo que tardan los ratones en salir desde la zona oscura a la iluminada por primera vez y el tiempo que se dispusieron en cada una de las zonas de la caja. Los ratones con un fenotipo ansioso se disponen mayormente en la zona oscura de la caja, con menor número de transiciones y menor tiempo de exploración de la zona iluminada en comparación a los controles (Kraeuter et al., 2019b).

**7.4.4. Suspensión de la cola.** Como última prueba conductual se optó por una relacionada a la depresión, tomando en cuenta la comorbilidad que pueden tener las conductas ansiosas y depresivas en ratones dadas por el componente inflamatorio. La prueba de suspensión de la cola es un modelo conductual que evalúa el comportamiento relacionado a la desesperanza o depresión en los animales (Nomura et al., 1992). Para ello, los ratones fueron suspendidos por la base de la cola usando una cinta adhesiva no dañina. La suspensión se realizó durante 6 minutos, que se dividen en 1 minuto de aclimatación y en los 5 minutos restantes se cuantificaron el tiempo total de inmovilidad y los intentos de escape. El ratón puede mostrar una conducta de lucha activa o inmovilidad pasiva. En donde, los ratones con un fenotipo depresivo tienen menores intentos y tiempo de escape en comparación a los controles.

**7.4.5. Cálculo de los niveles relacionados a la ansiedad (Z-score).** Los z-scores son medidas matemáticas sin unidad que permiten estandarizar los resultados dentro de un estudio, facilitando así la comparación entre datos provenientes de diferentes investigaciones. Estas puntuaciones normalizadas muestran cuántas desviaciones estándar se encuentra un dato específico por encima o por debajo del promedio de un grupo de referencia. En este estudio, donde se evaluaron los efectos de la administración de ceramidas se utilizó el grupo de estudio más cercano al tratamiento para normalizar los datos, el grupo SHAM.

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Donde X corresponde al valor individual observado para cada parámetro,  $\mu$  y  $\sigma$  representan la media y desviación estándar del grupo control, respectivamente.

**7.5. Cuantificación relativa de la expresión de genes relacionados a la inflamación y la activación de la microglía.** Se realizaron PCR cuantitativas en dos pasos para cuantificar los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TREM2 y CD69 utilizando como gen endógeno a 36B4 que codifica para una fosfoproteína ribosomal ácida (P0).

**7.5.1. Sacrificio de los animales.** Posterior a la última prueba conductual (Suspensión de la Cola) los ratones fueron anesteciados utilizando una mezcla de Zoletil 100/Xilacina (Virbac) vía intraperitoneal con una dosis de 1  $\mu$ L/gpc. Una vez que el ratón no mostró signos de reflejo, se procedió a realizar la dislocación cervical como método de eutanasia. Después de la muerte de los animales, se colocaron posición dorsal y se realizó una incisión longitudinal en la piel sobre el cráneo para exponer la superficie ósea. Con ayuda de unas tijeras se cortó cuidadosamente el cráneo a lo largo de la sutura sagital. Una vez abierto el cráneo, se retiraron los huesos parietales y frontales para exponer el cerebro. Los cerebros se extrajeron utilizando una tenaza cóncava y se en solución fisiológica para preservar su integridad durante el manejo. A continuación, se identificó la corteza prefrontal en la cuál se realizó la intervención quirúrgica, que se separó utilizando un bisturí. El tejido fue recuperado en 1mL de trizol frío (Fisher scientific; 15596018) que se almacenó en una hielera con hielo seco para poder realizar la extracción del ARN.

**7.5.2. Extracción de ARN con Trizol.** El tejido recuperado en 1mL de trizol (Fisher scientific; 15596018) frío se homogenizo por sonicación (Fisherbrand™ Desmembrador sónico modelo 120) durante 15 segundos a 5 pulsos y con una amplitud de 30%. Después de la homogenización el tejido se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo frío (Sigma-Aldrich; UN1888) y a las muestras se les dió un ciclo en el vórtex (SI-0236) de 15 segundos. Después se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 minutos (Eppendorf™ Centrifuge 5425/5425 R). Se recupero la fase acuosa a la que se le agregan 500 $\mu$ L de Isopropanol frío (Quality Chemical) y se incubaron durante toda la noche. Pasada la incubación las muestras se centrifugaron para formar la pastilla de ARN. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con Etanol 75% y un lavado con Etanol al 100% (Quality Chemical), entre cada lavado las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el Etanol. Para una mejor calidad de la extracción, con ayuda de una micropipeta con volumen de 10  $\mu$ L se retiró el Etanol excedente y se dejó secar la pastilla durante 5 minutos. El ARN se resuspendió en 50 $\mu$ L de agua DEPC (Invitrogen™ DEPC-Treated Water). Se midió la calidad del ARN con ayuda de un Nanodrop (Thermo

Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) utilizando solo aquellas muestras con relaciones de absorbancias  $A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$  y  $A_{260}/A_{230} > 2.0$ . Las muestras se llevaron a una concentración de 1,000 ng/μL y se almacenaron a -20°C procurando realizar la retrotranscripción en un tiempo menor a una semana después de la extracción.

**7.5.3. Cuantificación de los genes blanco.** El ADN complementario se sintetizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems con las concentraciones dispuestas en la tabla 2. Para la PCR punto final se utilizó el equipo Termociclador Veriti 96-Well, Applied Biosystems configurado de la siguiente manera: Paso 1 (25°C durante 10 minutos), Paso 2 (37°C durante 120 minutos), Paso 3 (85°C durante 5 minutos). Se realizó la RT-PCR utilizando las concentraciones dispuestas en la tabla 3 con el kit comercial iQ SYBR Green Supermix de Bio-Rad en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems en la configuración estándar (recomendación del proveedor). Se evaluó la expresión del ARNm de los genes relacionados a inflamación (IL-6, IL-1β y TNF-α) y a la activación de la microglía (TREM2 y CD68) con primers anteriormente validados por el equipo de trabajo dispuestos en la tabla 4 a una concentración de 1μM. Estos genes se normalizaron usando 36B4 como gen endógeno y se cuantificó relativamente su expresión por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Babcock et al., 2015). Todos los primers se adquirieron de la casa comercial ThermoFisher.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen por reacción (μL)</b>
10X RT buffer	2
25X dNTPs	0.8
10X Random p	2
MultiScribe™ (1 ml a 50 U/μl)	1
Agua DEPC	3.2
Templado	1
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>

**Tabla 4. Volúmenes por reacción para la retrotranscripción.** En cada caso se multiplicó el número de reacciones por el volumen de cada reactivo dispuesto en la tabla.

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
SYBR Mix	5
Agua DEPC	2
Primers (Mezcla 1:1)	2
Templado	1
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>

**Tabla 5. Volúmenes por reacción para la PCR cuantitativa.** En cada caso se multiplicó el número de reacciones por el volumen de cada reactivo dispuesto en la tabla.

Gen blanco	Secuencias
<b>CD68</b>	GTTACTCTCCTGCCATCCTTC
	GCAGGGTTATGAGTGACAGTTG
<b>TREM2</b>	GAACCGTCACCATCACTCTG
	CAGCATCTTGGTCATCTAGAGG
<b>IL-6</b>	TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC
	TTGGTCAGCCACTCCTTC
<b>TNF-α</b>	CAGGCGGTGCCTATGTCTC
	CGATCACCCCGAAGTCAGTAG
<b>IL-1β</b>	GCAACTGTTTCCTGAACTCAACT
	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<b>36B4</b>	TCCAGGCTTTGGGCATCA
	CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA

**Tabla 6. Secuencias de primers.** En la tabla se muestran los primers utilizados para los genes relacionados a la inflamación (IL-6, TNF-α e IL-1β) y los relacionados a la activación de la microglía (CD68 y TREM2), además del gen endógeno 36B4. Para cada gen, primero se presenta el Forward y debajo el Reverse.

**7.6. Tinciones histológicas e inmunohistoquímica para Iba1.** Para analizar signos de inflamación en la corteza prefrontal de los cuatro grupos de ratones se realizaron la tinción de Hematoxilina y Eosina para ver la morfología general, presencia de infiltrados y poblaciones neuronales y de la glía. También se realizó la tinción de Nissl para las células del Sistema Nervioso Central, que comprende a las neuronas, la microglía, los astrocitos y los oligodendrocitos. Por último se realizó una inmunohistoquímica para el marcador de microglía Iba1 con el fin de realizar un conteo de la población y analizar las ramificaciones de las células.

**7.6.1. Perfusión de los animales.** Posterior a la última prueba conductual (Suspensión de la Cola) los ratones fueron anesteciados utilizando una mezcla de Zoletil 100/Xilacina (Virbac) vía intraperitoneal con una dosis de 1  $\mu$ L/gpc. Una vez que el ratón no mostró signos de reflejo, se procedió a realizar la perfusión de los tejidos con PFA 4% (Sigma-Aldrich; P6148). Para ello, los ratones anestesiados se inmovilizaron con cinta adhesiva. Con ayuda de instrumentos quirúrgicos se expusó el corazón y se administró con una bomba de flujo una solución de PBS 1% en el ventrículo izquierdo y con unas tijeras se realizó un corte en la aorta. Se continuó con el flujo hasta que el líquido se percibió transparente. Una vez que el sistema circulatorio del animal estuvo limpio, el tejido se fijó con PFA 4% administrado en el ventrículo izquierdo hasta percibir gotículas en la nariz del ratón, esto para confirmar que la solución llegó al cerebro. Después de 5 minutos se realizó la decapitación de los animales. Después con ayuda de unas tijeras se cortó cuidadosamente el cráneo a lo largo de la sutura sagital. Una vez abierto el cráneo, se retiraron los huesos parietales y frontales para exponer el cerebro. Los cerebros se extrajeron utilizando una tenaza cóncava y se dispusieron en PFA al 4%. Las muestras se resguardaron durante 24-48 horas a 4°C.

**7.6.2. Técnica histológica convencional.** Pasadas las 24-48 horas. Se realizó la deshidratación del tejido con concentraciones de etanol (CTR scientific) 70%, 80%, 95% y 100%, cada paso es de 1 hora. Posterior a ello se realizó la clarificación con xilol (CTR scientific) durante 2 horas. Pasado el tiempo el tejido se introduce en parafina líquida a 60°C (Sigma-Aldrich; Paraplast X-TRA®) durante 2 horas. Las muestras fueron

incluidas en un molde para formar bloques sólidos. Se realizaron de 5µM de la corteza prefrontal con el microtomo Leica RM2245, procurando disponer de 2-3 cortes en cada laminilla.

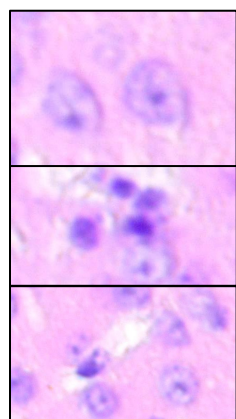
**7.6.3. Tinción Hematoxilina y Eosina (HyE).** Para la rehidratación de los cortes, las laminillas se dispusieron en coplins con contenido de Xilol y Xilol/Etanol durante 3 minutos, y después se paso a los alcoholes, Etanol 100%, Etanol 96% durante 2 minutos y al agua destilada durante 2 minutos. Posterior a la rehidratación, las muestras se tiñeron con hematoxilina (Sigma-Adrich; 517-28-2) durante 3 minutos para resaltar los núcleos y se observaron al microscopio. Para la diferenciación se realizo una inmersión en Alcohol Ácido y el viraje se realizo con Agua Amoniacal (Sigma-Aldrich; 1336-21-6). Después, los cortes se realizaron 6 inmersiones en Eosina (Sigma-Aldrich; 17372-87-1) para teñir los citoplasmas de rosa. Finalmente, los cortes se deshidrataron nuevamente en alcoholes ascendentes, se aclararon en Xilol y se cubrieron con un medio de montaje para la observación microscópica.

**7.6.4. Tinción especial de Nissl.** Para la rehidratación de los cortes, las laminillas se dispusieron en coplins con contenido de Xilol y Xilol/Etanol durante 3 minutos, y después se paso a los alcoholes, Etanol 100%, Etanol 96% durante 2 minutos y al agua destilada durante 2 minutos. Posterior a la rehidratación, las muestras se tiñeron en violeta de cresilo 0.5% (Sigma-Aldrich; C5042-10G) durante 30 minutos y se lavaron con agua destilada. Para la diferenciación las muestras se dispusieron en ácido acético 0.25% durante 15 segundos en pulsos de 5 segundos y posteriormente fueron llevadas a Etanol/Xilol en una sola inmersión corta. Finalmente, los cortes se deshidrataron nuevamente en alcoholes ascendentes, se aclararon en Xilol y se cubrieron con un medio de montaje para la observación microscópica.

**7.6.5. Inmunohistoquímica para Iba1.** Para la rehidratación de los cortes, las laminillas se dispusieron en coplins con contenido de Xilol y Xilol/Etanol durante 3 minutos, y después se paso a los alcoholes, Etanol 100%, Etanol 96% durante 2 minutos y al agua destilada durante 2 minutos. Posterior a la rehidratación se procedió a la

recuperación antigénica de los tejidos en buffer de citratos 10X (Sigma-Aldrich; H-3300) durante 15 segundos a 60°C. Posteriormente se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con BLOXAL SP-6000 (Sigma-Aldrich; SP-6000) durante 10 minutos. Después se realizó el bloqueo con suero de caballo con 50 uL al 2.5% (Gibco; 16050) durante 1 hora. Terminando el bloqueo, se incubó el anticuerpo primario Anti-Iba1 (abcam; ab178846) a una concentración de 1:400 durante 12 horas a 4°C. Pasada la incubación se dispuso el anticuerpo secundario Anti-Conejo HRP (VECTOR; BA-1300-2.5) a una concentración de 1:400 durante 2 horas a 25°C. Se procedió a la precipitación con 150 µL de diaminobencidina (DAB) (VECTOR; SK-4103) durante 10 minutos y se realizó una contratinción con Hematoxilina durante 2 minutos. Finalmente, los cortes se deshidrataron nuevamente en alcoholes ascendentes, se aclararon en Xilol y se cubrieron con un medio de montaje para la observación microscópica.

**7.6.6. Toma de fotografías y análisis morfométricos.** Para las tres técnicas realizadas se tomaron las microfotografías correspondientes con el Microscopio Nikon TS2FL en 3 aumentos distintos. Se realizó una microfotografía a 4X, 4 microfotografías a 10X y 8 microfotografías a 40X con el fin de realizar las morfometrías, las fotografías se tomaron procesaron con el Software NIS Elements. Para el conteo de células neuronales y de la glía en HyE y Nissl las neuronas se presentaron como núcleos eucromáticos con uno o más nucleolos prominentes, mientras que la glía se visualizó como núcleos heterocromáticos más basófilos. Finalmente los vasos sanguíneos se percibieron como núcleos oscuros delimitando a una luz. El conteo se realizó en los 8 campos a 40X cercanos a la punción para cada individuo de cada grupo utilizando “Cell Counter” de ImageJ. La presencia de infiltrados se identificó por un aumento en la densidad celular con núcleos irregulares e hiperpigmentados. Para el análisis de la presencia y ramificaciones de la microglía con Iba1 las microfotografías a 40X se trataron en ImageJ como imágenes binarias y posteriormente se eskeletonizaron. El número de células, número de ramificaciones y uniones, y el tamaño promedio de las ramificaciones se obtuvieron gracias a “SkeletonAnalyzer” de ImageJ.



Neuronas.

Células de la glía.

Vasos sanguíneos.



Neuronas.

Células de la glía.

Microglía.

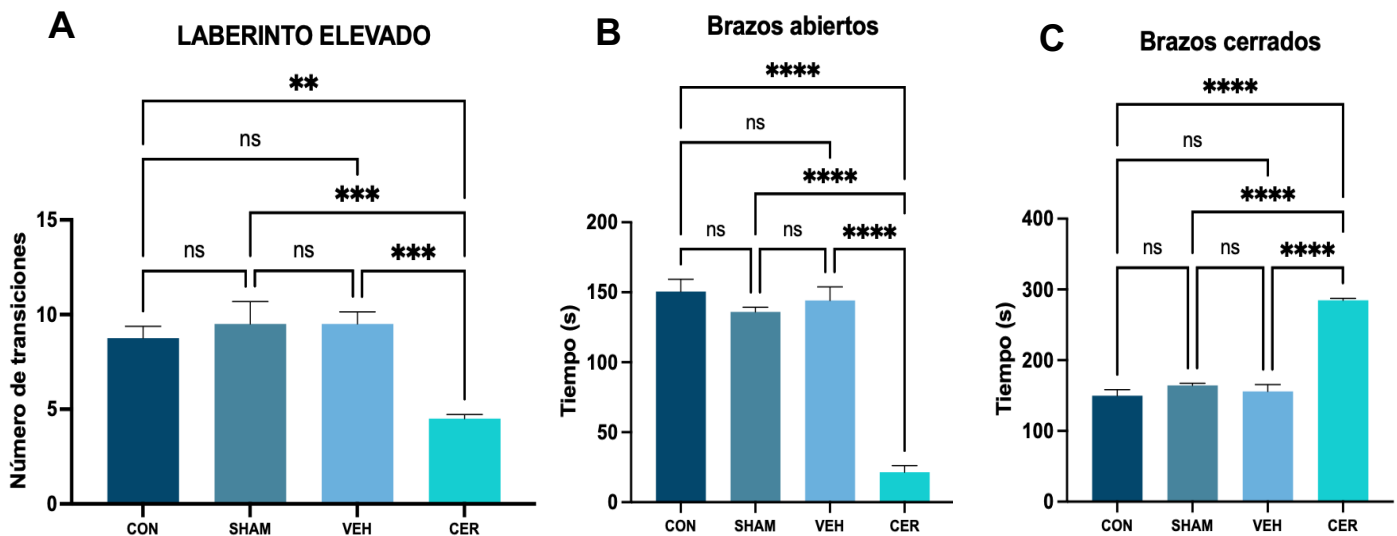
Vasos sanguíneos.

**7.7. Análisis estadístico.** Para todos los experimentos se realizaron las pruebas de Normalidad Shapiro-Wilk. Para los datos normales, se realizaron ANOVAs de una cola con una corrección de Tukey. En caso de no ser paramétricos, se utilizó Kruskal-Wallis con una corrección de Dunn. El análisis estadístico se realizó y gráfico con el software Graphpad Prism 9.0. Se consideraron estadísticamente significativos a los datos que presentaron una  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados.

### 8.1. La administración localizada de una mezcla de ceramidas de cadena larga induce una conducta similar a la ansiedad en ratones.

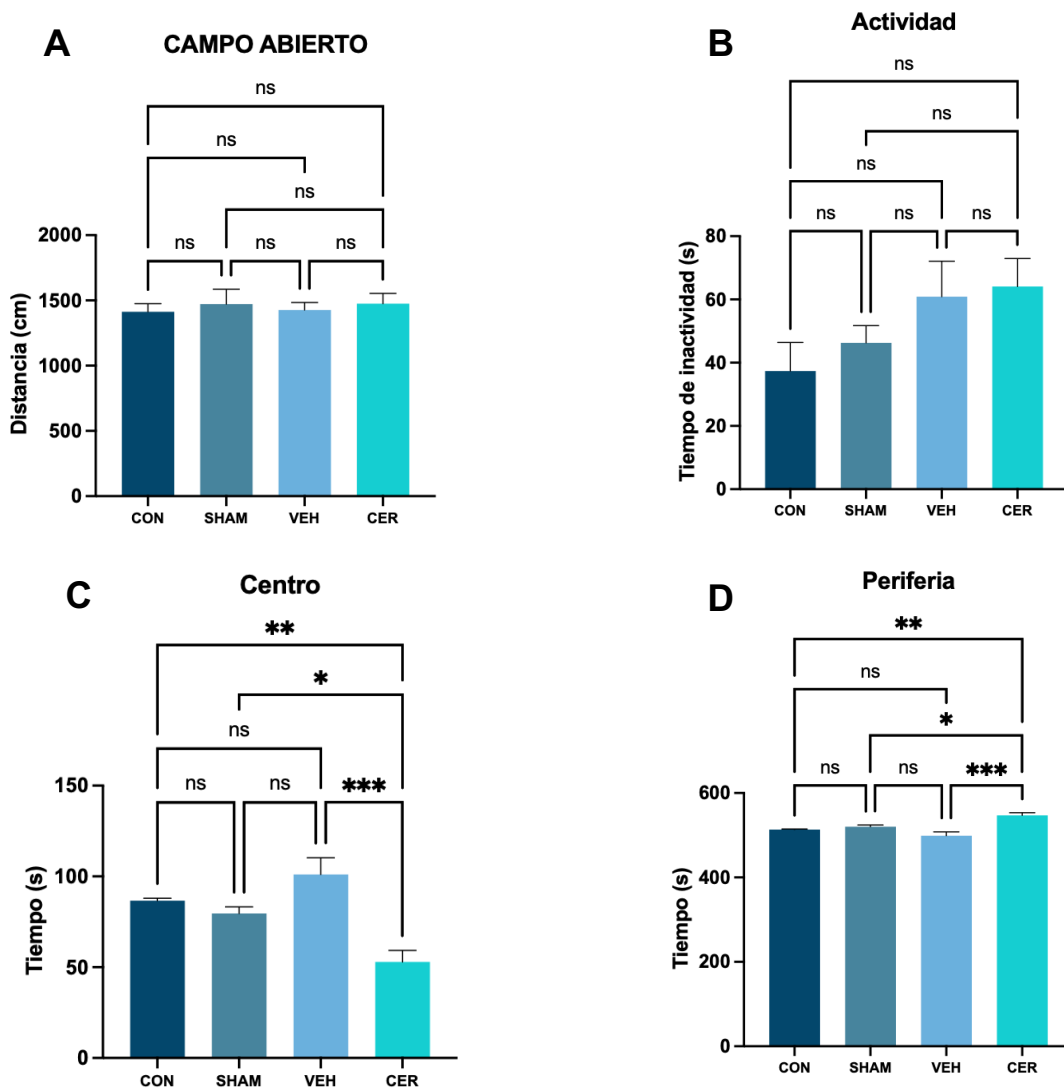
Para identificar una conducta similar a la ansiedad se realizaron tres pruebas conductuales en los 4 grupos de ratones analizados. En la prueba del laberinto elevado (Figura 6) los grupos de controles analizados: CON, SHAM y VEH no mostraron diferencia significativa en el número de transiciones (Figura 6A) o en el tiempo que permanecieron en los brazos abiertos (Figura 6B) y cerrados (Figura 6C). Para el grupo CER, se reportó un decremento significativo en el número de transiciones ( $p < 0.0001$ ) en comparación a los 3 grupos de controles analizados (Figura 6A). Adicionalmente, de los ratones administrados, se obtuvo un decremento significativo en el tiempo dispuesto en los brazos abiertos ( $p < 0.0001$ ) acompañado de un aumento significativo en los brazos cerrados de la prueba ( $p < 0.0001$ ) (Figuras 6A y 6B).



**Figura 6. Número de transiciones y tiempo dispuesto en cada uno de los brazos del laberinto elevado.** (A) Los ratones administrados con ceramidas presentaron un decremento significativo en el número de transiciones reales (de un brazo abierto a uno cerrado ó viceversa) en comparación a los grupos de controles analizados. (B) El grupo CER presentó un menor tiempo en los brazos abiertos del laberinto, acompañado de (C) un aumento significativo en los brazos cerrados. Adicionalmente, en los parámetros analizados (A, B y C) no se mostró una

diferencia significativa entre el grupo CON, SHAM y VEH. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar. Se utilizó la prueba de ANOVA con pos hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON ( $n = 6$ ), SHAM ( $n = 6$ ), VEH ( $n = 6$ ), CER ( $n = 6$ ). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

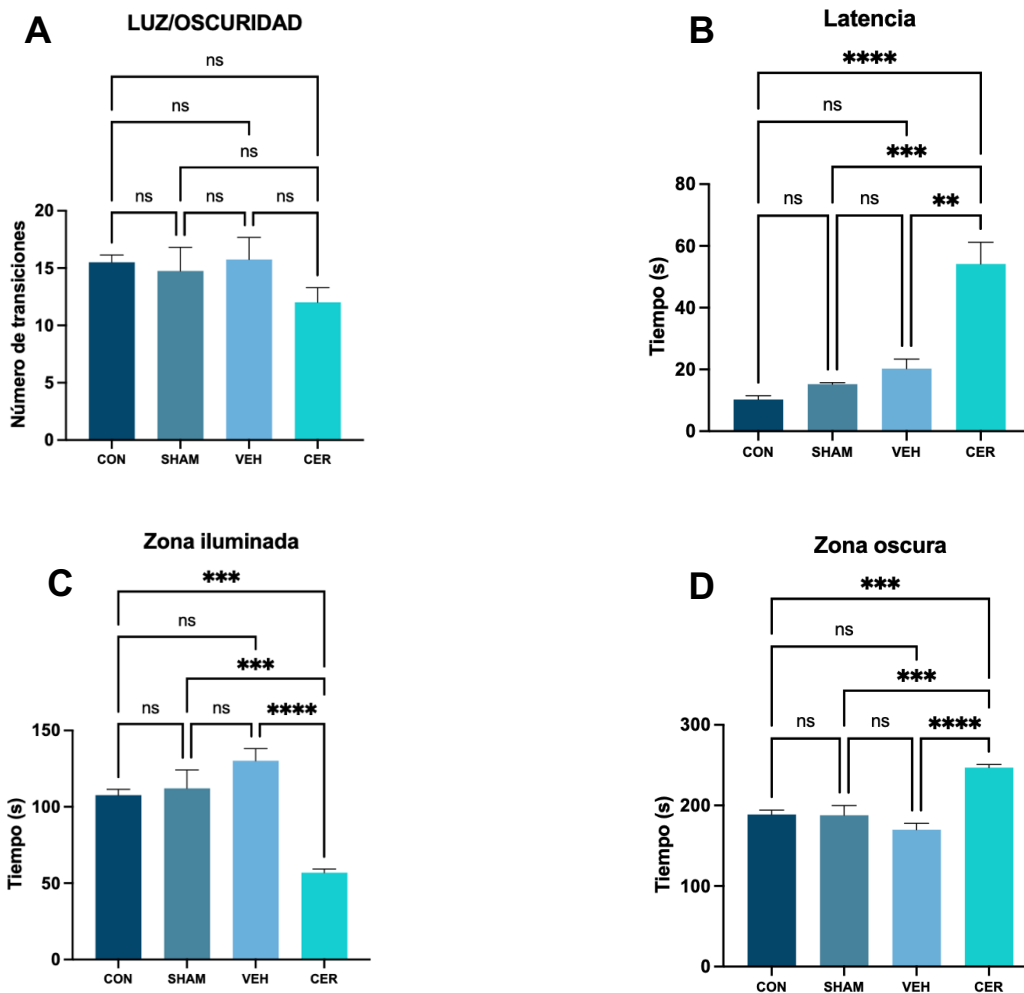
En la prueba del campo abierto, los ratones del grupo CER no presentaron diferencias significativas en la distancia total recorrida o el tiempo de inactividad en comparación a los controles (Figuras 7A y 7B).



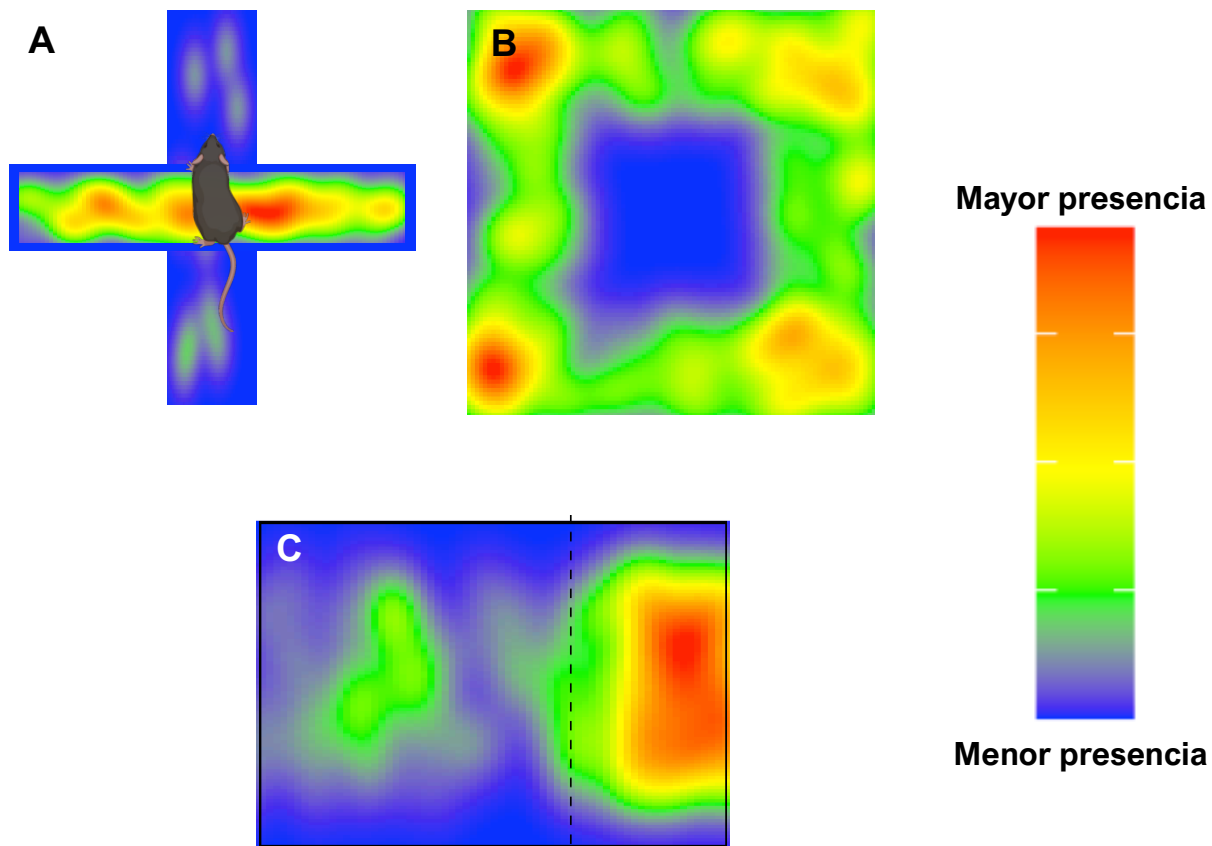
**Figura 7. Distancia total recorrida, tiempo de inactividad y tiempo que disponen los ratones analizados en el centro y la periferia del campo abierto.** (A) No se mostró diferencia significativa en la distancia total recorrida de los 4 grupos de ratones analizados ó (B) en el tiempo de inactividad. (C) En el grupo CER se presentó un decremento significativo en el tiempo dispuesto en el centro del campo, (D) acompañado de un incremento significativo en la periferia, adicionalmente, en los grupos CON, SHAM y VEH no hubo cambios en la disposición en el centro y la periferia del campo. Se utilizó la prueba de ANOVA con pos hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON ( $n = 6$ ), SHAM ( $n = 6$ ), VEH ( $n = 6$ ), CER ( $n = 6$ ). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

Los parámetros que presentaron significancia estadística fueron los tiempos dispuestos por el grupo CER en el centro y la periferia del campo, en donde, se reportó un decremento significativo en el centro del campo contra el grupo CON ( $p = 0.0065$ ), SHAM ( $p = 0.0317$ ) y VEH ( $p = 0.0003$ ) (Figura 7C), acompañado de un aumento significativo en la periferia del campo contra el grupo CON ( $p = 0.0065$ ), SHAM ( $p = 0.0317$ ) y VEH ( $p = 0.0003$ ) (Figura 7D). Adicionalmente, al comparar los datos de los grupos de controles analizados: CON, SHAM y VEH no se presentó una diferencia significativa en la disposición en el centro o periferia del campo.

En la caja luz-oscuridad, los ratones CER presentaron una tendencia al decremento en el número de transiciones, pero, sin diferencia significativa en comparación a los controles (Figura 8A). En dónde se reportó un aumento significativo fue en el tiempo que pasan los ratones en explorar por primera vez la zona iluminada de la caja, es decir, el tiempo de latencia, en dónde encontramos que el grupo CER tuvo un decremento significativo contra el grupo CON ( $p < 0.0001$ ), SHAM ( $p = 0.0003$ ) y VEH ( $p = 0.0012$ ) (Figura 8B). Además, los ratones administrados dispusieron significativamente menor tiempo en la zona iluminada de la caja ( $p = 0.0002$  y  $p = < 0.0001$ ) (Figura 8C) acompañado de un aumento significativo en la zona oscura ( $p = 0.0004$  y  $p = < 0.0001$ ) (Figura 8B), en comparación a los controles. Por último, al comparar los datos de los grupos de controles analizados: CON, SHAM y VEH no se presentó una diferencia significativa en el tiempo dispuesto las zonas de la caja (Figuras 8C y 8D).



**Figura 8. Número de transiciones, tiempo de latencia y tiempos en la zona iluminada y oscura de la caja luz-oscuridad.** (A) No se mostró diferencia en el número de transiciones, sin embargo, hubo una tendencia marcada al decremento en el grupo CER en comparación a los controles. (B) Se reportó un aumento significativo en el tiempo de latencia de los ratones administrados en comparación a los controles. (C) En el grupo CER se presentó un decremento significativo en el tiempo dispuesto en la zona iluminada (D) acompañado de un incremento significativo en la zona oscura, adicionalmente, en los grupos CON, SHAM y VEH no hubo cambios en la disposición en las zonas de la caja. Se utilizó la prueba de ANOVA con pos hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON ( $n = 6$ ), SHAM ( $n = 6$ ), VEH ( $n = 6$ ), CER ( $n = 6$ ). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

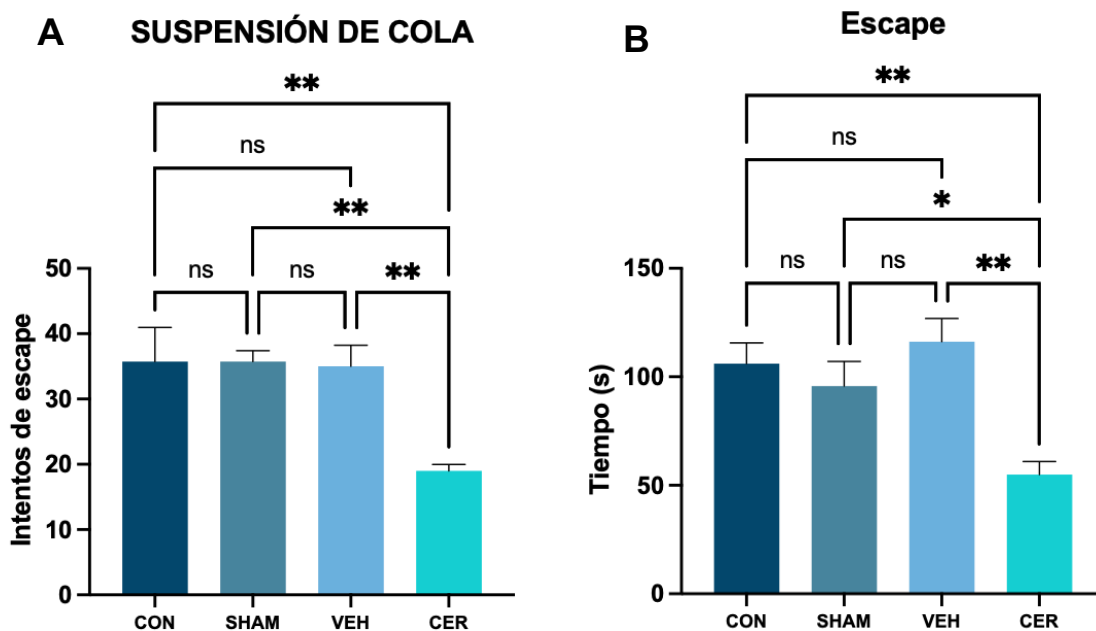


**Figura 9. Simulaciones de los recorridos realizados por los ratones del grupo CER en las pruebas conductuales relacionadas a un fenotipo ansioso.** La administración de ceramidas de cadena larga en ratones promovió (A) una mayor disposición en los brazos cerrados del laberinto elevado, (B) mayor tiempo en la periferia del campo abierto y, (C) menor tiempo en la zona iluminada de la caja luz-oscuridad. Los mapas de calor de las simulaciones se normalizaron utilizando los datos obtenidos en los grupos de controles: CON, SHAM y VEH. El color azul indica menor disposición o presencia y el rojo mayor disposición o presencia.

En las tres pruebas conductuales el grupo CER mostró conductas similares a la ansiedad en comparación a los controles, caracterizadas por un mayor tiempo en los brazos cerrados del laberinto elevado (Figura 9A), menor exploración del centro en el campo abierto (Figura 9B) y un decremento en el tiempo en la zona iluminada en la caja luz-oscuridad (Figura 9C).

## 8.2. Los ratones con un fenotipo ansioso muestran una conducta similar a la depresión en la prueba de la suspensión de la cola.

Debido al componente inflamatorio que se analizó en el proyecto y relacionado a la comorbilidad de las conductas similares a la ansiedad y a la depresión dada por la inflamación en ratones, se realizó la prueba de la suspensión de la cola, relacionada a una conducta similar a la depresión en murinos (Figura 10). En la prueba de la suspensión de la cola, los ratones del grupo CER tuvieron un decremento significativo en los intentos de escape contra el grupo CON ( $p = 0.0037$ ), SHAM y VEH ( $p = 0.0003$ ) (Figura 10A). Adicionalmente el tiempo de escape también se vio significativamente reducido con la administración de las ceramidas de cadena larga en comparación a los controles ( $p = 0.0048$ ;  $p = 0.0234$ ;  $p = 0.0010$ ). Adicionalmente, al comparar los datos de los grupos de controles analizados: CON, SHAM y VEH no se presentó una diferencia significativa en los parámetros de número y tiempo de escape.

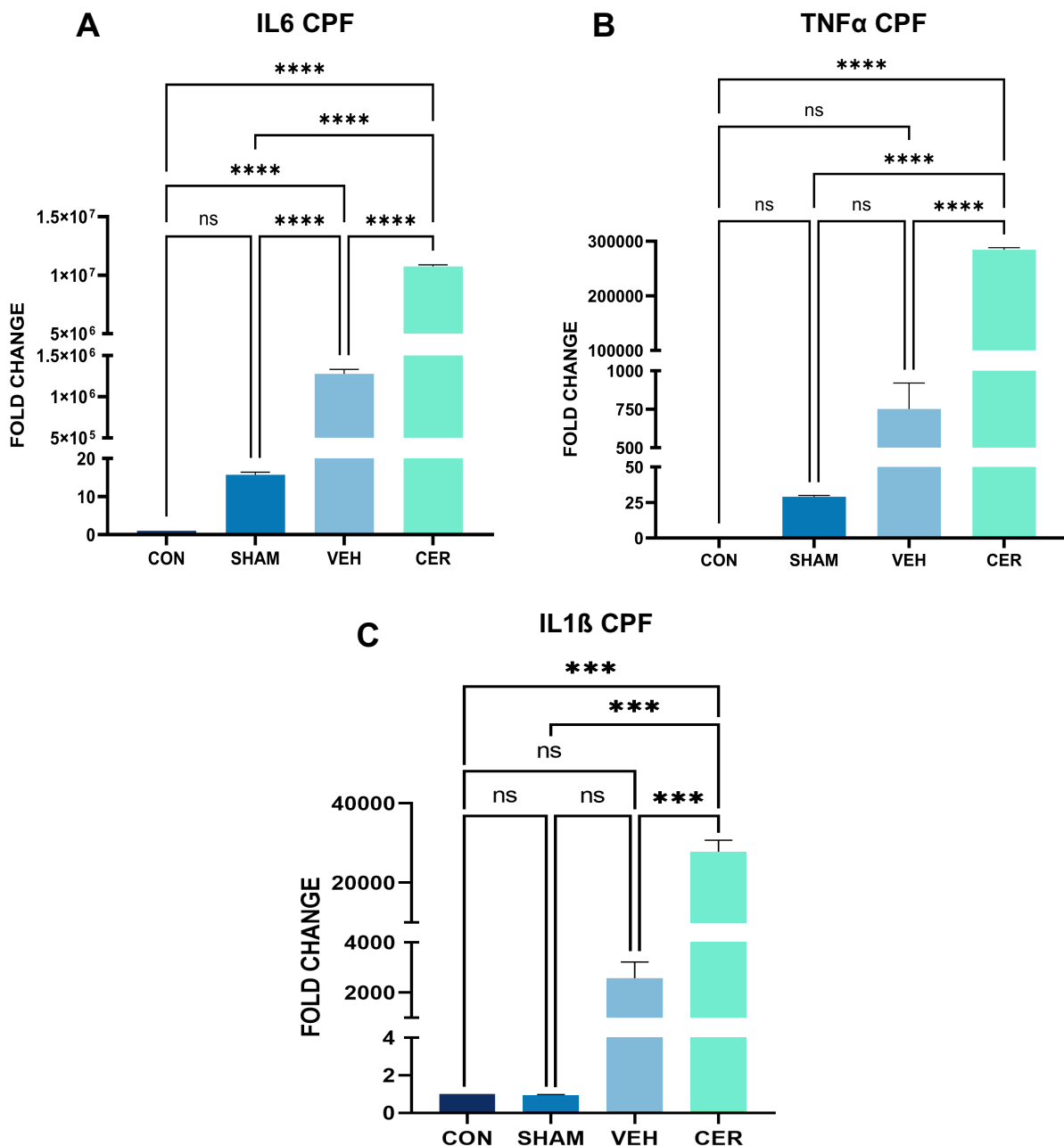


**Figura 10. Intentos de escape y tiempo de escape de los murinos en la suspensión de la cola.** La administración de ceramidas de cadena larga en ratones indujo una reducción (A) en los intentos de escape y, (B) el tiempo de escape en comparación a los controles. Se utilizó la prueba de ANOVA con pos hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

Para CON (n = 6), SHAM (n = 6), VEH (n = 6), CER (n = 6). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

Lo anterior se relacionado con una conducta similar a la depresión en aquellos ratones que ya habían presentado una conducta similar a la ansiedad, todo esto, dado por la administración localizada de la mezcla de ceramidas de cadena larga.

### 8.3. Los ratones del grupo CER muestran una sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y señales de neuroinflamación.



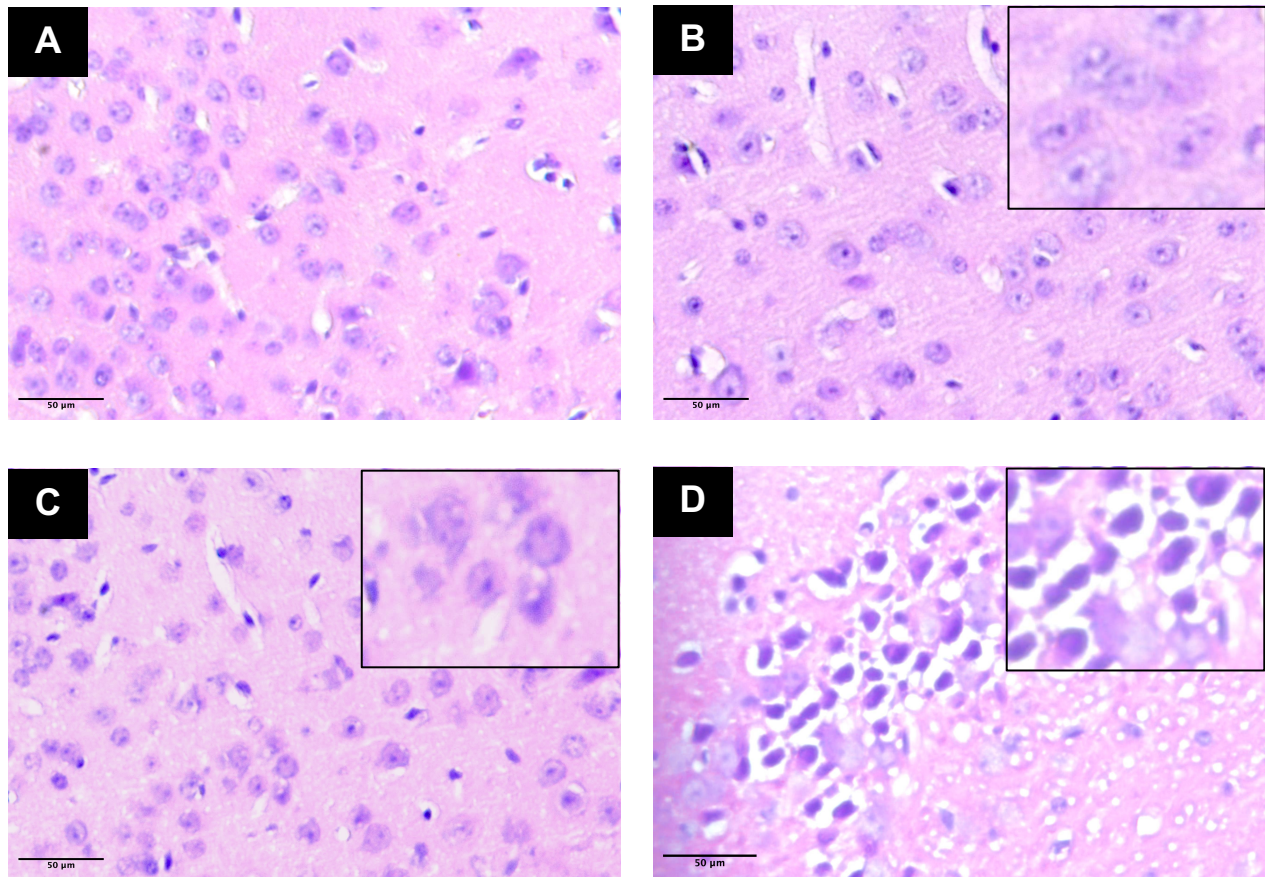
**Figura 11. Expresión de genes relacionados a la inflamación en la corteza prefrontal de los ratones.** (A) Los ratones del grupo CER presentaron una sobreexpresión en IL6 en comparación a los grupos de controles analizados (CON, SHAM y VEH). En el caso del grupo VEH IL6 se vió significativamente mayor expresada que en los grupos CON y SHAM. (B) La expresión de TNF $\alpha$  resultó significativamente aumentada en los ratones CER en comparación a los controles, destacando que los grupos CON, SHAM y VEH no presentaron diferencia significativa entre sí. (C) Similar a TNF $\alpha$ , la expresión de IL1 $\beta$  sólo se reportó aumentada significativamente en los ratones del grupo CER, mientras que los grupos de controles no mostraron un cambio significativo en la expresión. Se utilizó la prueba de ANOVA con pos hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON (n = 3), SHAM (n = 3), VEH (n = 3), CER (n = 3). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

Con el objetivo de determinar si la administración de ceramidas induce un ambiente proinflamatorio en la corteza prefrontal, se evaluó la expresión de genes relacionados con la inflamación en los distintos grupos experimentales de ratones. Además, se realizaron tinciones histológicas con Hematoxilina y Eosina (H&E) y Nissl para examinar la morfología de la corteza prefrontal y detectar posibles alteraciones estructurales o infiltrados celulares asociados a procesos inflamatorios.

Para el análisis de la expresión génica se cuantificaron los niveles de IL6, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (Figura 11). En el caso de IL6, se observó un aumento significativo en su expresión en el grupo tratado con ceramidas (CER) en comparación con los grupos CON, SHAM y VEH ( $p < 0.0001$ ). Adicionalmente, también se detectó un aumento significativo de IL6 en el grupo VEH al compararlo con los grupos CON y SHAM ( $p < 0.0001$ ), lo cual sugiere que el vehículo utilizado podría tener un efecto proinflamatorio por sí mismo, aunque menos pronunciado que el inducido por las ceramidas (Figura 11A). En relación con TNF $\alpha$ , no se encontraron diferencias significativas en la expresión entre los grupos CON, SHAM y VEH. Sin embargo, el grupo CER mostró un aumento significativo en la expresión de este gen en comparación con los tres grupos de control ( $p < 0.0001$ ) (Figura 11B). Por último, en cuanto a IL1 $\beta$ , se observó un aumento significativo en la expresión génica únicamente en el grupo CER respecto a los grupos CON, SHAM y VEH ( $p <$

0.0001), mientras que entre estos últimos no se detectaron diferencias significativas (Figura 11C).

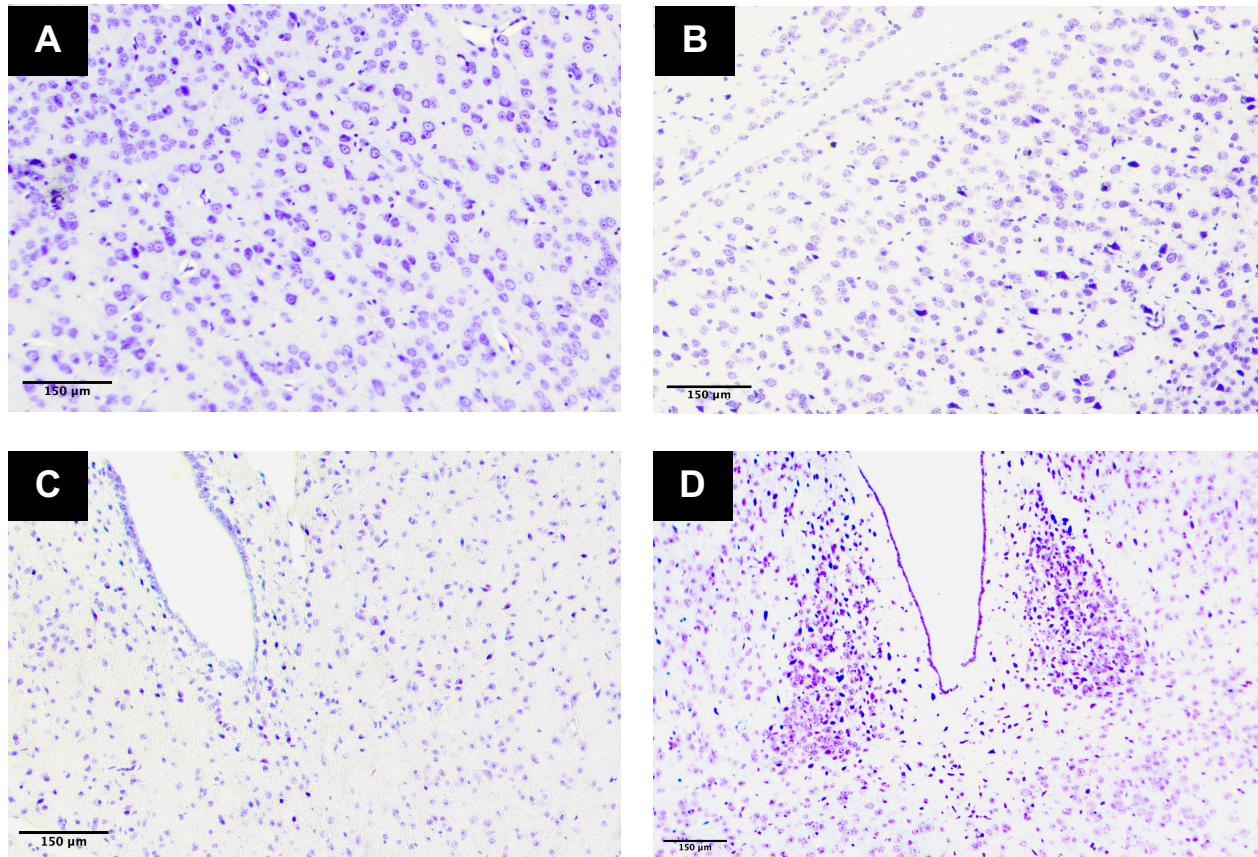
En conjunto, estos resultados indican que la mezcla de ceramidas de cadena larga indujo una respuesta proinflamatoria significativa en la corteza prefrontal, evidenciada por la sobreexpresión de IL6, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ . La elevación significativa de IL6 en el grupo VEH sugiere un posible efecto inespecífico del vehículo, aunque este no se acompañó de cambios significativos en TNF $\alpha$  ni IL1 $\beta$ , lo que refuerza la hipótesis de que el efecto proinflamatorio es atribuible principalmente a la acción de las ceramidas.



**Figura 12. Microfotografías a 40X de la corteza prefrontal de los ratones con la tinción de Hematoxilina y Eosina.** (A) El grupo CON muestra principalmente núcleos neuronales caracterizados por tener la cromatina eucromática y el nucléolo prominente y bien definido, con presencia de vasos sanguíneos y algunas células de la glía. (B) En los ratones SHAM se

identificaron células neuronales con morfología preservada y distribución regular. (C) Al igual que en el CON y SHAM, el grupo VEH presentó principalmente células neuronales con un presencia baja de células de la glía (núcleos heterocromáticos más pequeños). (D) En contraste con los grupos de control, en el grupo CER se observó una acumulación densa de células con núcleos hipercromáticos y morfología irregular. En todos los casos, las imágenes fueron tomadas cercanas a la punción con la aguja. Escala 50µm. Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

Con el fin de corroborar si la sobreexpresión de genes proinflamatorios observada en el grupo tratado con ceramidas estaba asociada a un proceso inflamatorio reactivo a nivel tisular, se realizaron análisis histológicos mediante tinciones de Hematoxilina y Eosina, utilizando un aumento de 40X para una evaluación detallada de la morfología celular en la corteza prefrontal. En los grupos control (CON, SHAM y VEH), las microfotografías revelaron núcleos neuronales con morfología conservada, caracterizados por su aspecto pálido y la presencia de un nucléolo prominente y bien definido (Figuras 12A, 12B y 12C). La densidad celular fue comparable entre estos tres

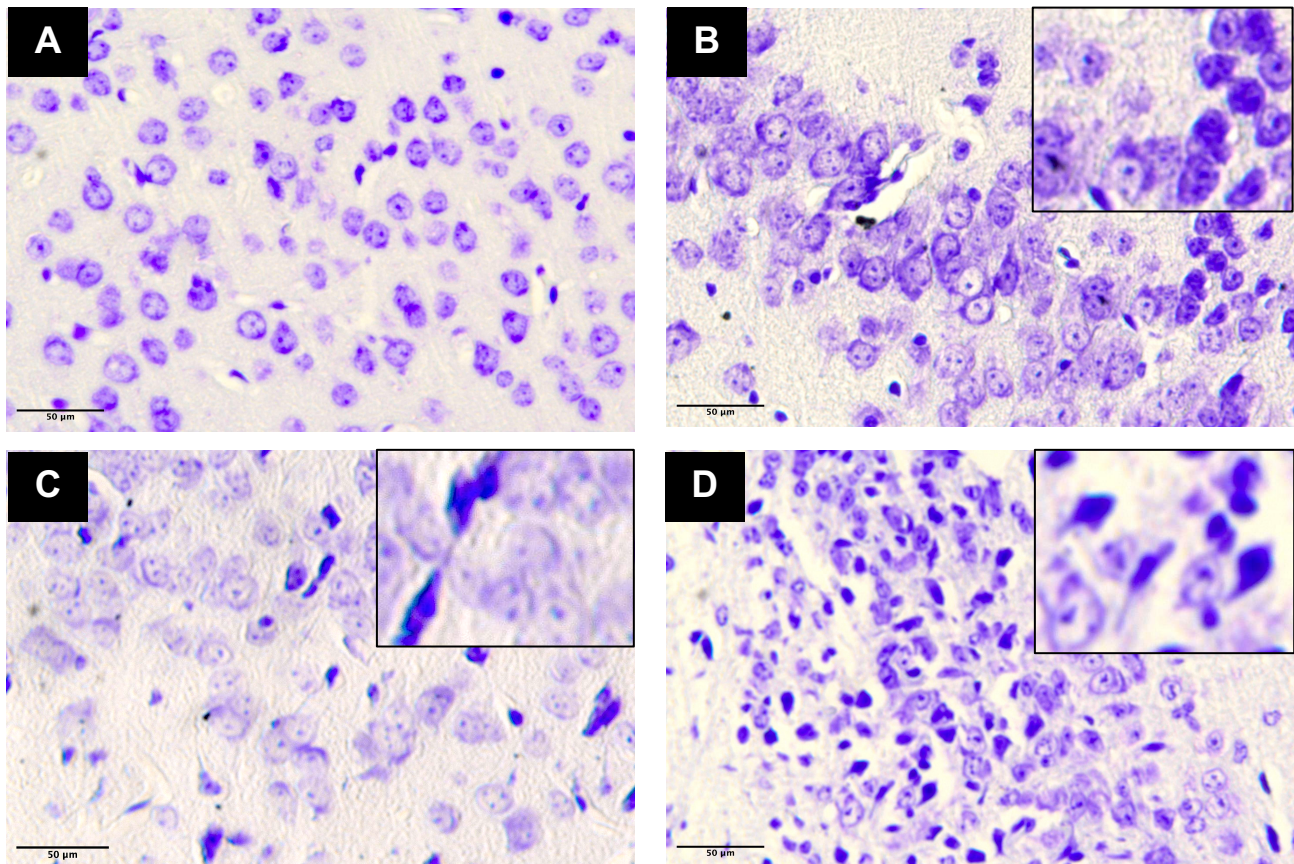


**Figura 13. Microfotografías a 10X de la corteza prefrontal de los ratones con método de Nissl.** (A) El grupo CON mostró una densidad celular uniforme con neuronas bien definidas y una organización estructural conservada. No se observaron infiltrados celulares ni alteraciones en la morfología del tejido (B) En el grupo SHAM no se detectaron infiltrados celulares aparentes. La tinción permitió identificar tanto neuronas como células gliales distribuidas de manera regular. (C) El grupo VEH no presentó infiltrados celulares evidentes. Se observaron neuronas con morfología típica y núcleos prominentes, así como células gliales distribuidas de forma típica. (D) En el grupo CER se observó una acumulación evidente de infiltrados celulares en las regiones cercanas a la administración del tratamiento. Las células infiltradas presentaron núcleos hipercromáticos y morfología irregular. Escala 150µm. Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

grupos, con una distribución uniforme y sin evidencia de infiltrados celulares. Asimismo, se identificaron células gliales, las cuales se distinguieron por presentar núcleos más pequeños y con tinción más intensa que los de las neuronas, sin que esto implicara una activación glial anómala o signos de inflamación. Por otra parte, el análisis del grupo CER reveló la presencia de infiltrados celulares evidentes, localizados principalmente en áreas cercanas al sitio de administración del tratamiento. Estos infiltrados se caracterizaron por una acumulación densa de núcleos hipercromáticos y de morfología irregular (Figura 12D). La alteración en la distribución celular y la presencia de estos núcleos heterocromáticos sugieren una activación del sistema inmune local y respaldan los datos moleculares obtenidos previamente, que mostraron una sobreexpresión significativa de genes proinflamatorios en este mismo grupo.

Ahora, para el método de Nissl, a un aumento de 10X, se analizaron regiones cercanas a la punción en los diferentes grupos experimentales. En los grupos CON, SHAM y VEH (Figuras 13A, 13B y 13C), se observó una morfología neuronal conservada, con una distribución celular regular, sin presencia de infiltrados ni alteraciones visibles en la estructura tisular. Las neuronas presentaron núcleos bien definidos, y la densidad celular fue similar entre estos grupos, lo que sugiere que ni la cirugía ni el vehículo generaron respuestas celulares inflamatorias detectables a este nivel. Por el contrario, en el grupo CER (Figura 13D), se identificaron acumulaciones celulares densas y más

basófilas en comparación con los núcleos observados en los grupos de control. Esta diferencia en la tinción y en la densidad celular podría deberse a la presencia de células inflamatorias o gliales activadas, que tienden a mostrar una mayor condensación de cromatina. También en Nissl, a un aumento de 40X en el grupo CON, las neuronas mostraron cuerpos celulares bien delimitados, núcleos redondeados con cromatina laxa y nucléolos prominentes. La distribución celular fue uniforme en los ocho campos analizados, y se identificaron células gliales con núcleos pequeños y más intensamente teñidos, dispuestas regularmente y sin signos de activación (Figura 14A). En el grupo SHAM, la organización celular fue similar a la del grupo control; sin embargo, se observó una mayor prominencia del soma neuronal y una tinción citoplasmática más intensa, lo cual puede interpretarse como una actividad metabólica aumentada asociada al procedimiento quirúrgico, sin evidencia de infiltración celular o daño estructural (Figura 14B). El grupo VEH también presentó una morfología neuronal y glial bien conservada, con una distribución homogénea de las células y sin indicios de inflamación o reactividad glial significativa (Figura 14C).



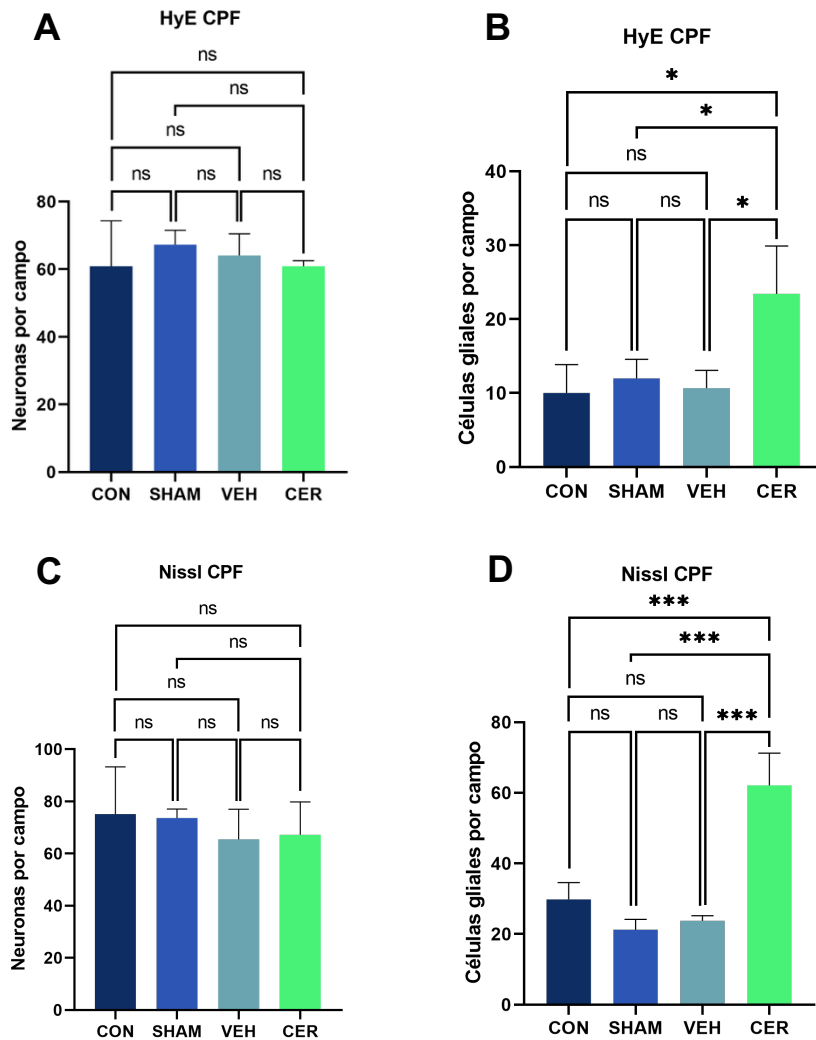
**Figura 14. Microfotografías a 40X de la corteza prefrontal de los ratones con método de Nissl.** (A) El grupo CON mostró una morfología neuronal y glial típica, con cuerpos celulares bien definidos, núcleos redondeados y distribución uniforme a lo largo de la corteza prefrontal. (B) En el grupo SHAM, se observó una agrupación celular compatible con neuronas metabólicamente más activas, lo cual se infiere por el aspecto más prominente del soma neuronal y la tinción más intensa del citoplasma. (C) En el grupo VEH se observó la presencia de neuronas acompañadas de células gliales, ambas con morfología conservada. La distribución celular fue homogénea y sin indicios de infiltrados o alteraciones estructurales. (D) En el grupo CER se observó una mayor densidad celular en comparación con los grupos de control. Además, las células presentaron núcleos más alargados e hipercromáticos. En todos los casos, las imágenes fueron tomadas cercanas a la punción con la aguja. Escala 50µm. Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

Por último, el grupo CER mostró una mayor densidad celular, acompañada de células con núcleos hipercromáticos, elongados y de morfología irregular, lo que sugiere la presencia de células inflamatorias o glía reactiva (Figura 14D). Esta acumulación celular, junto con la alteración en la organización tisular, es compatible con un proceso inflamatorio local desencadenado por la administración de ceramidas, en concordancia con los resultados moleculares que evidenciaron una sobreexpresión significativa de genes proinflamatorios en este grupo.

#### **8.4. La administración de la mezcla de ceramidas de cadena larga incrementa en el conteo de células gliales por campo sin pérdida neuronal.**

Para las tinciones de Hematoxilina y Eosina y Nissl se realizó el conteo de células neuronales y células de la glía en 8 campos a 40X de cada uno de los individuos de los grupos analizados. Para poder caracterizar a las neuronas se tomaron en cuenta aquellos núcleos eucromáticos, con la presencia de un nucléolo prominente y bien definido, mientras que para la glía, se buscaron núcleos heterocromáticos, más pequeños con el nucléolo oculto. Dentro de los resultados, para ambas tinciones, no hubo una diferencia significativa en el conteo de neuronas por campo (Figuras 15A y 15C), lo que indica que las ceramidas no están induciendo una pérdida neuronal. No

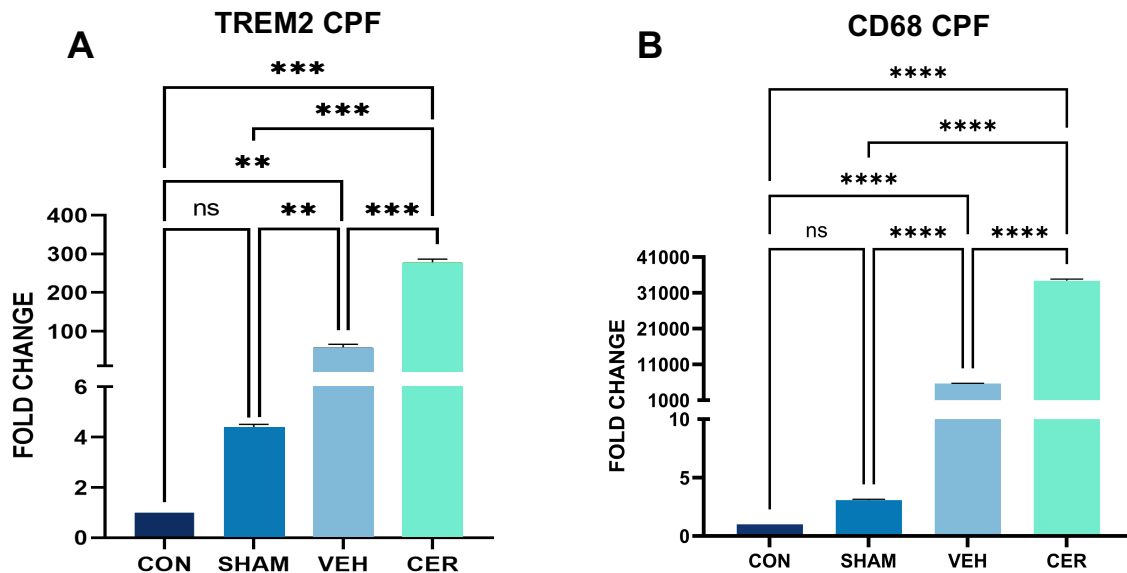
obsante, en ambas tinciones se observó un incremento significativo en el conteo de células de la glía por campo ( $p < 0.05$ ) (Figuras 15B y 15C), haciendo referencia a que el proceso inflamatorio observado en el grupo CER está siendo mediado por una gliosis.



**Figura 15. Expresión de genes relacionados a la inflamación en la corteza prefrontal de los ratones.** (A y C) No se tuvo diferencia significativa en el conteo de neuronas por campo, en 8 campos, de los diferentes grupos analizados. (B y D) Los análisis morfométricos en las tinciones de Hematoxilina y Eosina y Nissl indican un incremento significativo en las células de la glía en el grupo CER en comparación a los controles: CON, SHAM y VEH. Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis con pos hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON ( $n = 3$ ), SHAM ( $n = 3$ ), VEH ( $n = 3$ ), CER ( $n = 3$ ). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

### 8.5. Las ceramidas de cadena larga favorecen fenotipo de la microglía reactivo que incluye morfología ameboide relacionado a la inflamación.

Para poder caracterizar el fenotipo de la microglía presente en los ratones que fueron administrados con la mezcla de ceramidas de cadena larga se realizó la cuantificación relativa de la expresión del marcador fagocítico TREM2 y del marcador de microglía reactivo CD68. Adicionalmente se realizó una inmunohistoquímica para el marcador Iba1 con el objetivo de visualizar la estructura de la microglía presente en los cuatro grupos de estudio y con el software SkeletonAnalyzer de ImageJ, relacionarla con un estado de reposo o activación.

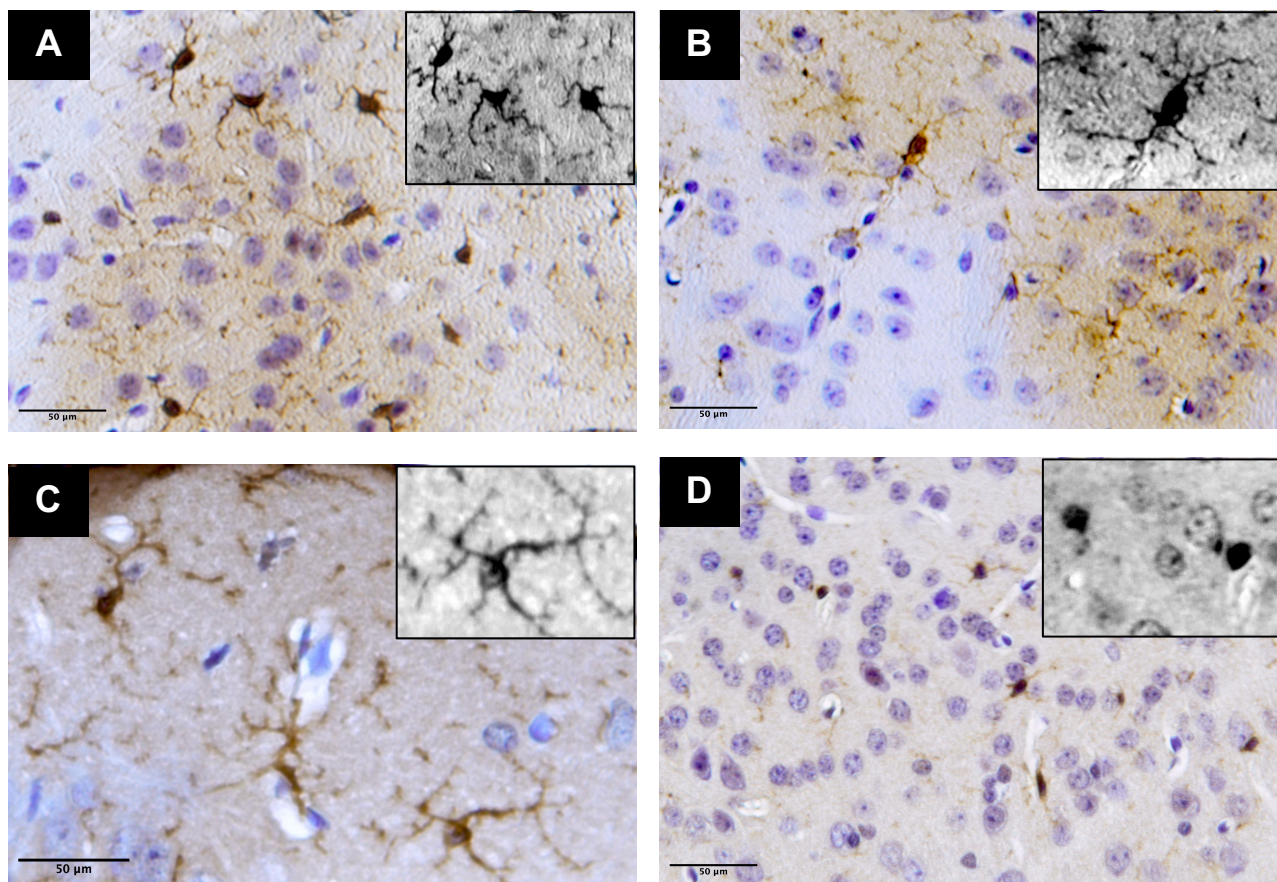


**Figura 16. Expresión de genes relacionados a la activación de la microglía en la corteza prefrontal de los ratones.** (A) Los ratones del grupo CER presentaron una sobreexpresión de TREM2 en comparación a los grupos de controles analizados. Para el grupo VEH TREM2 tuvo una mayor expresión que en los grupos CON y SHAM. (B) Los ratones del grupo CER presentaron una sobreexpresión de CD68 en comparación a los grupos de controles analizados. Para el grupo VEH CD68 tuvo una mayor expresión que en los grupos CON y SHAM. Se utilizó la prueba de ANOVA con pos hoc de Tukey para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON ( $n = 3$ ), SHAM ( $n = 3$ ), VEH ( $n = 3$ ), CER ( $n = 3$ ). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

La evaluación de la expresión génica de marcadores asociados a la activación microglial mostró que el grupo CER presentó un aumento significativo en la expresión de TREM2 y CD68 en comparación con los grupos de controles ( $p < 0.0001$ ) (Figuras 16A y 16B). Además, se observó una mayor expresión de ambos genes en el grupo VEH en comparación con CON y SHAM ( $p < 0.05$ ), aunque la expresión más elevada se presentó consistentemente en el grupo CER. En este grupo, la expresión de CD68 fue más pronunciada que la de Trem2, lo que sugiere que las microglías se encuentran en un estado de activación más reactivo, asociado a procesos inflamatorios, que en un estado predominantemente fagocítico.

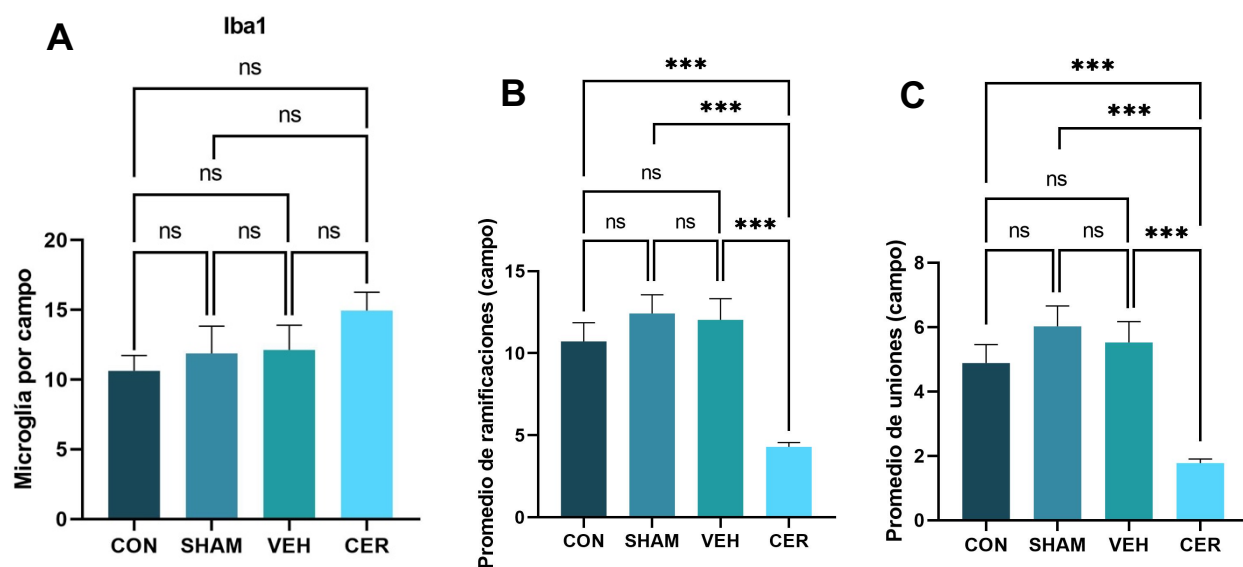
Al observar las microfotografías de inmunohistoquímica para Iba1 con contratinción de hematoxilina a 40X, se apreciaron diferencias morfológicas claras entre los grupos. En los grupos CON, SHAM y VEH (Figuras 17A, 17B y 17C), la microglía presentó una morfología ramificada y alargada, característico de un estado de reposo. En particular, las células del grupo CON mostraron ramificaciones más finas y estructuras de menor tamaño, lo que se interpreta como una microglía fisiológicamente estable. Para el grupo CER (Figura 17D), se observaron células microgliales con morfología ameboides, más redondeadas, con reducción evidente de las prolongaciones. Esta transformación morfológica, junto con la expresión aumentada de Cd68 y Trem2, respalda la hipótesis de que la administración de ceramidas de cadena larga induce respuesta microglial proinflamatoria, con un posible cambio hacia un fenotipo reactivo y potencialmente neurotóxico.

Lo anterior se corrobora con las morfometrías realizadas en 8 campos de los tejidos tratados con Iba1 de los diferentes grupos de ratones analizados, en donde, se reportó que, no hubo diferencias significativas en cuanto al conteo de células de la microglía entre los grupos (Figura 18A), pero, si hay una disminución significativa en el promedio de ramificaciones por campo ( $p = 0.0004$ ) (Figura 18B) y de uniones por campo ( $p = 0.0002$ ) (Figura 18C) en el grupo CER en comparación a los grupos de controles analizados, en donde, se destaca que el grupo CON, SHAM y VEH no tuvieron una diferencia significativa en los parámetros mencionados.



**Figura 17. Microfotografías a 40X de la corteza prefrontal de los ratones con una inmunohistoquímica para Iba1 y contratinción con Hematoxilina. (A, B y C) Los grupos de controles: CON, SHAM y VEH exhibieron células con una morfología altamente ramificada, con prolongaciones finas y aparentemente más extensas que las observadas en el grupo tratado. (D) En el grupo CER, aunque también se observaron células ramificadas, se detectó además la presencia de células con morfología ameboide, de contorno más redondeado y con escasas o nulas prolongaciones. En todos los casos, las imágenes fueron tomadas cercanas a la punción con la aguja. Escala 50µm. Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.**

Finalmente, las morfometrías de la microglía indican, al igual que las microfotografías que la morfología celular presente en los ratones administrados con ceramidas de cadena larga es menos ramificada y más ameboide en comparación a los controles, sugiriendo que el proceso inflamatorio reactivo está dado en parte por la activación de la microglía en su fenotipo M1 (proinflamatorio).

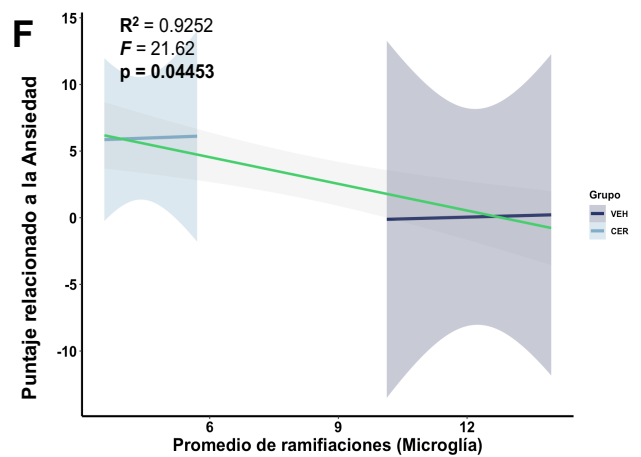
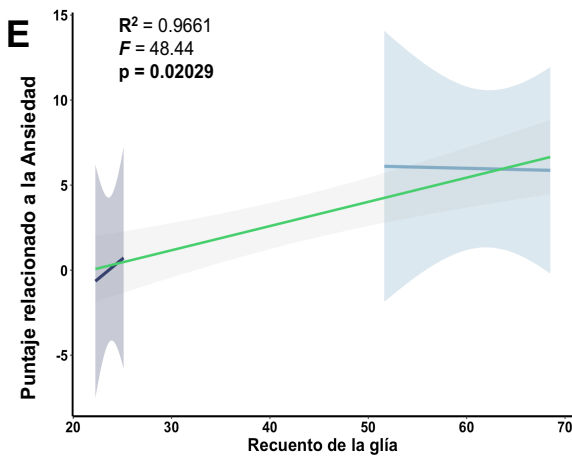
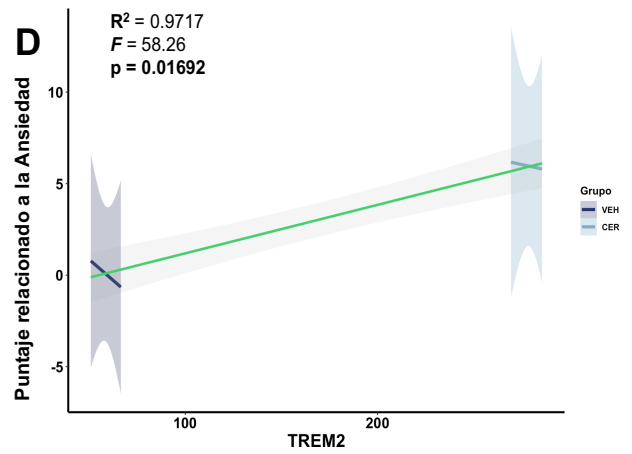
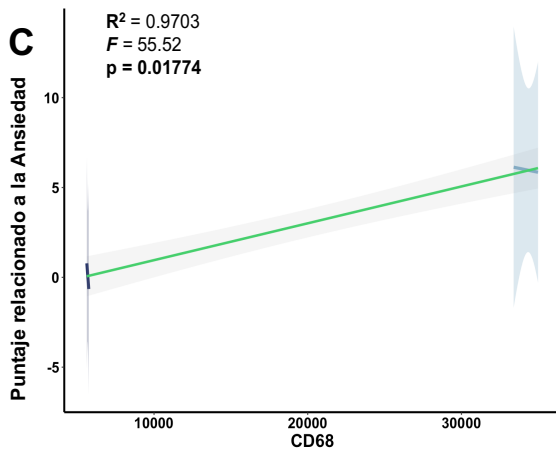
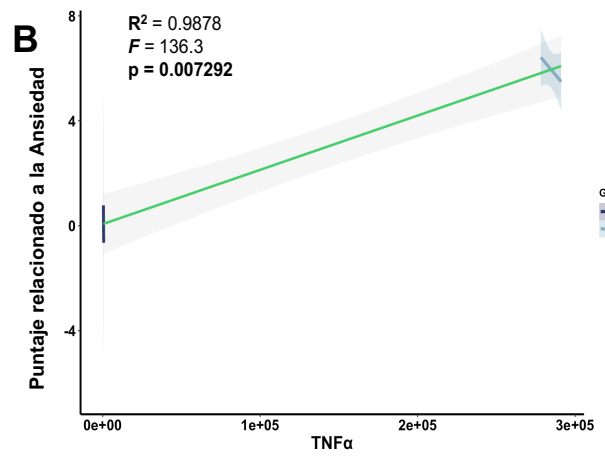
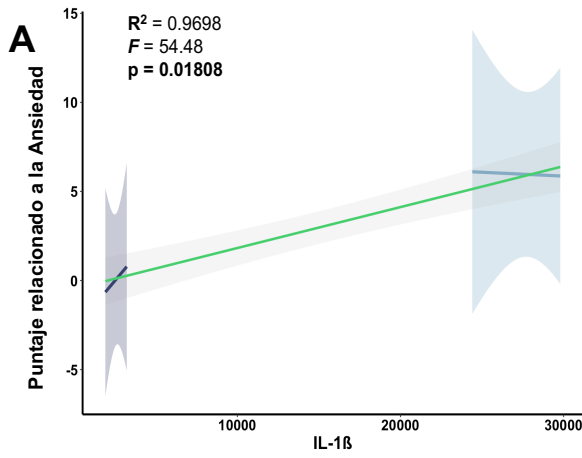


**Figura 18. Número de células microgliales, promedio de sus ramificaciones y promedio de sus uniones por campo.** (A) No se presentó una diferencia significativa en el conteo de las células de la microglía por campo en los cuatro grupos analizados. (B) Los ratones del grupo CER presentaron un decremento significativo en el promedio de ramificaciones y, (C) en el promedio de las uniones por campo, lo que se traduce en una morfología menos ramificada y más ameboide en comparación a los controles. Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis con pos hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Para CON ( $n = 3$ ), SHAM ( $n = 3$ ), VEH ( $n = 3$ ), CER ( $n = 3$ ). Abreviaturas: CON: control; SHAM: sham; VEH: vehículo; CER: ceramidas.

### 8.6. La neuroinflamación, el aumento de la activación de células de la glía y el menor conteo de ramificaciones microgliales se relacionan con el desarrollo de conducta similar a la ansiedad.

Con el objetivo de determinar si existe una relación entre los distintos resultados obtenidos en el proyecto, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal simple (Figura 19). Para explorar la posible asociación entre la conducta ansiosa, los mecanismos de inflamación y la activación microglial, se calcularon los puntajes relacionados a la ansiedad ( $z = \frac{x - \mu}{\sigma}$ ). Los datos del grupo CER fueron normalizados en función de los

valores del grupo VEH, considerado el control más apropiado por su proximidad experimental al tratamiento con la mezcla de ceramidas de cadena larga.



**Figura 19. Gráficos de las regresiones simples realizadas para correlacionar los resultados obtenidos de conducta, inflamación y microglía.** (A y B) Mayores niveles de expresión de los genes relacionados a la inflamación, IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , se relacionan positivamente con el desarrollo de ansiedad. (C y D) Mayores niveles de expresión de los genes relacionados a la activación de la microglía, CD68 y TREM2 inducen una conducta más ansiosa en ratones, niveles más bajos se relacionan con un Score de Ansiedad cercano a 0 en la prueba de laberinto elevado. (E) El incremento de las células de la microglía está correlacionado significativamente con conductas más ansiosas en ratones. (F) Un promedio mayor de ramificaciones de la microglía tiene significativamente puntuaciones más cercanas a 0 en la escala de ansiedad utilizada. Se utilizó un modelo de regresión lineal simple para evaluar la relación entre una variable independiente y una variable dependiente. Se reportaron el coeficiente de regresión, su intervalo de confianza al 95%, el valor de p asociado y el coeficiente de determinación ajustado. ( $p < 0.05$ ). Para VEH (n = 3), CER (n = 3). Abreviaturas: VEH: vehículo; CER: ceramidas.

El análisis de la expresión génica asociada a procesos inflamatorios reveló una correlación positiva entre la sobreexpresión de IL1B y TNF $\alpha$  y los puntajes elevados de conducta ansiosa ( $p = 0.01808$  y  $p = 0.007292$ , respectivamente). En particular, el grupo tratado con ceramidas mostró una mayor puntuación en indicadores de ansiedad, en paralelo con un incremento en la expresión de dichos genes (Figuras 19A y 19B). Desde una perspectiva estadística, TNF $\alpha$  fue el marcador con mayor grado de asociación, al presentar un valor de  $p = 0.007292$ , una F estadística de 136.3 y una  $R^2$  de 0.9878, lo que sugiere una fuerte relación lineal entre su expresión y la manifestación de comportamientos ansiosos. El incremento en la densidad de células gliales en la corteza prefrontal de los ratones también se identificó como un factor relevante en la manifestación de conductas ansiosas (Figura 19E). Específicamente, se observó que el aumento de células gliales, en ausencia de pérdida neuronal evidente, se asoció con puntuaciones más elevadas de ansiedad en el CER, con una significancia estadística de  $p = 0.02029$ .

En lo que respecta a la activación de la microglía, se observó una correlación positiva entre la expresión de los marcadores CD68 y TREM2 (Figuras 19C y 19D) y los puntajes de conducta ansiosa ( $p = 0.01774$  y  $p = 0.1692$ , respectivamente). Al igual que lo observado con los genes proinflamatorios, el grupo CER mostró los niveles más elevados de expresión de genes relacionados con la activación microglial, en paralelo con los valores más altos en la escala de ansiedad, en comparación con el grupo VEH. Estos hallazgos sugieren que la activación microglial podría desempeñar un papel clave en la modulación del comportamiento ansioso inducido por ceramidas.

Complementariamente, el análisis morfológico de la microglía reveló que una menor complejidad estructural, reflejada en una reducción en el número promedio de ramificaciones (Figura 19F), se asocia significativamente con mayores niveles de ansiedad en los modelos murinos ( $p = 0.04453$ ). Este cambio morfológico, característico de una microglía reactiva, refuerza la hipótesis de que la activación glial contribuye al fenotipo ansioso observado tras la administración de ceramidas.

En resumen, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de genes inflamatorios y marcadores de activación microglial, junto con cambios en la densidad y morfología glial en la corteza prefrontal, se asocian estrechamente con el aumento de conductas ansiosas inducidas por la administración de ceramidas de cadena larga.

## 9. Discusión.

Las ceramidas desempeñan funciones fundamentales en la regulación de la homeostasis cerebral, influyendo en procesos como el desarrollo neuronal, la señalización intracelular, la apoptosis y la respuesta inflamatoria (Pan et al., 2024). En el presente estudio, se evaluó el papel de estos lípidos en la conducta relacionada con la ansiedad, observándose que su administración en la corteza prefrontal induce comportamientos ansiosos en ratones, acompañados de neuroinflamación y activación microglial con predominio del fenotipo proinflamatorio M1.

El metabolismo anómalo de ceramidas puede generar disrupciones en la señalización intracelular, estrés oxidativo y activación de mediadores inflamatorios en el sistema nervioso central (Pant et al., 2020). En este contexto, Oliveira et al., (2016) demostraron que el estrés crónico incrementa las concentraciones de Cer16:0, Cer16:1, Cer18:1, Cer22:1 y Cer26:1 en ratas, sin afectar otras especies como Cer18:0, Cer20:0, Cer20:1, Cer22:0, Cer24:0, Cer24:1 o Cer26:0. Este perfil bioquímico se asoció con un fenotipo conductual ansioso. En línea con estos hallazgos, nuestros resultados muestran que la administración directa de ceramidas C22:0, C24:0 y C24:1 en la corteza prefrontal (CPF) de ratones es suficiente para inducir comportamientos ansiosos, evidenciados en el laberinto elevado, el campo abierto y la caja luz-oscuridad (Figura 9), incluso en ausencia de un estímulo estresante sistémico.

La administración basolateral de Cer16:0 ha sido asociada con un aumento del tiempo en los brazos cerrados del laberinto elevado y latencia alimentaria prolongada, indicadores de ansiedad y depresión, respectivamente (Zoicas et al., 2020). De forma coherente, en nuestro modelo, la mezcla de ceramidas de cadena larga inducida en CPF provocó un perfil de ansiedad y depresión (Figuras 6B y 10). Por otro lado, Schumacher et al., (2022) reportaron que el incremento de ceramidas C22:0, C24:0 y C24:1 en combinación con glucocorticosterona aumenta el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, un marcador conductual de depresión. Estos datos respaldan la noción de que distintas especies de ceramidas, en condiciones de estrés, pueden contribuir a estados afectivos negativos.

La hiperactividad del eje HPA ha sido vinculada a ansiedad y depresión comórbida (Zoicas et al., 2023). Por su parte, Sambolín-Escobales et al., (2022) demostraron que dietas ricas en lípidos aumentan Cer18:0 y Cer24:0, lo que se relaciona con anhedonia e inmovilidad en el campo abierto. A diferencia de lo anterior, en nuestro modelo no se observó una alteración locomotora general (Figura 7B), pero sí una clara evitación del centro, típica de ansiedad (Figura 7C).

Estudios previos utilizando inhibidores de CerS han identificado efectos diferenciales de cada especie de ceramida. Por ejemplo, Ebel et al., (2013) reportaron que solo el aumento de Cer16:0, pero no de Cer18:0, Cer22:0, Cer24:0 ni Cer24:1, reduce la distancia recorrida en la prueba de campo abierto, lo que indica una alteración locomotora. En contraste, en nuestros experimentos, la administración de ceramidas no afectó la locomoción (Figuras 7A y 7B), pero sí incrementó la conducta de evitación del centro del campo (Figura 7C), hallazgo que concuerda con lo reportado por Schumacher et al. (2022).

Interesantemente Oliveira et al., (2016) encontraron que la disminución de esfingomielinas (SM) con ácidos grasos de C16:0 a C24:0 y C26:1, así como de dihidroesfingomielinas (dhSM) desde C16:0 hasta C26:0, incluidas las especies insaturadas como C16:1–C26:1 y la C26:2, en la CPF de ratones, se correlaciona con conductas ansiosas. Este hallazgo contrasta con nuestros resultados, donde fue el aumento de ceramidas en dicha región, y no su disminución, el que promovió dicho comportamiento.

En pacientes con diagnóstico de depresión mayor comórbida con ansiedad, se ha detectado un aumento en los niveles plasmáticos de Cer16:0, Cer18:0, Cer20:0, Cer22:0, Cer24:0 y Cer24:1 (Brunkhorst-Kanaan et al., 2019), un perfil también observado en modelos murinos sometidos a estrés crónico. En dichos modelos, las pruebas conductuales muestran una reducción del tiempo en la zona iluminada de la caja luz-oscuridad y del tiempo en el centro del campo abierto (Schumacher et al., 2022),

hallazgos que son consistentes con los resultados obtenidos en nuestro estudio (Figuras 8C y 7C,D). Además, el uso de fingolimod, un modulador de la vía S1P, ha demostrado efectos ansiolíticos al reducir los niveles cerebrales de ceramidas (Hait et al., 2014), lo que posiciona a estas moléculas como potenciales blancos terapéuticos.

Las ceramidas también están implicadas en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, donde su acumulación se asocia con la generación de  $\beta$ -amiloide, la hiperfosforilación de tau, la resistencia a la insulina y un entorno neuroinflamatorio crónico (Chowdhury et al., 2022). A nivel celular, el bloqueo de la esfingomielinasa neutra en astrocitos reduce significativamente los niveles de ceramidas y de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Gu et al., 2013). Esta observación es congruente con nuestros hallazgos, donde el aumento de ceramidas en células gliales promovió un perfil proinflamatorio marcado (Figura 11).

En cuanto al papel específico de diferentes especies de ceramidas, se ha reportado que las de cadena corta, como la C8:0, pueden modular negativamente la expresión de TNF- $\alpha$  vía la inhibición de NF- $\kappa$ B, un efecto no observado con especies de cadena larga (Li et al., 2024). Asimismo, la ceramida C2 ha mostrado propiedades antiinflamatorias, disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno y favoreciendo la activación de PKA, incluso en contextos de estimulación inflamatoria con LPS (Jung et al., 2013).

No obstante, otras rutas metabólicas derivadas de ceramidas también favorecen la inflamación. Por ejemplo, la inhibición de esfingosina quinasa 1 (SK1) en microglía activada reduce significativamente la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y iNOS, subrayando el papel regulador de los esfingolípidos en la neuroinflamación (Assi et al., 2013). De forma paralela, metabolitos como esfingosina-1-fosfato y  $\beta$ -glucosilceramida promueven la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en microglía cortical, reforzando su rol como mediadores del estado inflamatorio cerebral. Esto es congruente con lo observado en el proyecto (Figura 11).

En términos conductuales, múltiples estudios han vinculado la inflamación cerebral con la aparición de fenotipos ansiosos. En modelos genéticos, la delección de IL-6 aumenta significativamente la exploración del centro en la prueba de campo abierto, lo cual se asocia con disminución de ansiedad (Niraula et al., 2019), y que el bloqueo farmacológico del receptor de IL-1 $\beta$  reduce la ansiedad en pruebas como el laberinto elevado y la caja luz-oscuridad (Koo & Duman, 2009). Estos efectos presentan similitud con nuestros resultados, donde se observó una asociación entre mayor expresión de IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$  y mayor puntuación ansiosa (Figuras 19A y 19B).

El papel de IL-1 $\beta$  ha sido particularmente destacado en el desarrollo de conductas ansiosas. La administración intracerebroventricular induce ansiedad y reduce la sensibilidad de los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1R) implicados en la regulación de la neurotransmisión GABAérgica en el cuerpo estriado. Estos efectos son comparables a los observados tras el estrés por derrota social, y en ambos casos se revierten mediante antagonistas del receptor de IL-1 (Rossi et al., 2012). IL1B al igual que TNFa solo presentaron un aumento significativo en el grupo administrado con las ceramidas en comparación a los controles (Figuras 11A, B).

En modelos murinos de obesidad severa, donde la inflamación sistémica y cerebral es prominente, la reducción de TNF- $\alpha$  hipocampal mediante restricción calórica, ibuprofeno o infusión central de etanercept, resulta en una mejora significativa de la conducta ansiosa (Fourrier et al., 2019). A nivel tisular, está ampliamente demostrado que las ceramidas contribuyen de manera significativa al daño del tejido cerebral. La acumulación de ceramidas en astrocitos provoca una alteración notable en la arquitectura neuronal, lo que a su vez genera un reclutamiento de células gliales, fenómeno que coincide con los hallazgos observados en nuestro estudio (Figuras 12, 13 y 14). Este efecto disruptivo sugiere la generación de un microambiente inflamatorio caracterizado por una respuesta glial reactiva. Sin embargo, la inhibición de la esfingomielinasa neutra, enzima clave en la biosíntesis de ceramidas, revierte este fenotipo inflamatorio, evidenciándose una distribución celular más homogénea y una menor densidad glial en las tinciones H&E y Nissl (Gu et al., 2013). Esta restauración de

la morfología celular es congruente con los resultados observados en los grupos control CON, SHAM y VEH (Figuras 12A,B,C; 14A,B,C), lo que reafirma la implicación directa de la vía de ceramidas en la inflamación y el daño tisular.

La esquizofrenia, caracterizada por una alta comorbilidad con trastornos ansiosos, también parece estar vinculada a alteraciones en el metabolismo de ceramidas. La administración intracerebroventricular del agonista de ceramida daunorrubicina (DNR) induce una acumulación predominante de ceramidas en el hipocampo, acompañada de un comportamiento ansioso, así como de disfunciones en el aprendizaje y la memoria. Este fenómeno se asoció con un incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias y una notable acumulación de neuronas afectadas, evidenciada por la tinción de Nissl. Posteriormente, tras la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, se observó una reducción significativa de las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , junto con una mejor distribución celular y una disminución en la proliferación de células gliales reactivas (Ling et al., 2019). La proliferación de células de la glía con relación a la inflamación también se reportó en nuestros resultados (Figuras 15B,D), en donde, la administración de ceramidas conduce a un aumento de las células gliales por campo y se correlaciona con el desarrollo de conductas ansiosas (Figura 19E). Dado que las ceramidas pueden activar directamente la vía NF- $\kappa$ B (Gill & Windebank, 2000), se infiere que esta ruta molecular actúa como mediadora clave del daño inflamatorio observado en el grupo tratado con ceramidas (Figuras 12D y 14D).

Por otro lado, la esclerosis múltiple (EM) es un claro ejemplo de patología neuroinflamatoria en la que se han descrito infiltrados celulares similares a los presentes en nuestro modelo con acumulación de ceramidas (Figuras 12D, 13D y 14D). En modelos experimentales de EM, las células gliales han sido identificadas como las principales productoras de ceramidas durante los estados inflamatorios, con una concomitante sobreexpresión de TNF- $\alpha$ . El tratamiento con fingolimod, un modulador inmunológico, logró reducir la densidad de infiltrados celulares, caracterizados por núcleos hiper cromáticos y mayor densidad, además de disminuir los niveles de TNF- $\alpha$  y normalizar la concentración de ceramidas, acercándolos a valores similares a los

controles (van Doorn et al., 2012). Estos hallazgos respaldan la idea de que la acumulación persistente de ceramidas en regiones cerebrales como la CPF puede inducir un proceso inflamatorio reactivo caracterizado por infiltrados celulares, tal como lo evidencian nuestros resultados (Figuras 12D, 13D y 14D).

La microgliosis desempeña un papel central en el establecimiento y la progresión de procesos inflamatorios en el sistema nervioso central, participando activamente en la respuesta inmune ante alteraciones del microambiente cerebral (Shao et al., 2022). En este contexto, el receptor TREM2 ha sido ampliamente reconocido como un modulador negativo de la inflamación, así como un componente esencial en la neuroprotección (Jiang et al., 2014). Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones, al evidenciar que la administración de ceramidas conlleva un aumento más pronunciado de CD68, un marcador de activación microglial, y una menor expresión de TREM2 (Figura 15), lo cual sugiere una menor capacidad reguladora de la microglía frente a la inflamación inducida por ceramidas. Sin embargo, la función de TREM2 en el control de la inflamación es compleja y dependiente del contexto. Por ejemplo, se ha documentado que la delección homocigota de TREM2 en ratones conduce a una reducción de la microgliosis y una disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el hipocampo, pero no en la corteza prefrontal (Leyns et al., 2017), lo que indica una respuesta heterogénea dependiente de la región cerebral. Asimismo, (Zhu et al., 2022) reportaron que en modelos transgénicos, la pérdida de TREM2 altera negativamente la expresión de genes asociados a microglía reactiva, como CD68 y Lys2, lo que refuerza la idea de una estrecha relación funcional entre TREM2 y CD68 en la regulación de la respuesta inflamatoria.

En línea con estos hallazgos, en nuestros resultados se observa que una menor proporción relativa de TREM2 con respecto a CD68, como ocurre en el CER, está asociada con una mayor activación microglial proinflamatoria (Figura 15). Además, ambos marcadores se correlacionan con mayores puntajes en la escala de ansiedad (Figuras 19C y 19D), lo que sugiere un vínculo entre la inflamación inducida por microglía y alteraciones comportamentales.

CD68, específicamente, se convierte en un marcador prominente de enfermedad en condiciones de inflamación crónica, al localizarse predominantemente en los lisosomas de microglía activada. En contraste con otros resultados, se ha reportado que ciertas mutaciones de TREM2 reducen la expresión de CD68 y resultan en una menor inflamación (Filipello et al., 2023), lo que evidencia una posible regulación positiva entre ambos marcadores. Esta relación también es evidente en nuestros datos (Figura 15), donde tanto niveles elevados como reducidos de TREM2 y CD68 parecen asociarse con estados inflamatorios, lo que sugiere que un equilibrio fino entre ambas moléculas es clave para una respuesta microglial controlada.

Por otro lado, se ha descrito que la deficiencia de TREM2 puede conducir a una activación exacerbada de la microglía, manifestada por el aumento conjunto de Iba1 y CD68 (You et al., 2023). No obstante, en nuestro estudio, aunque la administración de ceramidas incrementó significativamente los niveles de ARNm de CD68, el conteo de células microgliales por campo (Figura 18A) se mantuvo relativamente constante entre los grupos, con solo una ligera tendencia al alza en los animales sometidos a procedimientos quirúrgicos. Esta aparente discrepancia sugiere que el aumento en la expresión de CD68 no refleja necesariamente un incremento en el número de células microgliales, sino más bien un estado de activación funcional.

Cabe destacar que, mientras la sobreexpresión de TREM2 ha demostrado ser eficaz para mitigar la inflamación inducida por microglía en modelos de envejecimiento y enfermedad de Alzheimer, dicha sobreexpresión no se acompaña de un aumento en CD68, lo cual indica que TREM2 puede ejercer efectos antiinflamatorios de manera independiente a este marcador (Xu et al., 2024). Además, la activación microglial parece estar estrechamente vinculada con la activación de astrocitos A1, un subtipo con alta capacidad proliferativa y funciones inflamatorias. En este sentido, el aumento observado en células gliales (Figuras 15B y 15D), pero no específicamente en microglía (Figura 18A), sugiere que la activación microglial podría estar promoviendo la reactividad astrocítica, contribuyendo así al entorno inflamatorio general.

Tras una lesión cerebral o daño tisular asociado a infiltrados celulares, la microglía adopta una morfología ameboide, caracterizada por un soma agrandado y procesos retraídos, lo cual se asocia con un fenotipo proinflamatorio (Caplan et al., 2020). Este hallazgo coincide con lo observado en el grupo CER, donde se evidenció una mayor señal de microglía con morfología ameboide (Figura 17) y una disminución significativa en el número de ramificaciones y puntos de intersección (Figura 18B, C), lo que sugiere un estado de activación. Estudios recientes han reportado que la actividad de las ceramidas sintetasas CerS2, CerS4, CerS5 y CerS6, enzimas responsables de la síntesis de ceramidas de cadena larga, es significativamente mayor en microglía que en astrocitos o neuronas (McInnis et al., 2024). Esto sugiere que, en condiciones inflamatorias, la microglía es una fuente clave de ceramidas. Nuestros resultados respaldan esta hipótesis, ya que el aumento de ceramidas se asoció con la transición de un fenotipo microglial ramificado tipo M2 hacia uno más retraído, característico del fenotipo M1 inflamatorio (Figura 17). Esta transformación estructural ha sido previamente descrita como característica de la microglía activada en contextos de inflamación (Hanisch & Kettenmann, 2007).

Asimismo, en pacientes con esclerosis múltiple, se ha descrito una abundante presencia de microglía ameboide en regiones con inflamación activa, acompañada por alta expresión de CD68 y células infiltrantes (Zrzavy et al., 2017). Esta triada, morfología ameboide, sobreexpresión de CD68 y presencia de infiltrados, también se observó en nuestro modelo experimental (Figuras 14D, 16B y 17D), lo que refuerza la asociación entre ceramidas, activación microglial e inflamación. Por su parte, se ha demostrado que el estrés agudo, como el inducido por restricción, provoca activación microglial en la amígdala central, asociada a cambios morfológicos hacia una forma ameboide y liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , las cuales influyen en la actividad neuronal y favorecen la aparición de conductas ansiosas (Chen et al., 2024). De forma complementaria, la exposición a estrés crónico leve también induce estados de ansiedad y depresión en modelos murinos, acompañados de activación microglial en

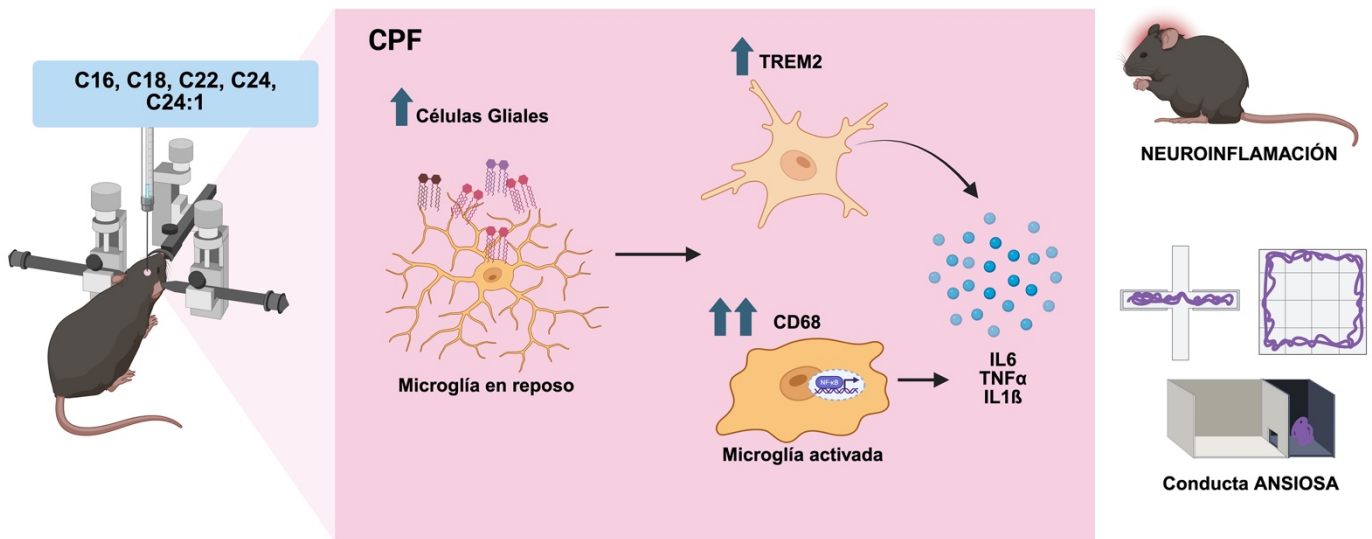
el hipocampo, lo que subraya su rol en la modulación de estados afectivos (Y.-L. Wang et al., 2018).

En conjunto, la literatura y nuestros hallazgos sugieren que las ceramidas no solo desencadenan inflamación cerebral a través de la sobreexpresión de citocinas, sino que también promueven el remodelado morfológico microglial hacia un fenotipo ameboide proinflamatorio, estrechamente vinculado al comportamiento ansioso (Figura 19).

## 10. Conclusiones.

La administración de una mezcla de ceramidas de cadena larga (C16, C18, C22, C24 y C24:1) en la corteza prefrontal de ratones provoca una respuesta neuroinflamatoria robusta, caracterizada por el reclutamiento glial, infiltrados celulares y la sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esta inflamación se acompaña de un cambio fenotípico de microglial hacia un perfil M1 proinflamatorio, evidenciado por el aumento de CD68 y la reducción de la expresión relativa de TREM2, lo que sugiere una pérdida del control homeostático de la respuesta inmune cerebral.

Este estado neuroinflamatorio se correlaciona positivamente con la aparición de conductas similares a la ansiedad, evidenciadas en distintas pruebas conductuales. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las ceramidas de cadena larga participan activamente en la desregulación neuroinmune de la CPF y podrían contribuir a la fisiopatología de trastornos afectivos vinculados a inflamación, como la ansiedad y la depresión.



## 11. Perpespectivas.

A partir de los hallazgos obtenidos en este estudio, se abren diversas líneas de investigación que permitirán profundizar en los mecanismos neurobiológicos mediados por ceramidas y su implicación en trastornos psiquiátricos y neurológicos:

- 1. Análisis región-específico del cerebro:** Dado que la corteza prefrontal es solo una de las múltiples regiones implicadas en la regulación emocional, será fundamental evaluar el efecto de la mezcla de ceramidas en otras áreas relacionadas con la memoria del miedo y la ansiedad, como la amígdala y el hipocampo. Esto permitirá delinear los circuitos neuronales específicos afectados por la acumulación de ceramidas y comprender mejor su papel en la modulación del comportamiento emocional.
- 2. Evaluación individual de las ceramidas componentes:** Aunque el presente estudio empleó una mezcla de ceramidas de cadena larga (C16, C18, C22, C24, C24:1), la evaluación individual de cada una permitirá identificar aquellas con mayor potencia proinflamatoria o con efectos específicos sobre la microglía y la conducta. Esta estrategia facilitará la identificación de ceramidas particularmente patogénicas, así como el análisis de posibles interacciones sinérgicas entre ellas.
- 3. Correlación con datos clínicos en pacientes psiquiátricos:** Es relevante comparar los perfiles lipídicos y las concentraciones de citocinas proinflamatorias observadas en este modelo murino con datos clínicos obtenidos de pacientes con trastornos psiquiátricos. Establecer paralelismos entre modelos animales y perfiles moleculares humanos fortalecerá la validez traslacional del modelo y permitirá identificar biomarcadores potencialmente clínicos.
- 4. Evaluación de otras poblaciones gliales:** Además del papel central de la microglía, será importante explorar cómo otras células gliales, como los astrocitos y los oligodendrocitos, responden ante ambientes inflamatorios inducidos por ceramidas. Esto incluirá el análisis de marcadores astrocitarios reactivos y de

mielinización, con el objetivo de determinar su posible participación en el deterioro funcional y conductual observado.

5. **Estudio del daño mitocondrial:** Las ceramidas han sido asociadas con disfunción mitocondrial en diversos contextos patológicos. Por tanto, resulta prioritario investigar si su administración en el cerebro induce daño mitocondrial en células gliales y neuronales, afectando parámetros como la bioenergética, la producción de ROS y la integridad de la membrana mitocondrial.
  
6. **Exploración del papel de las ceramidas en otros trastornos neuropsiquiátricos:** Más allá de su implicación en la ansiedad, resulta crucial investigar si las ceramidas de cadena larga también participan en la fisiopatología de otros trastornos neuropsiquiátricos con un componente inflamatorio prominente, como la depresión mayor, el trastorno bipolar y la esquizofrenia. Estos padecimientos comparten alteraciones en la inmunorreactividad cerebral, disfunción glial y desregulación del eje lípido-inflamación. El estudio de estos mecanismos podría permitir proponer a las ceramidas de cadena larga como biomarcadores diagnósticos o incluso como blancos terapéuticos en estas enfermedades.

## 12. Literatura citada.

- Afridi, R., Rahman, M. H., & Suk, K. (2022). Implications of glial metabolic dysregulation in the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, *174*, 105874. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105874>
- Alexaki, V. I. (2021). The Impact of Obesity on Microglial Function: Immune, Metabolic and Endocrine Perspectives. *Cells*, *10*(7), 1584. <https://doi.org/10.3390/cells10071584>
- Alonso, A., & Goñi, F. M. (2018). The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annual Review of Biophysics*, *47*, 633–654. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033309>
- Arsenault, E. J., McGill, C. M., & Barth, B. M. (2021). Sphingolipids as Regulators of Neuro-Inflammation and NADPH Oxidase 2. *Neuromolecular Medicine*, *23*(1), 25–46. <https://doi.org/10.1007/s12017-021-08646-2>
- Assi, E., Cazzato, D., De Palma, C., Perrotta, C., Clementi, E., & Cervia, D. (2013). Sphingolipids and Brain Resident Macrophages in Neuroinflammation: An Emerging Aspect of Nervous System Pathology. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*, 309302. <https://doi.org/10.1155/2013/309302>
- Bangasser, D. A., & Cuarenta, A. (2021). Sex differences in anxiety and depression: Circuits and mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, *22*(11), 674–684. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00513-0>
- Bernal-Vega, S., García-Juárez, M., & Camacho-Morales, A. (2023). Contribution of ceramides metabolism in psychiatric disorders. *Journal of Neurochemistry*, *164*(6), 708–724. <https://doi.org/10.1111/jnc.15759>
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1–3), 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01274-3)

- Brachtendorf, S., El-Hindi, K., & Grösch, S. (2019). Ceramide synthases in cancer therapy and chemoresistance. *Progress in Lipid Research*, 74, 160–185. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.04.002>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: Rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Brunkhorst-Kanaan, N., Klatt-Schreiner, K., Hackel, J., Schröter, K., Trautmann, S., Hahnefeld, L., Wicker, S., Reif, A., Thomas, D., Geisslinger, G., Kittel-Schneider, S., & Tegeder, I. (2019). Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 95, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.04.002>
- Buccoliero, R., & Futerman, A. H. (2003). The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacological Research*, 47(5), 409–419. [https://doi.org/10.1016/s1043-6618\(03\)00049-5](https://doi.org/10.1016/s1043-6618(03)00049-5)
- Cai, L., Oyeniran, C., Biswas, D. D., Allegood, J., Milstien, S., Kordula, T., Maceyka, M., & Spiegel, S. (2016). ORMDL proteins regulate ceramide levels during sterile inflammation. *Journal of Lipid Research*, 57(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1194/jlr.M065920>
- Canals, I., Ginisty, A., Quist, E., Timmerman, R., Fritze, J., Miskinyte, G., Monni, E., Hansen, M. G., Hidalgo, I., Bryder, D., Bengzon, J., & Ahlenius, H. (2018). Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nature Methods*, 15(9), 693–696. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0103-2>
- Caplan, H. W., Cardenas, F., Gudenkauf, F., Zelnick, P., Xue, H., Cox, C. S., & Bedi, S. S. (2020). Spatiotemporal Distribution of Microglia After Traumatic Brain Injury in Male Mice. *ASN NEURO*, 12, 1759091420911770. <https://doi.org/10.1177/1759091420911770>
- Carr, S. T., Saito, E. R., Walton, C. M., Saito, J. Y., Hanegan, C. M., Warren, C. E., Trumbull, A. M., & Bikman, B. T. (2023). Ceramides Mediate Insulin-Induced Impairments in Cerebral

- Mitochondrial Bioenergetics in ApoE4 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 16635. <https://doi.org/10.3390/ijms242316635>
- Chaurasia, B., Tippetts, T. S., Mayoral Monibas, R., Liu, J., Li, Y., Wang, L., Wilkerson, J. L., Sweeney, C. R., Pereira, R. F., Sumida, D. H., Maschek, J. A., Cox, J. E., Kaddai, V., Lancaster, G. I., Siddique, M. M., Poss, A., Pearson, M., Satapati, S., Zhou, H., ... Summers, S. A. (2019). Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6451), 386–392. <https://doi.org/10.1126/science.aav3722>
- Chen, D., Lou, Q., Song, X.-J., Kang, F., Liu, A., Zheng, C., Li, Y., Wang, D., Qun, S., Zhang, Z., Cao, P., & Jin, Y. (2024). Microglia govern the extinction of acute stress-induced anxiety-like behaviors in male mice. *Nature Communications*, 15(1), 449. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44704-6>
- Chowdhury, M. R., Jin, H. K., & Bae, J. (2022). Diverse Roles of Ceramide in the Progression and Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biomedicines*, 10(8), 1956. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081956>
- Crivelli, S. M., Quadri, Z., Elsherbini, A., Vekaria, H. J., Sullivan, P. G., Zhi, W., Martinez-Martinez, P., Spassieva, S. D., & Bieberich, E. (2024). Abnormal Regulation of Mitochondrial Sphingolipids during Aging and Alzheimer's Disease. *ASN Neuro*, 16(1), 2404367. <https://doi.org/10.1080/17590914.2024.2404367>
- Cruciani-Guglielmacci, C., López, M., Campana, M., & le Stunff, H. (2017). Brain Ceramide Metabolism in the Control of Energy Balance. *Frontiers in Physiology*, 8, 787. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00787>
- Custers, Emma, E. M., Kiliaan, & Amanda, J. (2022). Dietary lipids from body to brain. *Progress in Lipid Research*, 85, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101144>
- de la Monte, S. M., Re, E., Longato, L., & Tong, M. (2012). Dysfunctional pro-ceramide, ER stress, and insulin/IGF signaling networks with progression of Alzheimer's disease. *Journal of*

- Alzheimer's Disease: JAD*, 30 Suppl 2(0 2), S217-229. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111728>
- de Wit, N. M., den Hoedt, S., Martinez-Martinez, P., Rozemuller, A. J., Mulder, M. T., & de Vries, H. E. (2019). Astrocytic ceramide as possible indicator of neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1436-1>
- Dent, E. W., & Gertler, F. B. (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40(2), 209–227. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00633-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00633-0)
- Ding, J., Wu, Y., Li, H., Wang, S., Cai, J., Cheng, H., & Liang, S. (2024). Using Network Analysis to Subgroup Risk Factors for Depressive Symptoms in College Students. *Psychology Research and Behavior Management*, 17, 3625–3636. <https://doi.org/10.2147/PRBM.S479975>
- DiPasquale, M., Deering, T. G., Desai, D., Sharma, A. K., Amin, S., Fox, T. E., Kester, M., Katsaras, J., Marquardt, D., & Heberle, F. A. (2022). Influence of ceramide on lipid domain stability studied with small-angle neutron scattering: The role of acyl chain length and unsaturation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 245, 105205. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105205>
- Duffy, C. M., Yuan, C., Wisdorf, L. E., Billington, C. J., Kotz, C. M., Nixon, J. P., & Butterick, T. A. (2015). Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neuroscience Letters*, 606, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.033>
- Duval, E. R., Javanbakht, A., & Liberzon, I. (2015). Neural circuits in anxiety and stress disorders: A focused review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11, 115–126. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S48528>
- Ebel, P., vom Dorp, K., Petrasch-Parwez, E., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Minich, D., Ginkel, C., Welcker, J., Degen, J., Eckhardt, M., Dere, E., Dörmann, P., & Willecke, K. (2013). Inactivation of Ceramide Synthase 6 in Mice Results in an Altered Sphingolipid

- Metabolism and Behavioral Abnormalities. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21433–21447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479907>
- Farsi, Z., Nicoletta, A., Simmons, S. K., Aryal, S., Shepard, N., Brenner, K., Lin, S., Herzog, L., Moran, S. P., Stalnaker, K. J., Shin, W., Gazestani, V., Song, B. J., Bonanno, K., Keshishian, H., Carr, S. A., Pan, J. Q., Macosko, E. Z., Datta, S. R., ... Sheng, M. (2023). Brain-region-specific changes in neurons and glia and dysregulation of dopamine signaling in *Grin2a* mutant mice. *Neuron*, 111(21), 3378-3396.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.08.004>
- Filipello, F., You, S.-F., Mirfakhar, F. S., Mahali, S., Bollman, B., Acquarone, M., Korvatska, O., Marsh, J. A., Sivaraman, A., Martinez, R., Cantoni, C., De Feo, L., Ghezzi, L., Minaya, M. A., Renganathan, A., Cashikar, A. G., Satoh, J.-I., Beatty, W., Iyer, A. K., ... Karch, C. M. (2023). Defects in lysosomal function and lipid metabolism in human microglia harboring a TREM2 loss of function mutation. *Acta Neuropathologica*, 145(6), 749–772. <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02568-y>
- Fornari, R. V., Wichmann, R., Atsak, P., Atucha, E., Barsegyan, A., Beldjoud, H., Messanvi, F., Thuring, C. M. A., & Roozendaal, B. (2012). Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 59, e3528. <https://doi.org/10.3791/3528>
- Fourrier, C., Bosch-Bouju, C., Boursereau, R., Sauvant, J., Aubert, A., Capuron, L., Ferreira, G., Layé, S., & Castanon, N. (2019). Brain tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates anxiety-like behavior in a mouse model of severe obesity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 77, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.316>
- Gangoiti, P., Granado, M. H., Wang, S. W., Kong, J. Y., Steinbrecher, U. P., & Gómez-Muñoz, A. (2008). Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cellular Signalling*, 20(4), 726–736. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.008>

- García-González, V., Díaz-Villanueva, J. F., Galindo-Hernández, O., Martínez-Navarro, I., Hurtado-Ureta, G., & Pérez-Arias, A. A. (2018). Ceramide Metabolism Balance, a Multifaceted Factor in Critical Steps of Breast Cancer Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2527. <https://doi.org/10.3390/ijms19092527>
- García-Ruiz, C., Colell, A., Marí, M., Morales, A., & Fernández-Checa, J. C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11369–11377. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11369>
- Ghasemi, M., Navidhamidi, M., Rezaei, F., Azizikia, A., & Mehranfard, N. (2022). Anxiety and hippocampal neuronal activity: Relationship and potential mechanisms. *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*, 22(3), 431–449. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00973-y>
- Gill, J. S., & Windebank, A. J. (2000). Ceramide initiates NFkappaB-mediated caspase activation in neuronal apoptosis. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 448–461. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0312>
- Giovannoni, F., & Quintana, F. J. (2020). The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends in Immunology*, 41(9), 805–819. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.007>
- Gómez-Muñoz, A. (2006). Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1758(12), 2049–2056. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.011>
- Grenier, S., Payette, M.-C., Gunther, B., Askari, S., Desjardins, F. F., Raymond, B., & Berbiche, D. (2019). Association of age and gender with anxiety disorders in older adults: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 34(3), 397–407. <https://doi.org/10.1002/gps.5035>

- Grösch, S., Schiffmann, S., & Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>
- Gu, L., Huang, B., Shen, W., Gao, L., Ding, Z., Wu, H., & Guo, J. (2013). Early activation of nSMase2/ceramide pathway in astrocytes is involved in ischemia-associated neuronal damage via inflammation in rat hippocampi. *Journal of Neuroinflammation*, 10, 109. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-109>
- Hait, N. C., Wise, L. E., Allegood, J. C., O'Brien, M., Avni, D., Reeves, T. M., Knapp, P. E., Lu, J., Luo, C., Miles, M. F., Milstien, S., Lichtman, A. H., & Spiegel, S. (2014). Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nature Neuroscience*, 17(7), 971–980. <https://doi.org/10.1038/nn.3728>
- Hammerschmidt, P., & Brüning, J. C. (2022). Contribution of specific ceramides to obesity-associated metabolic diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 79(8), 395. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04401-3>
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hek, K., Direk, N., Newson, R. S., Hofman, A., Hoogendijk, W. J. G., Mulder, C. L., & Tiemeier, H. (2013). Anxiety disorders and salivary cortisol levels in older adults: A population-based study. *Psychoneuroendocrinology*, 38(2), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.06.006>
- Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>

- Ho, Q. W. C., Zheng, X., & Ali, Y. (2022). Ceramide Acyl Chain Length and Its Relevance to Intracellular Lipid Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9697. <https://doi.org/10.3390/ijms23179697>
- Horenstein, A., & Heimberg, R. G. (2020). Anxiety disorders and healthcare utilization: A systematic review. *Clinical Psychology Review*, 81, 101894. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2020.101894>
- Irle, E., Ruhleder, M., Lange, C., Seidler-Brandler, U., Salzer, S., Dechent, P., Weniger, G., Leibing, E., & Leichsenring, F. (2010). Reduced amygdalar and hippocampal size in adults with generalized social phobia. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 35(2), 126–131. <https://doi.org/10.1503/jpn.090041>
- Jana, A., Hogan, E. L., & Pahan, K. (2009). Ceramide and neurodegeneration: Susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of the Neurological Sciences*, 278(1–2), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.12.010>
- Ji, J. E., Kim, S. K., Ahn, K. H., Choi, J. M., Jung, S. Y., Jung, K. M., Jeon, H. J., & Kim, D. K. (2011). Ceramide induces serotonin release from RBL-2H3 mast cells through calcium mediated activation of phospholipase A2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 94(3–4), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2011.01.001>
- Jiang, S., Xia, R., Jiang, Y., Wang, L., & Gao, F. (2014). Vascular Endothelial Growth Factors Enhance the Permeability of the Mouse Blood-brain Barrier. *PLoS ONE*, 9(2), e86407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086407>
- Jung, J.-S., Shin, K.-O., Lee, Y.-M., Shin, J. A., Park, E.-M., Jeong, J., Kim, D.-H., Choi, J. W., & Kim, H.-S. (2013). Anti-inflammatory mechanism of exogenous C2 ceramide in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1831(6), 1016–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.01.020>

- Juruena, M. F., Eror, F., Cleare, A. J., & Young, A. H. (2020). The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1191, 141–153. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_9)
- Justice, M. J., Bronova, I., Schweitzer, K. S., Poirier, C., Blum, J. S., Berdyshev, E. V., & Petrache, I. (2018). Inhibition of acid sphingomyelinase disrupts LYNUS signaling and triggers autophagy. *Journal of Lipid Research*, 59(4), 596–606. <https://doi.org/10.1194/jlr.M080242>
- Kennedy, M. A., Moffat, T. C., Gable, K., Ganesan, S., Niewola-Staszewska, K., Johnston, A., Nislow, C., Giaever, G., Harris, L. J., Loewith, R., Zarembek, V., Harper, M.-E., Dunn, T., Bennett, S. A. L., & Baetz, K. (2016). A Signaling Lipid Associated with Alzheimer's Disease Promotes Mitochondrial Dysfunction. *Scientific Reports*, 6, 19332. <https://doi.org/10.1038/srep19332>
- Kenwood, M. M., Kalin, N. H., & Barbas, H. (2022). The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), 260–275. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01109-z>
- Kihara, A. (2016). Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Research*, 63, 50–69. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.04.001>
- Kim, S., Steelman, A. J., Zhang, Y., Kinney, H. C., & Li, J. (2012). Aberrant Upregulation of Astroglial Ceramide Potentiates Oligodendrocyte Injury. *Brain Pathology*, 22(1), 41–57. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2011.00501.x>
- Kirouac, G. J. (2021). The Paraventricular Nucleus of the Thalamus as an Integrating and Relay Node in the Brain Anxiety Network. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 627633. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.627633>

- Koo, J. W., & Duman, R. S. (2009). Interleukin-1 receptor null mutant mice show decreased anxiety-like behavior and enhanced fear memory. *Neuroscience Letters*, 456(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.068>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019a). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 69–74. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4)
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019b). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 99–103. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9)
- Kupfer, D. J. (2015). Anxiety and DSM-5. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 245–246. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/dkupfer>
- Lee, J. K., Jin, H. K., Park, M. H., Kim, B., Lee, P. H., Nakauchi, H., Carter, J. E., He, X., Schuchman, E. H., & Bae, J. (2014). Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1551–1570. <https://doi.org/10.1084/jem.20132451>
- Lee, J. Y., Jin, H. K., & Bae, J. (2020). Sphingolipids in neuroinflammation: A potential target for diagnosis and therapy. *BMB Reports*, 53(1), 28–34. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.1.278>
- Lei, W., Zhuang, H., Huang, W., & Sun, J. (2025). Neuroinflammation and energy metabolism: A dual perspective on ischemic stroke. *Journal of Translational Medicine*, 23(1), 413. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06440-3>
- Levy, M., & Futerman, A. H. (2010). Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*, 62(5), 347–356. <https://doi.org/10.1002/iub.319>
- Leyns, C. E. G., Ulrich, J. D., Finn, M. B., Stewart, F. R., Koscal, L. J., Remolina Serrano, J., Robinson, G. O., Anderson, E., Colonna, M., & Holtzman, D. M. (2017). TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model

- of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(43), 11524–11529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710311114>
- Li, G., Wang, Y., Qian, L., Li, D., Yao, Y., Pan, J., & Fan, D. (2024). C8-ceramide modulates microglia BDNF expression to alleviate postoperative cognition dysfunction via PKC $\delta$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Experimental Brain Research*, 242(7), 1543–1559. <https://doi.org/10.1007/s00221-024-06847-2>
- Ling, W.-M., Chen, M.-C., Zhang, Y.-C., Ou, M.-M., & Gu, L.-Z. (2019). Study on ceramide modulates EAAT-2 participation in the immunoinflammatory response in schizophrenia. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(5), 2263–2272. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201903\\_17275](https://doi.org/10.26355/eurev_201903_17275)
- Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108(4), 608–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>
- McInnis, J. J., Sood, D., Guo, L., Dufault, M. R., Garcia, M., Passaro, R., Gao, G., Zhang, B., & Dodge, J. C. (2024). Unravelling neuronal and glial differences in ceramide composition, synthesis, and sensitivity to toxicity. *Communications Biology*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-07231-0>
- Mencarelli, C., & Martinez-Martinez, P. (2013). Ceramide function in the brain: When a slight tilt is enough. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(2), 181–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1038-x>
- Mullen, T. D., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2012). Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *The Biochemical Journal*, 441(3), 789–802. <https://doi.org/10.1042/BJ20111626>
- Müller, C. P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2015). Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1851(8), 1052–1065. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.12.014>

- Niraula, A., Witcher, K. G., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2019). Interleukin-6 Induced by Social Stress Promotes a Unique Transcriptional Signature in the Monocytes That Facilitate Anxiety. *Biological Psychiatry*, *85*(8), 679–689. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.030>
- Nomura, S., Naruse, R., & Okada, H. (1992). [The tail suspension test: Its theory and practical application]. *Yakubutsu, Seishin, Kodo = Japanese Journal of Psychopharmacology*, *12*(5), 207–213.
- Novgorodov, S. A., Chudakova, D. A., Wheeler, B. W., Bielawski, J., Kindy, M. S., Obeid, L. M., & Gudz, T. I. (2011). Developmentally regulated ceramide synthase 6 increases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> loading capacity and promotes apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4644–4658. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164392>
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 165–175. <https://doi.org/10.2147/NDT.S58841>
- Oksanen, M., Lehtonen, S., Jaronen, M., Goldsteins, G., Hämäläinen, R. H., & Koistinaho, J. (2019). Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *76*(14), 2739–2760. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03111-7>
- Oleinik, N., Albayram, O., Kassir, M. F., Atilgan, F. C., Walton, C., Karakaya, E., Kurtz, J., Alekseyenko, A., Alsudani, H., Sheridan, M., Szulc, Z. M., & Ogretmen, B. (2023). Alterations of lipid-mediated mitophagy result in aging-dependent sensorimotor defects. *Aging Cell*, *22*(10), e13954. <https://doi.org/10.1111/accel.13954>
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Bravo, F. V., Miranda, A., Silva, R. R., Zhou, B., Marques, F., Pinto, V., Cerqueira, J. J., Di Paolo, G., & Sousa, N. (2016). The impact of chronic stress on the rat brain lipidome. *Molecular Psychiatry*, *21*(1), 80–88. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.14>

- Olsen, A. S. B., & Færgeman, N. J. (2017). Sphingolipids: Membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biology*, 7(5), 170069. <https://doi.org/10.1098/rsob.170069>
- Packard, A. E. B., Egan, A. E., & Ulrich-Lai, Y. M. (2016). HPA axis- Interaction with Behavioral Systems. *Comprehensive Physiology*, 6(4), 1897–1934. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150042>
- Pan, Y., Li, J., Lin, P., Wan, L., Qu, Y., Cao, L., & Wang, L. (2024). A review of the mechanisms of abnormal ceramide metabolism in type 2 diabetes mellitus, Alzheimer's disease, and their co-morbidities. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1348410. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1348410>
- Pant, D. C., Aguilera-Albesa, S., & Pujol, A. (2020). Ceramide signalling in inherited and multifactorial brain metabolic diseases. *Neurobiology of Disease*, 143, 105014. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105014>
- Park, S.-C., & Kim, Y.-K. (2020). Anxiety Disorders in the DSM-5: Changes, Controversies, and Future Directions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1191, 187–196. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_12)
- Qin, J., Berdyshev, E., Goya, J., Natarajan, V., & Dawson, G. (2010). Neurons and Oligodendrocytes Recycle Sphingosine 1-Phosphate to Ceramide. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14134–14143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076810>
- Quinville, B. M., Deschenes, N. M., Ryckman, A. E., & Walia, J. S. (2021). A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5793. <https://doi.org/10.3390/ijms22115793>
- Raio, C. M., & Phelps, E. A. (2014). The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. *Neurobiology of Stress*, 1, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.004>

- Rajagopalan, V., Canals, D., Luberto, C., Snider, J., Voelkel-Johnson, C., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2015). Critical determinants of mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase) for mitochondrial localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(4), 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.019>
- Rossi, S., Sacchetti, L., Napolitano, F., De Chiara, V., Motta, C., Studer, V., Musella, A., Barbieri, F., Bari, M., Bernardi, G., Maccarrone, M., Usiello, A., & Centonze, D. (2012). Interleukin-1 $\beta$  causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(40), 13896–13905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1515-12.2012>
- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2015). Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Seminars in Immunopathology*, 37(6), 625–638. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0515-3>
- Sambolín-Escobales, L., Tirado-Castro, L., Suarez, C., Pacheco-Cruz, D., Fonseca-Ferrer, W., Deme, P., Haughey, N., Chompre, G., & Porter, J. T. (2022). High-Fat Diet and Short-Term Unpredictable Stress Increase Long-Chain Ceramides Without Enhancing Behavioral Despair. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 859760. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.859760>
- Sapoń, K., Mańka, R., Janas, T., & Janas, T. (2023). The role of lipid rafts in vesicle formation. *Journal of Cell Science*, 136(9), jcs260887. <https://doi.org/10.1242/jcs.260887>
- Scheiblich, H., Dansokho, C., Mercan, D., Schmidt, S. V., Bousset, L., Wischhof, L., Eikens, F., Odainic, A., Spitzer, J., Griep, A., Schwartz, S., Bano, D., Latz, E., Melki, R., & Heneka, M. T. (2021). Microglia jointly degrade fibrillar alpha-synuclein cargo by distribution through tunneling nanotubes. *Cell*, 184(20), 5089-5106.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.007>

- Scheiblich, H., Schlütter, A., Golenbock, D. T., Latz, E., Martinez-Martinez, P., & Heneka, M. T. (2017). Activation of the NLRP3 inflammasome in microglia: The role of ceramide. *Journal of Neurochemistry*, *143*(5), 534–550. <https://doi.org/10.1111/jnc.14225>
- Schumacher, F., Edwards, M. J., Mühle, C., Carpinteiro, A., Wilson, G. C., Wilker, B., Soddemann, M., Keitsch, S., Scherbaum, N., Müller, B. W., Lang, U. E., Linnemann, C., Kleuser, B., Müller, C. P., Kornhuber, J., & Gulbins, E. (2022). Ceramide levels in blood plasma correlate with major depressive disorder severity and its neutralization abrogates depressive behavior in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, *298*(8), 102185. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102185>
- Sha, Z., Xu, J., Li, N., & Li, O. (2023). Regulatory Molecules of Synaptic Plasticity in Anxiety Disorder. *International Journal of General Medicine*, *16*, 2877–2886. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S413176>
- Shao, F., Wang, X., Wu, H., Wu, Q., & Zhang, J. (2022). Microglia and Neuroinflammation: Crucial Pathological Mechanisms in Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*, 825086. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.825086>
- Sinenko, S. A., Kuzmin, A. A., Skvortsova, E. V., Ponomartsev, S. V., Efimova, E. V., Bader, M., Alenina, N., & Tomilin, A. N. (2023). Tryptophan Hydroxylase-2-Mediated Serotonin Biosynthesis Suppresses Cell Reprogramming into Pluripotent State. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5), 4862. <https://doi.org/10.3390/ijms24054862>
- Siskind, L. J., & Colombini, M. (2000). The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(49), 38640–38644. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000587200>
- Sonnino, S., & Prinetti, A. (2016). The role of sphingolipids in neuronal plasticity of the brain. *Journal of Neurochemistry*, *137*(4), 485–488. <https://doi.org/10.1111/jnc.13589>
- Szuhany, K. L., & Simon, N. M. (2022). Anxiety Disorders: A Review. *JAMA*, *328*(24), 2431–2445. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.22744>

- Teleanu, R. I., Niculescu, A.-G., Roza, E., Vladâncenco, O., Grumezescu, A. M., & Teleanu, D. M. (2022). Neurotransmitters—Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5954. <https://doi.org/10.3390/ijms23115954>
- Teo, J. D., Marian, O. C., Spiteri, A. G., Nicholson, M., Song, H., Khor, J. X. Y., McEwen, H. P., Ge, A., Sen, M. K., Piccio, L., Fletcher, J. L., King, N. J. C., Murray, S. S., Brüning, J. C., & Don, A. S. (2023). Early microglial response, myelin deterioration and lethality in mice deficient for very long chain ceramide synthesis in oligodendrocytes. *Glia*, 71(4), 1120–1141. <https://doi.org/10.1002/glia.24329>
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>
- van Doorn, R., Nijland, P. G., Dekker, N., Witte, M. E., Lopes-Pinheiro, M. A., van het Hof, B., Kooij, G., Reijerkerk, A., Dijkstra, C., van van der Valk, P., van Horsen, J., & de Vries, H. E. (2012). Fingolimod attenuates ceramide-induced blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis by targeting reactive astrocytes. *Acta Neuropathologica*, 124(3), 397–410. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1014-4>
- van Echten-Deckert, G. (2023). The role of sphingosine 1-phosphate metabolism in brain health and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 244, 108381. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108381>
- Vanderlind, W. M., Everaert, J., Caballero, C., Cohodes, E. M., & Gee, D. G. (2021). Emotion and Emotion Preferences in Daily Life: The Role of Anxiety. *Clinical Psychological Science: A Journal of the Association for Psychological Science*, 10(1), 109–126. <https://doi.org/10.1177/21677026211009500>
- Ventura, A. E., Varela, A. R. P., Dingjan, T., Santos, T. C. B., Fedorov, A., Futerman, A. H., Prieto, M., & Silva, L. C. (2020). Lipid domain formation and membrane shaping by C24-

- ceramide. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1862(10), 183400.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183400>
- Vos, M., Dulovic-Mahlow, M., Mandik, F., Frese, L., Kanana, Y., Haissatou Diaw, S., Depperschmidt, J., Böhm, C., Rohr, J., Lohnau, T., König, I. R., & Klein, C. (2021). Ceramide accumulation induces mitophagy and impairs  $\beta$ -oxidation in PINK1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(43), e2025347118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025347118>
- Vos, M., & Klein, C. (2022). Ceramide-induced mitophagy impairs  $\beta$ -oxidation-linked energy production in PINK1 deficiency. *Autophagy*, 18(3), 703–704.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2027193>
- Wang, S., Jin, Z., Wu, B., Morris, A. J., & Deng, P. (2025). Role of dietary and nutritional interventions in ceramide-associated diseases. *Journal of Lipid Research*, 66(1), 100726.  
<https://doi.org/10.1016/j.jlr.2024.100726>
- Wang, Y.-L., Han, Q.-Q., Gong, W.-Q., Pan, D.-H., Wang, L.-Z., Hu, W., Yang, M., Li, B., Yu, J., & Liu, Q. (2018). Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 21.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1054-3>
- Xu, W., Zhang, D., Ma, Y., Gaspar, R. C., Kahn, M., Nasiri, A., Murray, S., Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2024). Ceramide synthesis inhibitors prevent lipid-induced insulin resistance through the DAG-PKC $\epsilon$ -insulin receptorT1150 phosphorylation pathway. *Cell Reports*, 43(10), 114746. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114746>
- Yang, X., Fang, Y., Chen, H., Zhang, T., Yin, X., Man, J., Yang, L., & Lu, M. (2021). Global, regional and national burden of anxiety disorders from 1990 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*, 30, e36.  
<https://doi.org/10.1017/S2045796021000275>

- Yin, K.-J., Fan, Y., Hamblin, M., Zhang, J., Zhu, T., Li, S., Hawse, J. R., Subramaniam, M., Song, C.-Z., Urrutia, R., Lin, J. D., & Chen, Y. E. (2013). KLF11 mediates PPAR $\gamma$  cerebrovascular protection in ischaemic stroke. *Brain: A Journal of Neurology*, *136*(Pt 4), 1274–1287. <https://doi.org/10.1093/brain/awt002>
- You, Y.-F., Chen, M., Tang, Y., Yu, W.-X., Pang, X.-W., Chu, Y.-H., Zhang, H., Shang, K., Deng, G., Zhou, L.-Q., Yang, S., Wang, W., Xiao, J., Tian, D.-S., & Qin, C. (2023). TREM2 deficiency inhibits microglial activation and aggravates demyelinating injury in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Journal of Neuroinflammation*, *20*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02772-3>
- Young, M. M., Kester, M., & Wang, H.-G. (2013). Sphingolipids: Regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of Lipid Research*, *54*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1194/jlr.R031278>
- Yu, W., Ying, J., Wang, X., Liu, X., Zhao, T., Yoon, S., Zheng, Q., Fang, Y., Yang, D., & Hua, F. (2021). The Involvement of Lactosylceramide in Central Nervous System Inflammation Related to Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 691230. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.691230>
- Zangrossi, H., & Graeff, F. G. (2014). Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *46 Pt 3*, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.007>
- Zarrindast, M.-R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian Medicine*, *18*(9), 591–603.
- Zhang, Y., Park, Y. S., & Kim, I.-B. (2023). A Distinct Microglial Cell Population Expressing Both CD86 and CD206 Constitutes a Dominant Type and Executes Phagocytosis in Two Mouse Models of Retinal Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 14236. <https://doi.org/10.3390/ijms241814236>

- Zheng, R.-H., Zhang, Y.-B., Qiu, F.-N., Liu, Z.-H., Han, Y., Huang, R., Zhao, Y., Yao, P., Qiu, Y., & Ren, J. (2021). NF-κB pathway play a role in SCD1 deficiency-induced ceramide de novo synthesis. *Cancer Biology & Therapy*, 22(2), 164–174. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.1883414>
- Zhu, B., Liu, Y., Hwang, S., Archuleta, K., Huang, H., Campos, A., Murad, R., Piña-Crespo, J., Xu, H., & Huang, T. Y. (2022). Trem2 deletion enhances tau dispersion and pathology through microglia exosomes. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00562-8>
- Zoicas, I., Huber, S. E., Kalinichenko, L. S., Gulbins, E., Müller, C. P., & Kornhuber, J. (2020). Ceramides affect alcohol consumption and depressive-like and anxiety-like behavior in a brain region- and ceramide species-specific way in male mice. *Addiction Biology*, 25(6), e12847. <https://doi.org/10.1111/adb.12847>
- Zoicas, I., Mühle, C., Schumacher, F., Kleuser, B., & Kornhuber, J. (2023). Development of Comorbid Depression after Social Fear Conditioning in Mice and Its Effects on Brain Sphingolipid Metabolism. *Cells*, 12(10), 1355. <https://doi.org/10.3390/cells12101355>
- Zrzavy, T., Hametner, S., Wimmer, I., Butovsky, O., Weiner, H. L., & Lassmann, H. (2017). Loss of “homeostatic” microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(7), 1900–1913. <https://doi.org/10.1093/brain/awx113>