

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

Departamento de Bioquímica

**Mecanismos implicados en la acción de  
agentes neuroprotectores en modelos de  
lesión cerebral.**

Ana Belén López Rodríguez

Madrid, 2015



**Departamento de Bioquímica**

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid



**Mecanismos implicados en la acción de  
agentes neuroprotectores en modelos de  
lesión cerebral.**

Tesis Doctoral presentada por Ana Belén López Rodríguez,  
licenciada en Biología, bajo la dirección de los doctores:

**M<sup>a</sup> Paz Viveros Hernando**

Catedrática Fisiología Animal

**Luis Miguel García Segura**

Profesor de investigación CSIC

Realizada en la Universidad Complutense de Madrid y el Instituto Cajal (CSIC).





El presente trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- Redes temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Red de Trastornos Adictivos (RD2012/0028/0021-FEDER).

- GRUPOS UCM-BSCH: Grupo UCM 951579.

- Programa de crowdfunding Precipita, organizado por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología.

- Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-38144) titulado: “Modelos experimentales para la investigación de funciones hipotálamicas y extrahipotálamicas de leptina y sus interacciones con kisspeptina. Implicaciones psiconeuroendocrinas”.

- Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-30217-C03-01) titulado: “Señalización de Notch/Ngn3 en las acciones neuroprotectoras de compuestos estrogénicos”.



# Agradecimientos

Dicen que la “curiosidad mató al gato”, pero en mi caso la curiosidad me llevó a hacer una Tesis Doctoral. Nunca imaginé que una duda en las clases de “Mecanismos de acción de agentes neuroactivos”, MAAN para los biólogos complutenses, me llevaría a una aventura que culmina en esto y que sólo es el principio de otra más grande.

Y seis años más tarde de aquello, os escribo a todos los que habéis formado parte de este viaje para daros las gracias por el cariño, ayuda, comprensión y compañía.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Paz y Luis Miguel la confianza que ambos depositaron en mí. Quiero daros las gracias por vuestra dedicación, atención y las muestras de cariño recibido, no sólo dentro del ámbito académico si no todos y cada uno de los días desde que comenzamos esto.

Paz, quiero agradecerte aquella intuición que tuviste conmigo cuando subí al despacho a preguntarte mis dudas. Quiero darte las gracias por los esfuerzos que has hecho y haces por todos los integrantes del grupo, por tus consejos y por la manera en que te preocupas y cuidas de cada uno de nosotros. Muchas de nuestras conversaciones y encuentros han sido vía email pero ha habido tan buena comunicación que no era necesario mucho más. Gracias por tu dirección, sugerencias e ideas que han hecho de esta Tesis una muestra perfecta de lo que es “colaborar”.

Luis Miguel, agradecerte igualmente todas tus aportaciones, ideas, apoyo y enseñanzas científicas. He aprendido muchísimo contigo y de ti. Y sobre todo darte gracias por tu paciencia cuando montamos (con ayuda y participación de las chicas) los espectáculos que ocurren puntualmente en el laboratorio. Haces como que no te das cuenta pero todas sabemos que te ríes por lo bajito... Gracias por hacer del C-01 nuestra pequeña familia.

Siguiendo en mi rama Complutense, quiero dar las gracias también a todos mis compañeros del grupo: Ricardo y Eva como primeros referentes en los inicios. Meritxell como profesora (maestra diría yo pues me transmitiste tu amor por lo que hacías y haces) y compañera de fatigas de inmunohistoquímica y contajes fallidos de ¿¿¿CB2???

Y mis dos grandes AMIGOS y también compañeros, Álvaro y Vir. Porque muchos de los malos tragos los hemos pasado airosos porque estábamos juntos. A mi “becario mayor” decirte, que no podía haber tenido mejor profe que me quitara traumas los días de animalario (he de decir que al final le cogí el tranquillo a tu humor negro) y darte las gracias por tus consejos, los congresos multilingües, cada caña, cada viaje y cada carcajada que nos ha hecho un poquito más felices. A mi “princess”... buf... pocas cosas hay que no te haya dicho ya, ¿no? Si no ha sido currando, ha sido de Interrail o viendo atardecer en la Jaima, si no en un teatro o con un café y una caja de kleenex al lado o de bailoteo o... en mil lugares! Pero por si no te quedó claro: Gracias por estar ahí SIEMPRE, elevas mi oxitocina!

Mi otra gran rama es el Instituto Cajal, donde he pasado la mayor parte del tiempo y donde tengo también muchas personas a las que dar las gracias. Gracias a Ángeles por ayudar a que el C-01 sea lo que es, por tus consejos y conversaciones, por los cafés y por nuestras “peleas” estadísticas de las cuales puedo afirmar, con un  $p < 0.005$ , que las dos hemos aprendido muchísimo.

Intentar dar las gracias a todas las personas que han pasado por el labo es una tarea complicada, pero a punto de ser cuasi-doctora, lo debería conseguir, ¿no?

Gracias a Paloma, Olga y María, nuestras técnicas que nos han echado una mano cuando lo necesitábamos y alguna que otra bronca (regañina mejor dicho). Y a Íñigo, por su tremenda ayuda con las lesiones y por alguna que otra regañina también...

Gracias a Jole, Yola, Daniela y Mariana, nuestras postdoc que nos han acompañado, cuidado y enseñado en el labo y en la vida. Muchas conversaciones con vosotras han sido realmente inspiradoras, sois todas mujeres de referencia para mí, inteligentes, fuertes y con ganas por la vida, gracias por tanto.

Gracias a María Santos y Julia Simón (Mery y Ju) porque nos habéis guiado en los comienzos y en los finales (incluso en distancias terriblemente grandes como Madrid-Singapur), enseñándonos que la constancia y el trabajo duro tienen su premio. Y de puertas para fuera... sois la leche. Así os lo digo.

Ali, Ali... Ali... ¿se puede saber a qué viniste al labo? (te encanta contar cómo nos conocimos!). Llegaste al labo y fuiste un terremoto para mí. Eres una de las personas más especiales que he conocido y como no puedo expresar todo lo que me gustaría por aquí, sólo te digo: questo è solo l'inizio del viaggio, ti voglio bene!

Samar, my favourite troublemaker. I am really happy of having met you. Just two years but enough time to know that you are one of the kindest and best person I have ever known. Thank you for our never-ending and helpful Skype conversations! رایسب وت زا  
مرازگس اپس

Mis chicas, mis grandes pilares científicos: Isa, Estefi y nuestra nueva incorporación, Ana O! ¿Cómo agradeceros cada momento?. Laboratorio, quirófano, té, congresos, viajes, domingos de café, barbacoas... lloreras, riseras y dudas infinitas... Sabéis, porque lo sentís igual que yo, que sois mi pequeña familia laboratoril y que hacéis que cada día me levante con ganas para ir a trabajar y echar el tiempo que sea necesario porque cada hora merece la pena.

Y a todos los que habéis pasado fugazmente (o no tan fugazmente) por el C-01: Ale y su entrañable personalidad, Rebe y su energía, Julia Scerbo y su acentazo cordobés, Carla y sus expresiones particulares, Bruno y su... Hombre!!, Claudia y su misticismo, Ceren y su exotismo...

Afortunadamente, muchos de los nombres anteriores me acompañan de laboratorio para fuera pero también hay muchos otros a los que igualmente dar las gracias.

Amigüitas de la carrera, Ro y Noe. Por el tráfico de apuntes, por los nervios de los exámenes, por las discusiones, los trabajos conjuntos, las cañas, los cafés, los todo...

Mis dos terremotos, mis dos Saras. Una es París y la otra es Perú. Siempre nos quedará París con su mezquita, sus tardes en Montmartre y los líos varios en que me (te) metía. Y Perú... Perú sí que siempre nos quedará, al menos para recuperar tu pasaporte. Gracias mi plumita flamenca de colores.

A mis amigas, las de toda la vida, las "Sexy ladies". Por acompañarme en cada momento e intentar entenderme. Gracias por años y años de viernes de pituteo, sábados de parranda y domingos de meriendas sin las cuales todo esto habría sido más difícil.

Compa-migos del máster, de los que tanto renegué y huí en los comienzos y que ahora se han convertido en amigos de los buenos. De los que puedes estar meses sin ver y el reencuentro es perfecto. Marcos, Vir, Lucio y Ruth... Feliz lunes! (Feliz todo!).

A ti también, Pilondrino molón. Gracias por haberte interesado por mi microglía e intentar recordar nombres de hormonas imposibles; por ejercer cierta presión al preguntar cada día "¿Qué hemos descubierto hoy?" o "¿Cuánto queda para el Nobel?" y por ello servirme como motivo de superación. El Nobel está al caer, tranquilo.

Y para el final me dejo lo mejor, como pasa con los postres... Gracias infinitas a mi familia, porque sin ellos no estaría aquí escribiendo esto. A mis abuelos va dedicado todo mi esfuerzo. Por todos sus cuidados, sus arrebatos repentinos, sus miradas y su esencia... por su confianza en mí y por ser mi motivación para seguir adelante y querer convertirme en mejor persona.

Papá, Mamá: GRACIAS por vuestro apoyo incondicional, por vuestra paciencia en mis días más insoportables, por la ayuda para tomar decisiones, por el empuje en mis momentos bajos, por intentar entenderme en toda situación y servirme de guía en cada una de ellas. Por todo. Y "todo" se queda pequeño, de verdad.

Y a ti Nando... debería inventarme una palabra (como tantas veces hemos hecho) para poder agradecerte cada segundo, cada conversación, cada regañina que siempre acaba en risa, cada abrazo, cada consejo. No existe palabra que recoja todo mi sentimiento de gratitud hacia ti.

Seguramente a estas alturas de párrafo estéis lacrimógenos (yo lo estoy). Pero una de las cosas que he aprendido estos años es a dejar fluir las emociones de todo tipo. Así que llorad, pero que sea de alegría, que esto es un gran logro y el fruto de mucho esfuerzo sólo merece llenarlo de enormes sonrisas.







## Resumen

El número de accidentes que originan lesiones cerebrales ha aumentado en la última década y constituyen la primera causa de muerte y dependencia en personas menores de 35 años. Son lesiones que se caracterizan por presentar una gran variedad de síntomas, todos ellos muy complejos, heterogéneos y muy variables entre los distintos casos. A pesar de todos los esfuerzos de ensayos preclínicos y estudios con pacientes, los mecanismos subyacentes a estas secuelas no están completamente descritos.

Ya que se sabe que el sistema endocannabinoide participa activamente en el desarrollo de los síntomas y recuperación de diversas lesiones del sistema nervioso, se quiso estudiar la implicación del mismo en los efectos neuroprotectores de tres moléculas diferentes: el estradiol, la minociclina y la leptina.

Numerosos estudios han demostrado que el estradiol ejerce efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios en modelos de lesión cerebral. Reduce la reactividad glial y la muerte celular, aumenta la liberación de factores tróficos y anti-apoptóticos y presenta actividad anti-oxidante. Con respecto a la minociclina, se sabe que este antibiótico inhibe la activación microglial y la proliferación y activación de células inmunes y modula la activación de enzimas de inflamación y el balance anti- y pro-apoptótico. En los últimos años se ha confirmado que la leptina no sólo está implicada en el control del balance energético sino que también presenta efectos beneficiosos al modular la liberación de citoquinas, la regeneración neuronal y las rutas de supervivencia celular.

Nuestros resultados con dos modelos de lesión cerebral diferentes indican que el sistema endocannabinoide está implicado en los efectos neuroprotectores de estas tres moléculas pues el uso de antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 bloqueó o atenuó las acciones beneficiosas de los tres tratamientos. Estos efectos incluyen la reactividad astrogliar y microglial, la formación de edema, el daño axonal difuso, el daño neurológico y la regulación del ARN mensajero de citoquinas pro- y anti-inflamatorias así como de componentes del sistema endocannabinoide. Los trabajos indican que el receptor CB2 tiene una implicación mayor en los procesos de neuroprotección.

## Abstract

The number of accidents causing brain injuries has increased in the last decade and represents the main cause of death and dependence in people younger than 35 years. Brain lesions are characterized by a great variety of symptoms, all of them very complex, heterogeneous and highly variable within the different patients. Despite the efforts from preclinical studies and clinical trials, the mechanisms underlying these sequelae are still poorly understood.

Since it is known that the endocannabinoid system actively participates in the development and recovery of different central nervous system injuries, we wanted to study the involvement of this system in the neuroprotective effects of three different molecules: estradiol, minocycline and leptin.

There are many studies demonstrating that estradiol exerts neuroprotective and anti-inflammatory effects in brain injury models. It reduces the glial reactivity and cell death, increases the release of anti-apoptotic and trophic factors and presents anti-oxidant activity. Regarding minocycline, this antibiotic inhibits the microglia reactivity and the proliferation and activation of immune cells and modulates the activation of enzymes involved in inflammation and the ratio of anti- and pro-apoptotic factors. In the last years, it has been shown that leptin is not only involved in energy balance control but also exerts beneficial effects since it regulates the release of cytokines, neuronal regeneration and cell survival pathways.

Our results from two different brain injury models indicate that the endocannabinoid system is involved in the neuroprotective effects of these three molecules since the use of antagonists of cannabinoid receptor CB1 and CB2 blocked or attenuated the beneficial properties of the three treatments. These effects include the astroglial and microglial reactivity, the edema formation, the diffuse axonal injury, the neurological impairment and the regulation of messenger RNA of pro- and anti-inflammatory cytokines as well as endocannabinoid system components. The studies also show that CB2 receptor presents a higher implication in neuroprotective processes.





# Índice

<b>Introducción</b>	<b>13</b>
<hr/>	
<b>1. Lesiones del sistema nervioso</b>	<b>15</b>
1.a. Modelo de lesión penetrante	16
1.b. Modelo de lesión cerrada	19
<b>2. Sistema endocannabinoide</b>	<b>22</b>
2.a. Sistema endocannabinoide y neuroprotección	23
<b>3 Estradiol</b>	<b>24</b>
<b>4. Minociclina</b>	<b>26</b>
<b>5. Leptina</b>	<b>28</b>
<b>6. Justificación de los objetivos de la Tesis</b>	<b>30</b>
<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<hr/>	
<b>Diseños experimentales</b>	<b>37</b>
<hr/>	
<b>Material y métodos</b>	<b>43</b>
<hr/>	
Animales	45
Lesión penetrante	45
Traumatismo craneoencefálico	46
Tratamientos farmacológicos	46
Lesión penetrante	46
Traumatismo craneoencefálico	47
Fijación del tejido e inmunohistoquímica	48

Análisis morfométrico	49
Lesión penetrante	49
Traumatismo craneoencefálico	50
Análisis de la expresión génica (RT-qPCR)	51
Lesión penetrante	51
Traumatismo craneoencefálico	53
Control del peso corporal	54
Evaluación del daño neurológico	54
Medida de la formación de edema	55
Valoración de la expresión de proteína (Western Blot)	56
Espectrometría de masas (LC-MS/MS)	56
Valoración de los niveles plasmáticos de leptina (ELISA)	57
Análisis estadísticos	58
<b>Resultados</b>	<b>59</b>
<hr/>	
<b>Discusión</b>	<b>89</b>
<hr/>	
<b>Conclusiones</b>	<b>107</b>
<hr/>	
<b>Bibliografía</b>	<b>111</b>
<hr/>	
<b>Anexo I (Publicaciones derivadas de la Tesis)</b>	<b>135</b>
<hr/>	
<b>Anexo II (Otras publicaciones)</b>	<b>219</b>
<hr/>	

**Abreviaturas**

**Abreviaturas**



2-AG	2-Araquidonoil glicerol
AA-5HT	Araquidonoil serotonina, inhibidor selectivo de la MAGL
ADNc	ADN complementario
AEA	Anandamida
AM251	Agonista inverso del receptor cannabinoide 1
AM630	Agonista inverso del receptor cannabinoide 2
AQP4	Acuaporina 4
BACE-1	Enzima beta secretasa ( $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)
$\beta$ -APP	Proteína precursora amiloide beta (amyloid precursor protein)
BHE	Barrera hematoencefálica
CB1	Receptor cannabinoide 1
CB2	Receptor cannabinoide 2
DAD	Daño axonal difuso
E2	17-beta estradiol
ECB	Endocannabinoide
EEM	Error estandar de la media
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Receptor de estrógenos
FAAH	Hidrolasa de amidas y ácidos grasos
GFAP	Proteína fibrilar acídica de la glía (glial fibrillary acidic protein)
i.p.	Intraperitoneal
Iba-1	Molécula ionizada adaptadora de unión a calcio 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1)
IH	Interhemisferio
IL	Interlequina
LTZ	Letrozol, inhibidor de la aromatasa
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
NAPE-PLD	N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D específica
ObR	Receptor de leptina
OEA	Oleoiletanolamina
PEA	Palmitoiletanolamina
RT-qPCR	PCR a tiempo real
s.c.	Subcutánea
SEC	Sistema endocannabinoide
SNC	Sistema nervioso central
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
URB597	Inhibidor selectivo de la FAAH



**Introducción**



## 1. Lesiones del sistema nervioso

Las lesiones cerebrales constituyen la primera causa de muerte y dependencia en personas jóvenes menores de 35 años, varían en su severidad (moderada a muy grave), son altamente incapacitantes (Guilbert 2006; Krause y Richards 2014) y presentan una gran variedad de síntomas que incluyen edema cerebral, isquemia, hemorragia, neuroinflamación y muerte celular (Burda y Sofroniew 2014; Krause y Richards 2014). Además de los síntomas físicos, los pacientes con lesiones cerebrales presentan alteraciones psicológicas y emocionales como comportamientos impulsivos, apatía, falta de motivación, ansiedad, depresión, problemas de sueño y memoria y dificultades con el lenguaje o la toma de decisiones (McAllister 2008), lo que agrava la situación de estos pacientes ya que los síntomas pueden persistir mucho tiempo tras la lesión (Arciniegas et al. 2005).

La incidencia de estas lesiones ha aumentado en los últimos diez años y debido a su gran impacto en la sociedad actual, existen numerosos estudios y ensayos clínicos que se han propuesto la identificación de los mecanismos implicados en el desarrollo de sus síntomas así como la búsqueda de posibles tratamientos. Sin embargo, estas lesiones se caracterizan por su heterogeneidad, variabilidad y complejidad lo que dificulta estas tareas y supone una gran desventaja en el desarrollo de fármacos, por lo que actualmente se carece de un tratamiento efectivo (Wang et al. 2006; Beauchamp et al. 2008; Elliott et al. 2011). Las estrategias actuales para las lesiones cerebrales van encaminadas a un conocimiento más profundo de su fisiopatología, mecanismos de daño o vías de señalización así como a la clasificación y caracterización de la lesión. Para ello se han desarrollado diferentes modelos animales para mimetizar y replicar las secuelas de estas lesiones.

A grandes rasgos, los modelos animales se pueden clasificar en lesiones penetrantes (abiertas) y lesiones no penetrantes (cerradas). Cada uno de estos modelos produce lesiones diferentes que nos permiten estudiar parámetros y síntomas específicos (Cernak 2005) y por ello han sido utilizados en esta Tesis Doctoral para su estudio y caracterización. Ambos modelos comparten la característica de desencadenar importantes procesos de neuroinflamación. La neuroinflamación es una respuesta indiferenciada mediada por los agentes inflamatorios del sistema nervioso central (SNC) frente a las agresiones externas cuya finalidad es aislar y destruir al agente nocivo, así como reparar el tejido dañado (Sofroniew y Vinters 2010). Las células del SNC que

participan en la respuesta inflamatoria son los astrocitos, la microglía, los macrófagos, los progenitores de oligodendrocitos y células que migran desde las meninges (García-Estrada et al. 1993; Carbonell et al. 1998).

### **1.a. Modelo de lesión penetrante**

La lesión penetrante es una lesión abierta que conlleva la fractura del cráneo y la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), concretamente de la capa más externa de las meninges, la dura madre. En humanos, estas lesiones son causadas por armas de fuego o proyectiles a gran velocidad que son capaces de provocar la fractura del cráneo y producir una cavitación en el tejido cerebral. Su incidencia es muy baja representando un 0.8-3% de los pacientes (Masson et al. 2001; Myburgh et al. 2008; Wu et al. 2008) y suponen casos de emergencia médica extrema ya que su severidad y tasa de mortalidad son muy elevadas.

En modelos animales, la lesión penetrante es uno de los paradigmas más empleados para estudiar la gliosis reactiva (Barreto et al. 2009) pues a diferencia de los modelos de lesión química o desmielinizante, la lesión penetrante produce una gliosis severa y la formación de una cicatriz glial muy característica (García-Estrada et al. 1993; Barreto et al. 2009; Sofroniew y Vinters 2010). Brevemente, la lesión consiste en la apertura del cráneo e incisión en uno de los dos hemisferios afectando de forma muy localizada a la corteza cerebral, cuerpo calloso e hipocampo e induciendo varios de los síntomas que se encuentran en pacientes.

Tras una lesión penetrante, la BHE se rompe y se produce hemorragia en el tejido dañado. Se dispara la reacción neuroinflamatoria y comienza la infiltración de diversas proteínas como la trombina (Nishino et al. 1993) y el fibrinógeno (Ryu et al. 2009) así como la extravasación de leucocitos, macrófagos y linfocitos (Merrill y Benveniste 1996; Donnelly y Popovich 2008). Las células de microglía son las primeras en migrar hacia el área lesionada (Nimmerjahn et al. 2005) donde proliferan, se activan y empiezan a secretar citoquinas y quimioquinas. Bajo la influencia de estos factores inflamatorios, los astrocitos, fibroblastos y progenitores de oligodendrocitos se activan y empiezan a conformar la cicatriz glial alrededor de la lesión (ver figura 1).

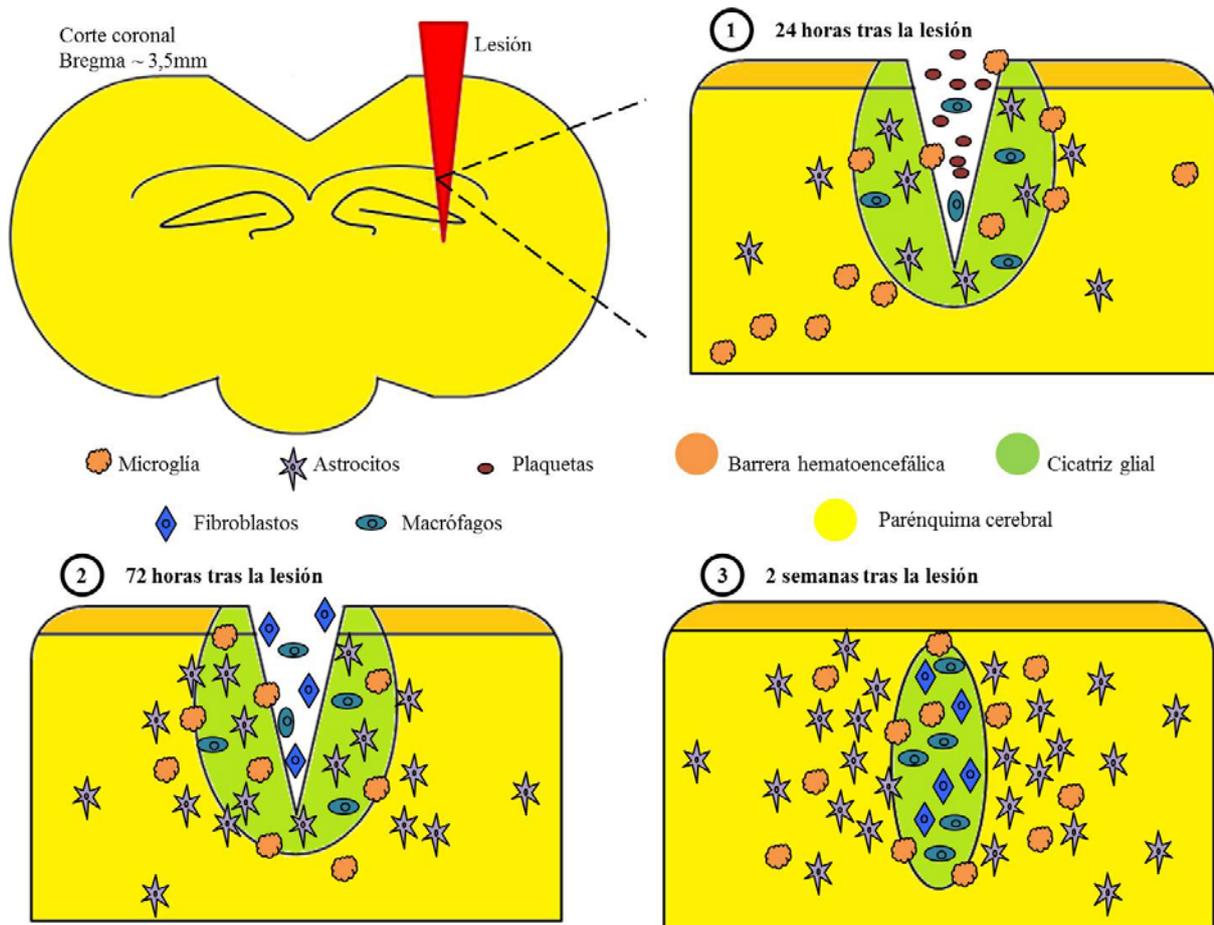


Figura 1. Representación esquemática de la formación de la cicatriz glial. (1) 24 horas después de la lesión, se observa una ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) e infiltración de macrófagos y plaquetas. En esta primera etapa comienza la migración, activación y proliferación de la microglía que libera citoquinas pro-inflamatorias al medio, resultando en la sobreexpresión de GFAP en los astrocitos reactivos. (2) 72 horas tras la lesión, se ve un aumento pronunciado de los astrocitos reactivos alrededor de la lesión pero permanecen ausentes en el centro de la cicatriz, donde la BHE está rota. Los fibroblastos procedentes de las meninges lesionadas migran al centro de la cicatriz. (3) Dos semanas después de la lesión, los fibroblastos se dividen activamente para formar la cicatriz madura. Los astrocitos proliferan alrededor de la lesión y disminuyen en número y reactividad según se alejan de ella.

La cicatriz glial consiste en una densa matriz de colágeno que actúa como barrera, delimitando el área dañada y evitando la propagación de infecciones y la infiltración de más células inmunes (Sofroniew y Vinters 2010). El componente principal de la cicatriz glial son los astrocitos que se hipertrofian, emiten numerosos procesos celulares, cambian su morfología y la composición de su citoesqueleto, sobreexpresando proteínas de los filamentos intermedios como la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), la vimentina

o la nestina (Barreto et al. 2009; Sofroniew y Vinters 2010). Además de cambiar su fenotipo morfológico y molecular, los astrocitos proliferan en la proximidad de la lesión a partir del día uno de la lesión, alcanzando un máximo de proliferación a los tres o cuatro días. La reactividad astrogliol disminuye con el tiempo, aunque se pueden encontrar astrocitos en proliferación hasta ocho días después de la lesión, y con el espacio, pues se observa una disminución progresiva de la reactividad glial al alejarse de la lesión. El pico máximo de proliferación astrocitaria, coincide con la producción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Donnelly y Popovich 2008; Barreto et al. 2009).

Ya que los astrocitos presentan un papel esencial, su reactividad es considerada como un marcador general de cualquier tipo de patología del SNC. Sin embargo, el concepto de astrogliosis es algo controvertido, por lo que hace unos años se propuso una definición más unificada (ver revisión en Sofroniew y Vinters 2010):

- 1) La astrogliosis es un espectro de cambios celulares, moleculares y funcionales en los astrocitos que ocurren en respuesta a cualquier tipo de daño en el SNC.
- 2) Los cambios experimentados por los astrocitos dependen del tipo de daño y de su intensidad y producen un patrón progresivo en la expresión génica, en los cambios moleculares, en la hipertrofia celular y en casos severos de daño se observa un patrón de proliferación y formación de cicatrices.
- 3) Los cambios de la astrogliá reactiva están regulados específicamente por el contexto en el que ocurre los daños y están mediados por señales intracelulares e intercelulares.
- 4) Los cambios de los astrocitos pueden significar tanto un aumento como una pérdida de función que pueden afectar de forma beneficiosa o perjudicial tanto a neuronas como a otros tipos celulares.

### 1.b. Modelo de lesión cerrada

Por contraposición a la lesión penetrante, una lesión traumática cerrada es aquella en la que no hay ruptura del cráneo pero sí de la BHE. Esta lesión se denomina traumatismo craneoencefálico (TCE) y es la más frecuente en los seres humanos como consecuencia de accidentes de tráfico, caídas, accidentes laborales o deportes de riesgo (Levin y Diaz-Arrastia 2015). A su vez, los modelos de TCE se dividen en contusión por impacto controlado, lesión por aceleración libre y lesión por aceleración controlada.

En nuestros estudios hemos utilizado un modelo de lesión por aceleración controlada (caída libre de peso) en ratones de la cepa CD1 (Swiss) machos. La lesión se realiza soltando un peso desde una altura controlada, produciendo el impacto en uno de los hemisferios. El modelo produce una lesión localizada que afecta a la zona del impacto en la corteza parietal y corteza basal (contra-lesión), así como al hipocampo. Con este modelo se consigue reproducir la mayoría de síntomas que encontramos en pacientes con TCE, como lo son el edema, hemorragia, inflamación, muerte celular, daño axonal y déficits funcionales o comportamentales (Cernak 2005; Harish et al. 2015). De entre todos los síntomas, los parámetros estudiados han sido la formación de edema, alteraciones comportamentales, cambios en el sistema endocannabinoide, integridad de la BHE, daño axonal y neuroinflamación (ver figura 2).

Una de las características del TCE es la formación de edema cerebral (Marmarou 2003). Existen dos tipos principales de edema cerebral: el citotóxico y el vasogénico. El edema citotóxico se caracteriza por alteraciones en el funcionamiento de la membrana de las células gliales que conllevan una retención de agua y sodio produciendo la hinchazón y vacuolización de la glía y de los cuerpos neuronales (Harish et al. 2015). En cambio, cuando hay ruptura de la BHE, se produce edema vasogénico (Barzó et al. 1997a; Cernak 2005). Se debe al aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos cerebrales (Cernak 2005) que induce la salida de proteínas y líquido plasmático hacia el tejido cerebral. Ocurre desde las primeras horas tras el TCE y persiste hasta dos semanas más tarde (Hanstock et al. 1994; Barzó et al. 1997a) y es la primera causa de mortalidad de hasta el 50% de los pacientes (Marmarou 2003). Nuestro modelo de TCE induce predominantemente edema vasogénico (Marmarou 2003; Cernak 2005) cuya resolución es dependiente de la proteína acuaporina-4 (AQP4) (Yang et al. 2008).

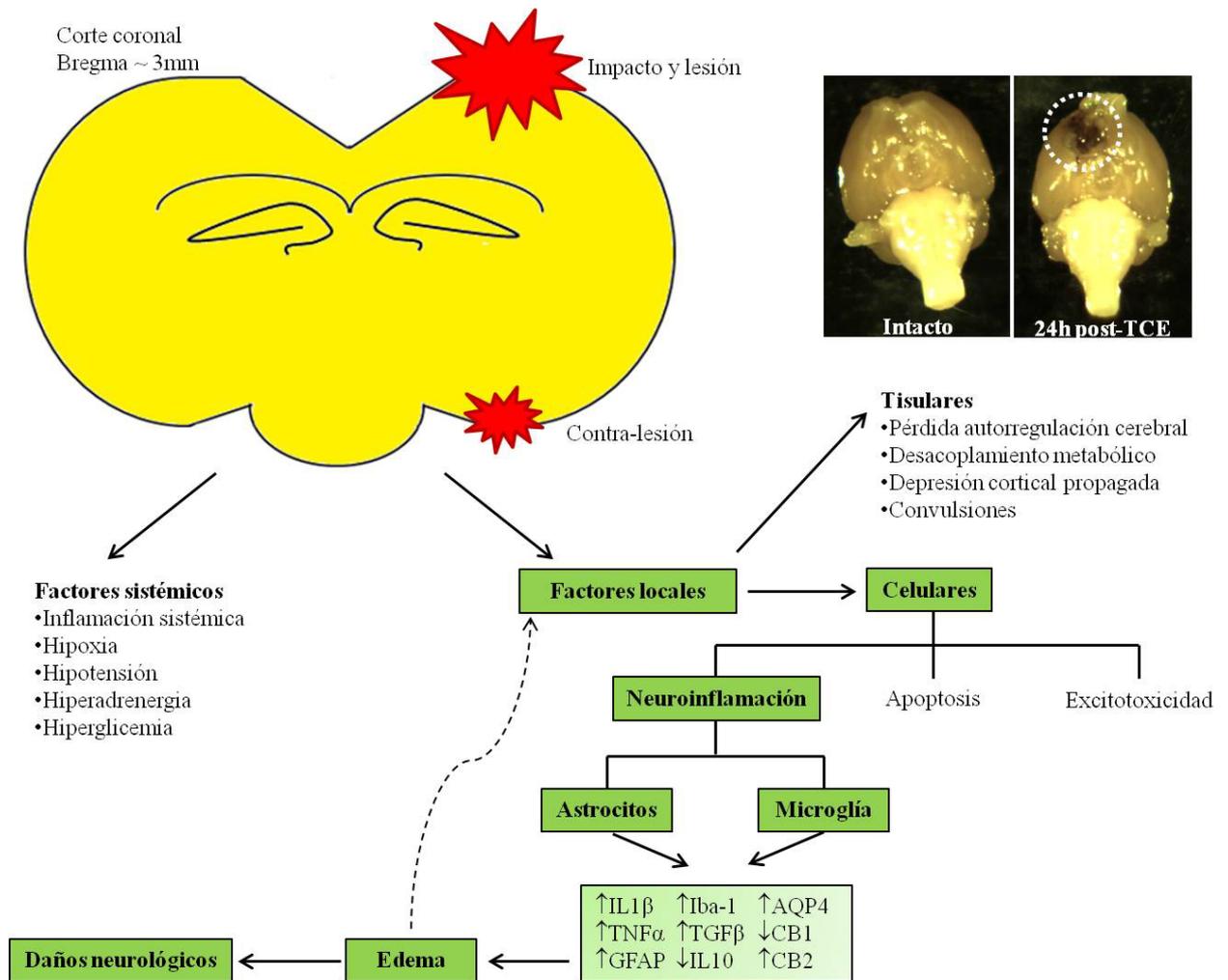


Figura 2. Representación esquemática de las respuestas y síntomas que ocurren tras un traumatismo craneoencefálico (TCE). Remarcados en verde se indican los aspectos estudiados en los experimentos realizados. En la parte superior derecha se muestra una fotografía del cerebro de un ratón intacto y al lado, resaltado con una línea discontinua, se observa el aspecto del daño causado con el modelo de lesión por caída libre de peso.

La AQP4 es una proteína transmembrana compuesta por seis dominios alfa-hélice que forman un canal a través del cual se produce la regulación de la homeostasis de fluidos del parénquima cerebral (Badaut et al. 2002). Se expresa en células gliales, principalmente en los pies astrocitarios (Badaut et al. 2002; Ren et al. 2013) y juega un papel muy importante en la estructura e integridad de la BHE (Lu et al. 2013). Sin embargo, el papel de la AQP4 en la formación de edema tras un TCE aún se desconoce y resulta controvertido ya que ratones deficientes para AQP4  $-/-$  presentan dificultades en el aclaramiento del edema vasogénico (Verkman et al. 2006) pero están protegidos frente al edema citotóxico (Yang et al. 2008). En humanos, se ha demostrado que las

variaciones genéticas en AQP4 influyen en la recuperación de un TCE (Dardiotis et al. 2014).

Otra de las características de los TCE es el daño axonal difuso (DAD) que consiste en la ruptura de los axones en zonas de transición entre la materia gris y la materia blanca del cerebro (Gennarelli 1994; Povlishock et al. 1994). Ocurre a causa de la inercia de las fuerzas rotacionales tras el impacto (Vanezis et al. 1987; Iwata et al. 2004) y la activación de células gliales, particularmente de la microglía (Davalos et al. 2005; d'Avila et al. 2012) que podría contribuir al desarrollo del daño secundario al impacto (Werner y Engelhard 2000; Lucas et al. 2006).

De la misma manera que ocurre en los modelos de lesión penetrante, tras un TCE se produce una respuesta neuroinflamatoria muy potente en la que participan tanto los astrocitos como la microglía (ver Tuttolomondo et al. 2014 para revisión). La reactividad de los astrocitos se suele estudiar por cambios en la expresión de vimentina, un filamento intermedio responsable del mantenimiento de la integridad celular de la astrogliosis (Franke et al. 1982). La vimentina se sobreexpresa en los astrocitos después de una lesión del SNC o en enfermedades neurodegenerativas (Pekny et al. 2007) y sus niveles de expresión son un marcador fiable de astrogliosis en un modelo de TCE (Ekmark-Lewén et al. 2010).

Respecto a la microglía, estas células son el origen principal de la respuesta neuroinflamatoria. Su activación consiste en la proliferación y migración hacia el tejido lesionado donde inician la cascada inflamatoria, liberando citoquinas y quimioquinas pro- y anti-inflamatorias (Tuttolomondo et al. 2014) e induciendo una regulación a la alza de genes pro-inflamatorios (Faden et al. 1989; Gentile y McIntosh 1993; Xiong et al. 1997). Entre estos marcadores se encuentra la molécula ionizada adaptadora de unión a calcio-1 (Iba-1) que se utiliza como marcador de microglía total permitiéndonos hacer un estudio tanto del número de células microgliales como de su reactividad según se describe en Diz-Chaves et al. 2012. Otras moléculas que sufren variaciones en su expresión tras la activación microglial son las citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  o el TGF- $\beta$  (Donnelly y Popovich 2008; Chodobski et al. 2011) y las citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10. Los perfiles de expresión de estas citoquinas son muy variables y hay controversia en diferentes estudios.

De hecho la IL-10, que es una citoquina anti-inflamatoria que regula negativamente la señalización del resto de moléculas pro-inflamatorias aumenta sus niveles tras un modelo de lesión por percusión por fluidos (Knoblach y Faden 1998) y disminuye en un modelo de impacto cortical controlado (Lee et al. 2012), lo que indica que la regulación de la respuesta inflamatoria depende mucho del modelo de lesión estudiado.

## 2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) está formado por los ligandos endógenos o endocannabinoides (ECB), la maquinaria enzimática de síntesis y degradación y una serie de receptores específicos y transportadores de membrana (Piomelli 2003; Mackie 2006). Los ECB actúan a través de distintos tipos de receptores: receptores clásicos tipo 1 y 2 (CB1 y CB2), receptores no-CB1, no-CB2, receptores de potencial transitorio vanilloide-1 (TRPV1), receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) y receptores huérfanos GPR55 y GPR119 (Stella 2010 para revisión). Los receptores más estudiados y mejor caracterizados molecular y farmacológicamente son el CB1 y el CB2, por ser los primeros en descubrirse. Ambos son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G inhibitorias (G $\alpha$ i/o).

El receptor CB1 fue el primero en caracterizarse en 1988 (Devane et al. 1988). Presenta una secuencia de aminoácidos altamente conservada en todas las especies estudiadas y se expresa profusamente en el SNC y periferia. Su activación está directamente relacionada con los efectos psicoactivos del cannabis (Mackie 2006; Marco y Viveros 2009 para revisión), pues presenta una alta afinidad por el tetrahidrocannabinol (THC), el principal componente involucrado en esos efectos (Ledent et al. 1999). En la edad adulta, el CB1 se expresa en los ganglios basales, cerebelo e hipocampo y en menos medida en la corteza cerebral, hipotálamo, tallo cerebral y médula espinal (Devane et al. 1988; Herkenham et al. 1990; van der Stelt y Di Marzo 2005; Marco y Viveros 2009) donde su localización presináptica regula diversas formas de plasticidad sináptica como la plasticidad a corto plazo, la supresión de la inhibición y de la excitación inducidas por despolarización (DSI/DSE), la supresión de la excitación evocada por estimulación presináptica (SSE) y la depresión a largo plazo (LTD), una forma de plasticidad postsináptica (Brown et al. 2003; Carey et al. 2011). Los receptores CB1 también se encuentran a nivel periférico en el bazo, las amígdalas, el corazón, la próstata, el útero,

los ovarios y a nivel presináptico en los terminales nerviosos simpáticos (Galiègue et al. 1995). La distribución y densidad de los receptores CB1 se correlaciona muy bien con los efectos que los cannabinoides ejercen: la alta densidad en ganglios basales se relaciona con los efectos sobre la actividad locomotora, los de hipocampo con aprendizaje, memoria y la baja densidad en tallo cerebral (área encargada del control respiratorio y cardiovascular) explica la ausencia de letalidad de la marihuana (Herkenham et al. 1990).

Tras la caracterización del primer receptor cannabinoide, Munro et al. descubrieron en 1993 el segundo tipo de receptor cannabinoide (CB2) con una homología de un 44% con el CB1. El receptor CB2 fue descrito inicial y exclusivamente en la periferia, en células del sistema inmune (Munro et al. 1993; Lynn y Herkenham 1994). Hasta hace no mucho tiempo se pensaba que el CB2 se encontraba exclusivamente en la periferia y que sólo se expresaba en el cerebro en determinadas condiciones patológicas. Sin embargo se ha demostrado su expresión en condiciones fisiológicas en distintos tipos celulares del cerebro, como astrocitos, microglía, neuronas (Walter y Stella 2004; Stella 2010) y sus progenitores (Fernández-Ruiz et al. 2008). Además, numerosos estudios han demostrado un incremento muy potente de su expresión por estímulos pro-inflamatorios y en otras situaciones patológicas (Palazuelos et al. 2006; Fernández-Ruiz et al. 2008; Stella 2010).

### **2.a. Sistema endocannabinoide y neuroprotección**

El SEC tiene un papel clave en neuroprotección y neurotoxicidad (Zhang et al. 2009; Fowler et al. 2010; Sarne et al. 2011), media mecanismos compensatorios y reparadores en condiciones patológicas como las enfermedades neurodegenerativas (Micale et al. 2007), daño por isquemia focal (Nagayama et al. 1999) y traumatismos cerebrales (Panikashvili et al. 2001, 2005, 2006), principalmente a través de los receptores CB1 y CB2 (Shohami et al. 2011). Numerosos estudios han utilizado la activación y modulación del SEC como estrategia terapéutica de lesiones cerebrales, como se recoge de forma detallada en la tabla 1.

Componente	Modelo	Efecto neuroprotector	Referencia
2-AG	<i>In vivo</i> . Ratón. Lesión cerrada.	↓ edema, ↓ volumen de infarto, ↓ muerte hipocampal y ↑ recuperación clínica.	(Panikashvili et al. 2001)
Agonista CB2 (O-1966)	<i>In vitro</i> . Rata. Isquemia	↓ neuroinflamación, ↑ flujo sanguíneo cerebral, ↑ viabilidad celular	(Sinor et al. 2000)
Receptor CB2	<i>In vivo</i> . Ratón. CB2 -/-	↑ activación glial, ↑ neurodegeneración, ↑ progresión enfermedad de Huntington	(Palazuelos et al. 2009)
Receptores CB1 y CB2	Barrera hematoencefálica	↓ extravasación células inmunes, ↓ interacción leucocito-endotelio cerebral, mantenimiento de la función astrocitaria	(Vendel y de Lange 2014)
Receptor CB1	<i>In vivo</i> . Ratón. CB1-/-	↓ recuperación espontánea, ↑ activación de las vías de NFκB	(Panikashvili et al. 2005)
Receptor CB1	<i>In vitro</i> . Rata. Glioblastoma	↓ liberación óxido nítrico, ↓ depósitos beta amiloide, ↓ GFAP, ↓ S100B	(Esposito et al. 2007)

Tabla 1. Estudios relacionados con los efectos neuroprotectores de los receptores CB1 y CB2 en distintos modelos de lesión cerebral.

Algunos de los mecanismos propuestos para explicar los efectos neuroprotectores del SEC incluyen la modificación de corrientes de calcio (Garcia-Martinez et al. 2010; Sarne et al. 2011), la regulación de la expresión de caspasa-3 (Chen y Buck 2000; Sarker et al. 2000), el control de las vías de NF-κβ (Nikodemova et al. 2006; Kozela et al. 2010), la regulación de la producción de óxido nítrico (Esposito et al. 2001; Romero-Perez et al. 2008) y la disminución de moléculas inflamatorias (Molina-Holgado et al. 1997). Muchos de ellos coinciden con los mecanismos de acción de otros agentes neuroprotectores tales como el estradiol, la minociclina o la leptina, como se detallará posteriormente. Por este motivo, se quiso profundizar en las vías de activación compartidas y estudiar una posible interacción del SEC con la señalización de estos compuestos neuroprotectores.

### 3. Estradiol

El estradiol (E2) es una hormona gonadal perteneciente a la familia de las hormonas esteroideas. Es una de la hormonas mejor caracterizadas de esta familia que incluye también la progesterona, la testosterona, los glucocorticoides y los mineralcorticoides (Prossnitz et al. 2008). El E2 es el estrógeno natural más potente y

en el organismo se encuentra en forma de  $17\beta$ -estradiol. Se sintetiza a partir del colesterol en una gran variedad de estructuras (Lewis y Jordan 2005) incluyendo el SNC (Naftolin y MacLusky 1982; revisado en Lephart 1996).

Las funciones del E2 en el SNC son múltiples: actúa sobre centros cerebrales que mantienen la temperatura corporal, colaborando así en la regulación térmica (Maggi et al. 2004), controla la homeostasis energética (Qiu et al. 2006), participa en crecimiento y diferenciación neuronal durante el desarrollo, está implicados en plasticidad neuronal en el cerebro adulto (García-Segura, 2009), en protección ante situaciones de estrés e inflamación (Cerciat et al. 2010) y en recuperación tras daños neurobiológicos y desórdenes mentales (Garcia-Segura et al. 2001). La función neuroprotectora del E2 está ampliamente demostrada. Existen numerosas evidencias en estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran que los estrógenos protegen las neuronas frente a estímulos tóxicos, isquemia, lesiones traumáticas, hipoglucemia y procesos degenerativos y de envejecimiento (Bisagno et al. 2003). Los mecanismos subyacentes a esta neuroprotección aún no están claros del todo. El E2 podría ejercer estos efectos mediante mecanismos dependientes e independientes de los receptores clásicos de estrógenos (ER), efectos genómicos y no genómicos, por activación rápida de ER de membrana que influirían sobre las cascadas de la proteína kinasa C, PI3-K, MAPK o Scr, etc. (ver revisión en Segars y Driggers 2002). Los efectos protectores incluyen la regulación de vías de apoptosis (Suzuki et al. 2006), la modificación del flujo cerebral y regulación de la óxido nítrico sintasa (Cimarosti et al. 2005), la estabilización de neuronas por inhibición de corrientes de calcio, el aumento de la producción de factores neurotróficos, como el factor de crecimiento de nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Garcia-Segura et al. 2001) y la regulación de moléculas pro-inflamatorias frente a toxicidad por glutamato y el estrés oxidativo (Cimarosti et al. 2005), (ver figura 3). Estos mecanismos comparten vías de activación con el SEC pero además, se sabe que las hormonas del eje gonadal regulan la expresión de enzimas implicadas en la síntesis y metabolismo de ECB en distintos tejidos periféricos (MacCarrone et al. 2000; Xiao et al. 2002; Guo et al. 2005; Grimaldi et al. 2009; Ribeiro et al. 2009) y que afectan a la actividad del SEC en el cerebro y pituitaria (Rodríguez de Fonseca et al. 1994; Corchero et al. 2001; Bradshaw et al. 2006; Hill et al. 2007). Por otro lado, los cannabinoides interfieren con la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en diferentes puntos, ejerciendo un impacto negativo

sobre el comportamiento y la motivación sexual (Ferrari et al.; López 2010; López et al. 2010). Además, los cannabinoides y el E2 tienen acciones en el control de funciones no reproductivas, incluyendo la cognición (Daniel et al. 2002) y la homeostasis energética (Kellert et al. 2009), mientras que el E2 aumenta los efectos antinociceptivos de los cannabinoides (Craft y Leidl 2008) y podría regular las emociones a través de mecanismos relacionados con los ECB (Hill et al. 2007).

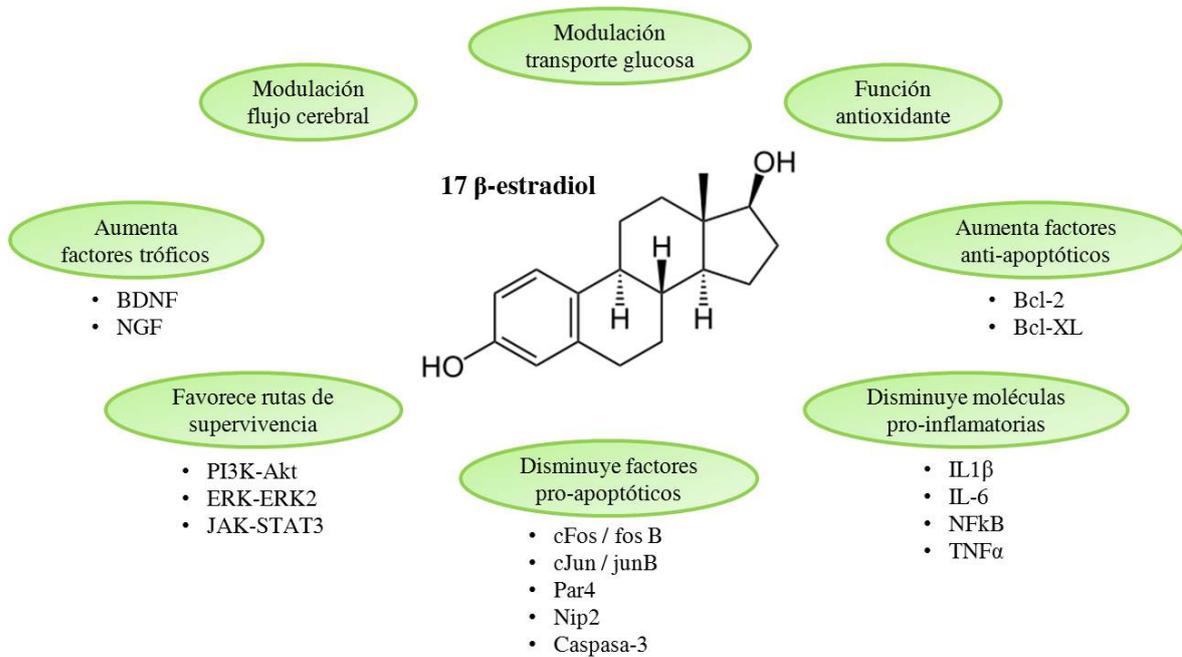


Figura 3. Diagrama representativo de los efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios del estradiol.

## 4. Minociclina

La minociclina es un derivado semi-sintético de segunda generación de la tetraciclina. Es un antibiótico altamente lipofílico y presenta una actividad antibacteriana muy bien descrita. Debido a su vida media mayor, presenta una actividad entre 2-4 veces mayores que sus análogos. Tiene un perfil farmacocinético mejor que las tetraciclinas de primera generación cuando se usa de forma oral ya que se absorbe rápida y completamente, con una gran biodisponibilidad y con una excelente penetración tisular, atravesando incluso la BHE por ser un compuesto altamente lipofílico (revisado en Garrido-Mesa et al. 2013). Por su actividad anti-bacteriana se comercializa actualmente para el tratamiento de patologías infecciosas y no-infecciosas como el acné, la dermatitis o la periodontitis. Pero además de estos efectos, este

fármaco presenta actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante, anti-apoptótica y moduladora de la respuesta inmune (Tikka et al. 2001; Plane et al. 2010), (ver figura 4). Se ha comprobado que la minociclina suprime la activación microglial, reduce la formación de edema y el volumen de lesión y ofrece una neuroprotección persistente en un modelo de TCE en ratones (Homsí et al. 2009, 2010; Siopi et al. 2011; Siopi, Calabria, et al. 2012; Siopi, Llufríu-Dabén, et al. 2012). Los mecanismos específicos por los cuales la minociclina ejerce efectos protectores en el cerebro aún no se conocen del todo (Sanchez Mejia et al. 2001; Chu et al. 2010; Plane et al. 2010). Algunas de las acciones propuestas se relacionan con la inhibición de la activación microglial (Tikka et al. 2001), la atenuación de la activación de la proteína kinasa activada por el mitógeno p38 (Tikka y Koistinaho 2001) o la reducción de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Markovic et al. 2011). La minociclina tiene también actividad anti-oxidante (Kraus et al. 2005), reduce la producción de óxido nítrico (Romero-Perez et al. 2008), controla la señalización glutamatérgica (Tikka y Koistinaho 2001; González et al. 2007) e inhibe la expresión de la 5-lipooxigenasa, una enzima implicada en el metabolismo de ácido araquidónico (Chu et al. 2010). Además de compartir vías de señalización con el SEC, se sabe que el uso de minociclina, como tratamiento en un modelo de dolor neuropático en rata, altera los niveles de los ECB (Guasti et al. 2009) y que el bloqueo farmacológico del receptor CB1 impide los efectos protectores de la minociclina en un modelo murino de hiperalgesia térmica neuropática (Parvathy y Masocha 2015).

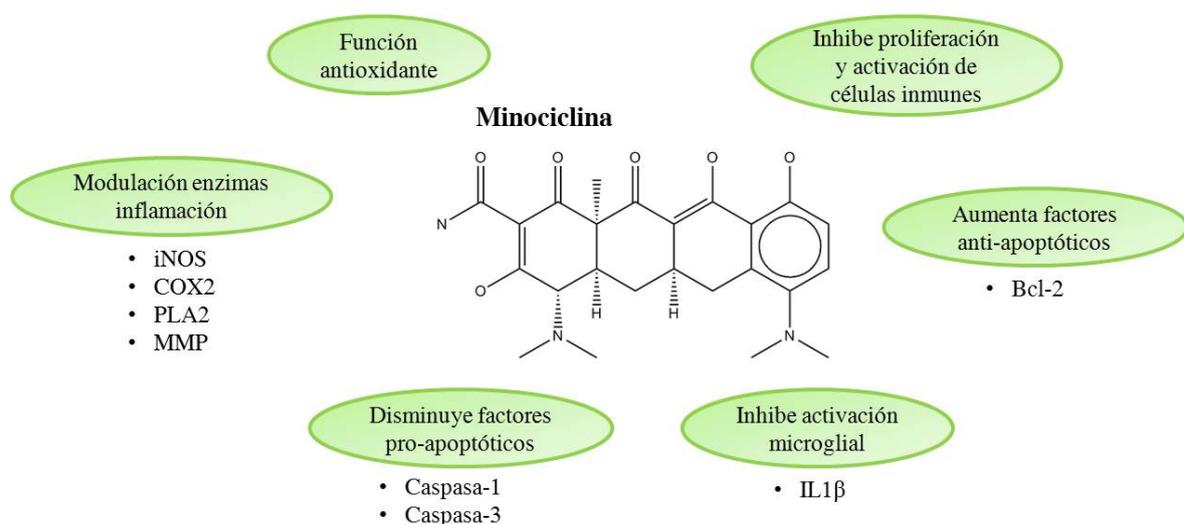


Figura 4. Diagrama representativo de los efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios de la minociclina.

### 5. Leptina

La leptina es una hormona peptídica con un peso molecular de 16KDa que se conoce principalmente por su papel regulador de la ingesta de comida y de la homeostasis energética (Friedman y Halaas 1998; Coll et al. 2007). Desde su descubrimiento en el año 1994 (Halaas et al. 1995), se le han atribuido muchas funciones nuevas a parte de las relacionadas con el control energético, incluyendo la modulación de las respuestas inmunes (revisado en Tang 2008 y Masoodi et al. 2015), la excitabilidad neuronal, los procesos de memoria y aprendizaje (ver Harvey 2007 para revisión) y los estados emocionales (Licinio et al. 2014). Además, en los últimos años varios estudios han demostrado que la leptina ejerce efectos neuroprotectores en diferentes modelos de lesión, tanto *in vivo* como *in vitro* (Dicou et al. 2001; Lu et al. 2006), (ver figura 5). Estos efectos protectores de la leptina en el SNC incluyen el aumento de la regeneración neuronal a través de la señalización JAK-STAT (Tang 2008), la atenuación del daño tras isquemia cerebral vía PI3K/Akt (Zhang et al. 2013) y la reducción del área de infarto en un modelo de fototrombosis de la arteria cerebral medial distal (Avraham et al. 2010).

Los receptores de leptina (ObR) son miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I (Baumann et al. 1996). Su expresión no se restringe a tejidos periféricos sino que también se detecta en el SNC, incluyendo áreas que no están directamente relacionadas con el control de ingesta como el hipocampo, tronco encefálico, cerebelo, corteza, amígdala y sustancia negra (Harvey 2007). Los ObR se expresan también en células inmunes como células T, macrófagos y neutrófilos (ver Aguilar-Valles et al., 2015 para revisión), lo que permite que la leptina module respuestas inflamatorias inhibiendo la apoptosis (Bruno et al. 2005) y la producción de citoquinas (Loffreda et al. 1998; Xiao et al. 2003) o mejorando la supervivencia en estados de sepsis (Tschöp et al. 2010; Siegl et al. 2014).

De la misma manera que para el estradiol y la minociclina, existe una relación muy estrecha entre la leptina y el SEC. Según los estudios de Avraham et al., 2010 en un modelo de fototrombosis, la hormona modifica la expresión de los receptores CB1 y CB2 tras un infarto, mientras que otros estudios añaden que los ratones deficientes para CB2 *-/-* presentan niveles circulantes de leptina reducidos (Deveaux et al. 2009). Además, los efectos anorexigénicos que la leptina ejerce a través del control de las

especies reactivas de oxígeno (ROS) son inhibidos a nivel hipotalámico por un agonista específico del receptor CB1(Palomba et al. 2015).

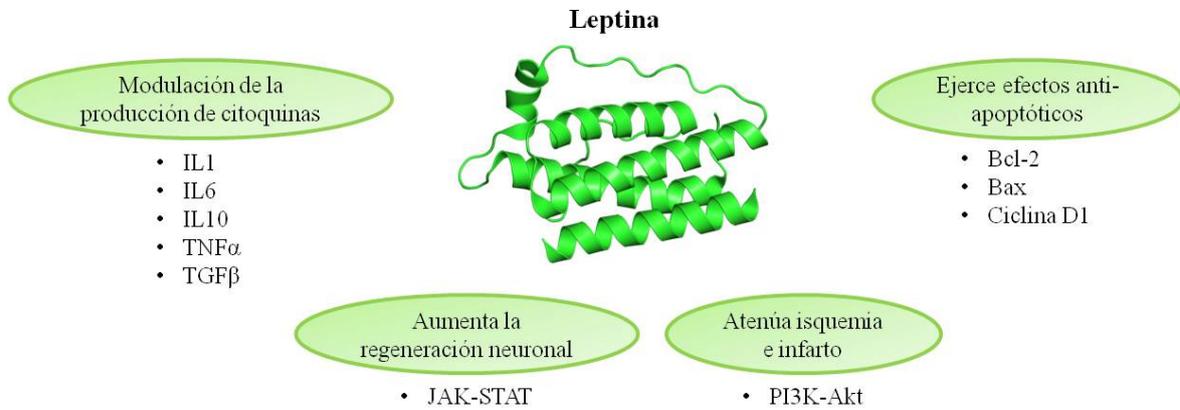


Figura 5. Diagrama representativo de los efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios de la leptina.

### 6. Justificación de los objetivos de la Tesis

Como se ha detallado en la sección anterior, existen numerosas evidencias que indican que el SEC participa en mecanismos de protección y reparación del SNC en situaciones de daño y neuroinflamación (Zhang et al. 2009; Fowler et al. 2010; Sarne et al. 2011; Shohami et al. 2011) y que estos efectos son mediados tanto por células endoteliales como gliales (Howlett et al. 2002; Stella 2010). La reactividad glial también está regulada por las hormonas gonadales (Barreto et al. 2009; Astiz et al. 2014). Concretamente estudios *in vivo* (Barreto et al. 2009, 2014) e *in vitro* (Arevalo et al. 2010; Cerciat et al. 2010; Astiz et al. 2014) demuestran que el E2 y otros compuestos estrogénicos ejercen efectos anti-inflamatorios en astrocitos y microglía. El E2 afecta a la actividad del SEC y viceversa (MacCarrone et al. 2000; Hill et al. 2007), de hecho se sabe que los efectos neuroprotectores del E2 en un modelo de isquemia focal están asociados con una disminución de los niveles del ECB anandamida (AEA) en el estriado (Amantea et al. 2007), lo que sugiere que el SEC y el E2 podrían compartir vías de activación y mecanismos que inducen neuroprotección.

Por estos motivos, en la primera parte del trabajo se analizó la implicación del SEC en los efectos protectores del E2 en un modelo de lesión cortical penetrante (**Objetivo #1**), centrándonos fundamentalmente en el estudio de la gliosis reactiva. Se utilizaron varias aproximaciones para caracterizar el modelo: bloqueo farmacológico de los receptores CB1 y CB2, inhibición de las enzimas de degradación y evaluación de los niveles de ECB tras el tratamiento con E2 y con un inhibidor de su síntesis.

La segunda parte de la Tesis se centró en el estudio de un modelo murino de TCE. Es un modelo capaz de reproducir muchos de los síntomas que ocurren en humanos como edema, astrogliosis o déficit cognitivo (Cernak 2005; Chodobski et al. 2011). A pesar de ser un modelo ampliamente utilizado por presentar una mayor proximidad a la realidad clínica, algunos aspectos de la progresión de sus síntomas y recuperación se desconocen aún. Por este motivo se profundizó en su estudio y se caracterizó el perfil temporal de los cambios observados en marcadores de inflamación, proteínas de integridad de la BHE, receptores CB1 y CB2 y niveles de ECB (**Objetivo #2**).

Estudios previos con este modelo de TCE habían demostrado que el tratamiento con minociclina revierte o mejora los síntomas de esta lesión (Homsí et al. 2009; Siopi et al. 2011) y puesto que muchos de los mecanismos neuroprotectores de la minociclina son

compartidos con algunos del SEC, se quiso estudiar una posible implicación del SEC en las acciones protectoras de la minociclina mediante la evaluación de los niveles de ECB tras el tratamiento con minociclina y a través del uso de antagonistas selectivos de los receptores CB1 y CB2 (**Objetivo #3**).

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que la leptina ejerce efectos neuroprotectores en distintos modelos de lesión (Avraham et al. 2010; Zhang et al. 2013). Se sabe que la leptina interacciona directamente con el SEC pues es un regulador negativo de la síntesis del ECB 2-araquinoil glicerol (2-AG) en el SNC (Di Marzo et al. 2001) y modifica los niveles de los receptores CB1 y CB2 tras un modelo de infarto cerebral (Avraham et al. 2010). La liberación de leptina al torrente sanguíneo en situaciones de estrés controla las respuestas del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, entre las que destaca el control de las citoquinas pro-inflamatorias (Signore et al. 2008; Masoodi et al. 2015). La microglía son las células responsables de la liberación temprana de citoquinas y presentan una alta expresión de receptor CB2 (Stella 2010; Shohami et al. 2011). Por ello, en esta última parte del trabajo se estudió la implicación del SEC en los efectos neuroprotectores de la leptina usando el modelo de TCE y centrándonos en el papel del receptor CB2 mediante el uso un antagonista selectivo (**Objetivo #4**).



**Objetivos**

**Objetivos**

## Objetivos

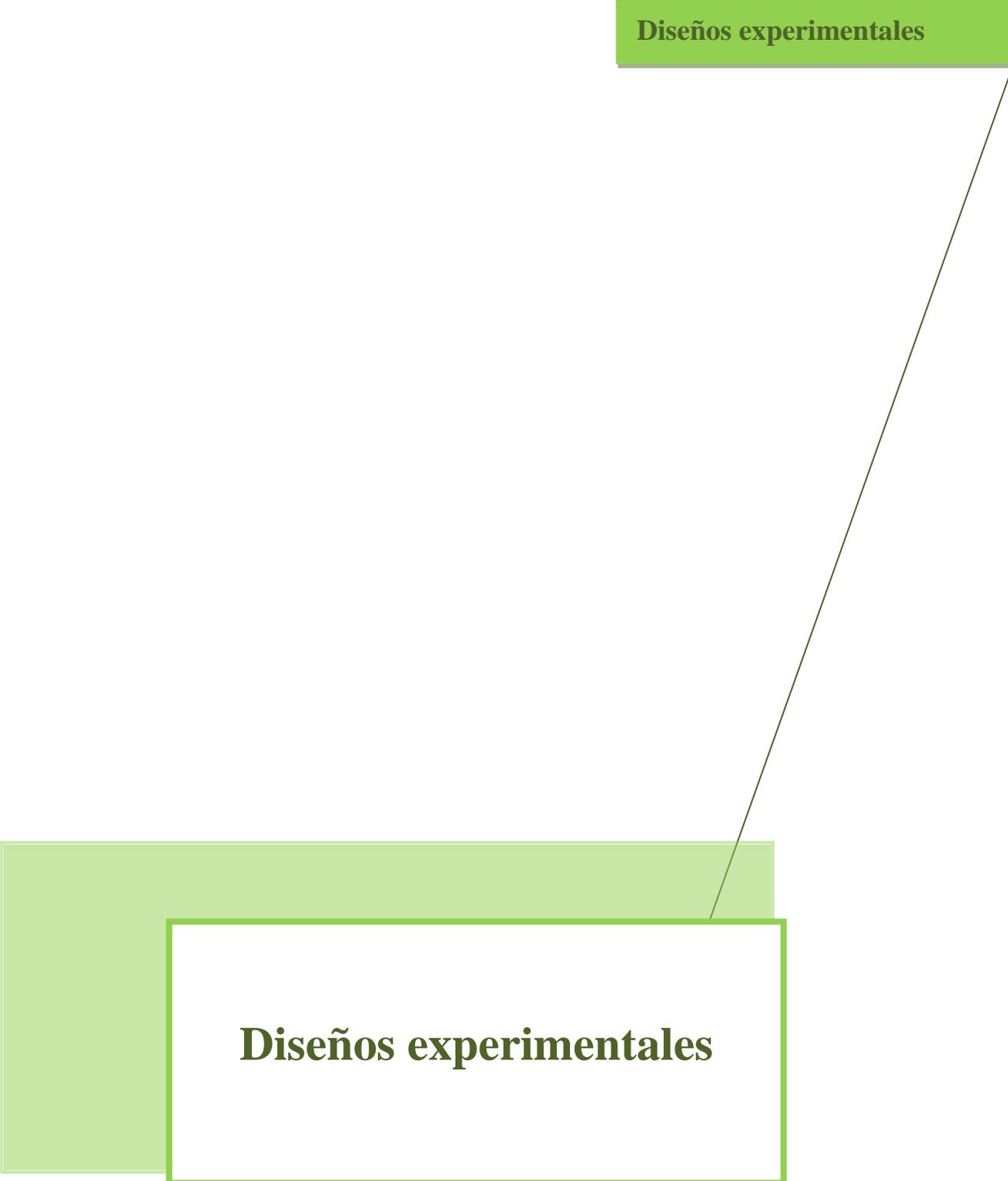
### **Objetivo General:**

Estudiar la mediación del sistema endocannabinoide en la acción neuroprotectora de agentes endógenos (estradiol, leptina) y exógenos (minociclina) en dos modelos distintos de lesión cerebral.

### **Objetivos parciales:**

1. Implicación del sistema endocannabinoide en los efectos neuroprotectores del estradiol en un modelo de lesión penetrante. Análisis del papel de los receptores CB1 y CB2, de las enzimas N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D específica, hidrolasa de amidas y ácidos grasos y monoacilglicerol lipasa así como de los cambios en los niveles de endocannabinoides.
2. Perfil temporal de los cambios del sistema endocannabinoide (24h-2semanas) en un modelo de traumatismo craneoencefálico. Correlaciones con edema y daño neurológico.
3. Mediación del sistema endocannabinoide en los efectos neuroprotectores de la minociclina en un modelo de traumatismo craneoencefálico.
4. Participación del sistema endocannabinoide en los efectos neuroprotectores de la leptina en un modelo de traumatismo craneoencefálico.

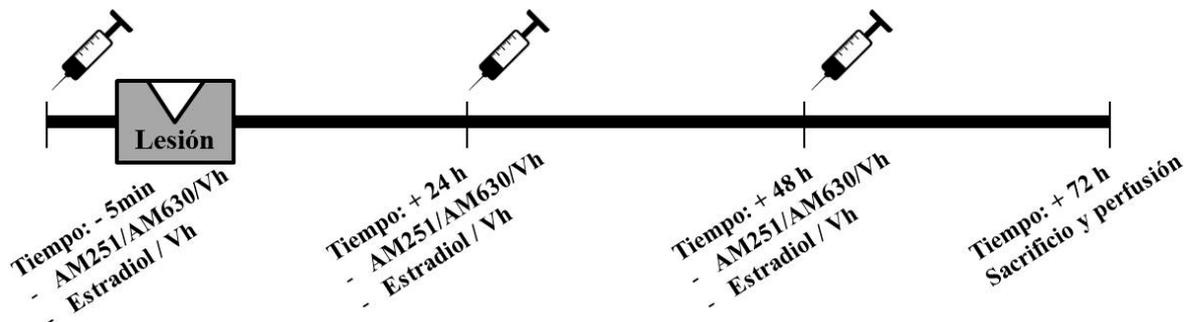




**Diseños experimentales**

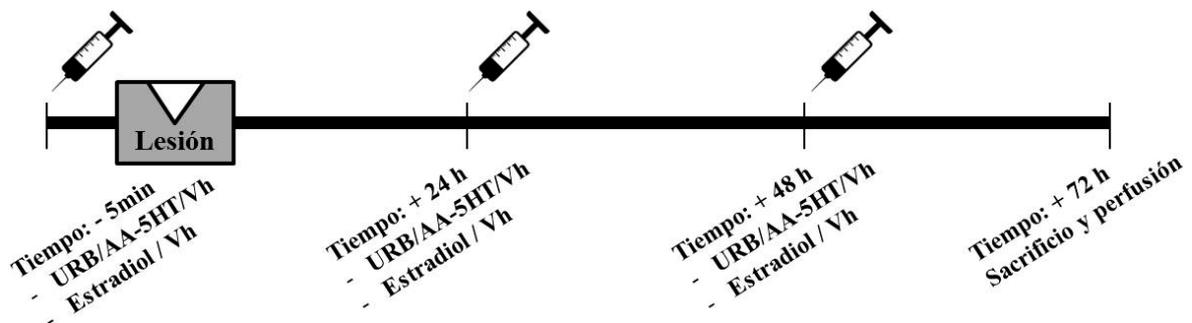


→ **Experimento #1:** Lesión penetrante+E2+Antagonistas cannabinoides (AM251 / AM630). Todos los animales fueron lesionados y recibieron uno de los tratamientos indicados en la tabla.



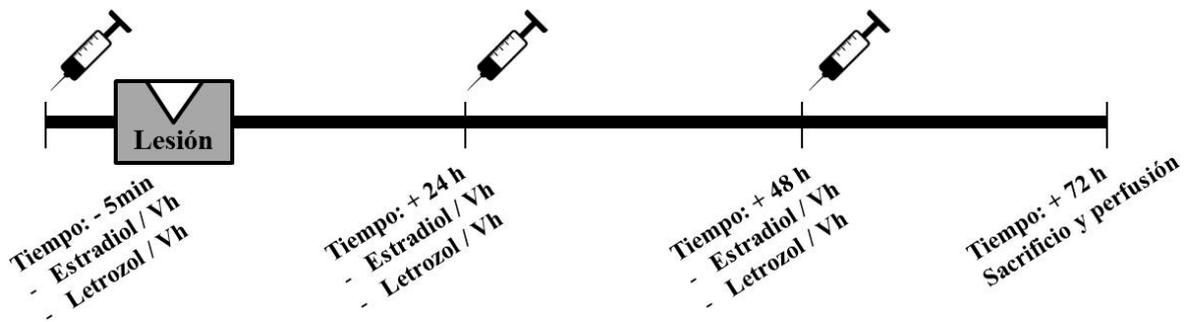
Grupo	Tratamiento	Tratamiento	N
Control	Vehículo antagonistas cannabinoides	Vehículo del 17 β estradiol	6
Estradiol	Vehículo antagonistas cannabinoides	17 β estradiol (E2758)	6
ACB1	Antagonista del receptor CB1 (AM251 )	Vehículo del 17 β estradiol	6
ACB2	Antagonista del receptor CB2 (AM630 )	Vehículo del 17 β estradiol	6
E+ACB1	Antagonista del receptor CB1 (AM251 )	17 β estradiol (E2758)	6
E+ACB2	Antagonista del receptor CB2 (AM630 )	17 β estradiol (E2758)	6

→ **Experimento #2:** Lesión penetrante+E2+Inhibidores enzimas cannabinoides (URB / AA-5HT). Todos los animales fueron lesionados y recibieron uno de los tratamientos indicados en la tabla.



Grupo	Tratamiento	Tratamiento	N
Control	Vehículo inhibidor enzima cannabinoide	Vehículo del 17 β estradiol	6
URB	URB (inhibidor enzima FAAH)	Vehículo del 17 β estradiol	6
5HT	AA-5HT (inhibidor enzima MAGL)	Vehículo del 17 β estradiol	6
E2	Vehículo inhibidor enzima cannabinoide	17 β estradiol (E2758)	6
URB-E2	URB (inhibidor enzima FAAH)	17 β estradiol (E2758)	6
5HT-E2	AA-5HT (inhibidor enzima MAGL)	17 β estradiol (E2758)	6

→ **Experimento #3:** Lesión penetrante+Estradiol y Lesión penetrante+Letrozol

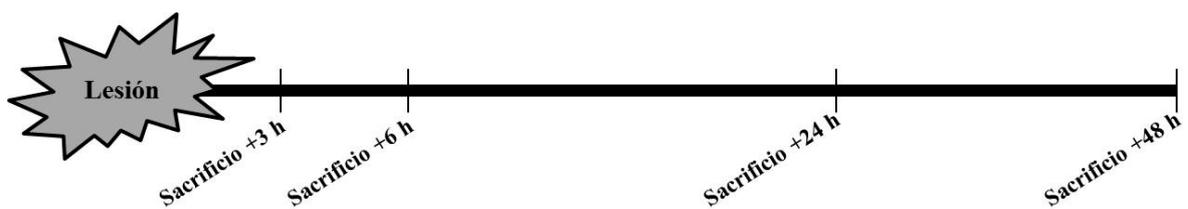


Grupo	Tratamiento	Lesión penetrante	N
Control	Vehículo E2	No	8
Estradiol	Estradiol	No	8
Lesión	Vehículo E2	Sí	8
Lesión-E2	Estradiol	Sí	8
Control	Vehículo LTZ	No	8
Letrozol	Letrozol	No	8
Lesión	Vehículo LTZ	Sí	8
Lesión-LTZ	Letrozol	Sí	8

→ **Experimento #4:** Traumatismo craneoencefálico (TCE), perfil temporal de cambios moleculares tras 24h-2semanas. Cada punto temporal tuvo su grupo lesionado y su grupo control, manipulados y sacrificados al mismo tiempo (N=6)

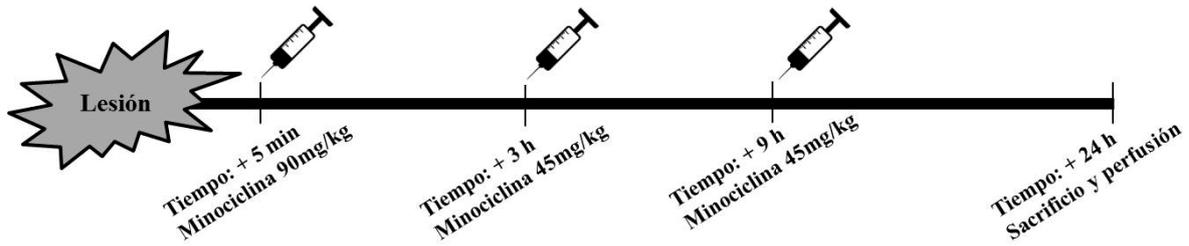


→ **Experimento #5:** TCE, perfil temporal de los niveles de endocannabinoides. Todos los animales fueron lesionados y sacrificados en los tiempos indicados en el cronograma (N=8).



→ **Experimento #6:** TCE+Minociclina6h, perfil de los niveles de endocannabinoides.

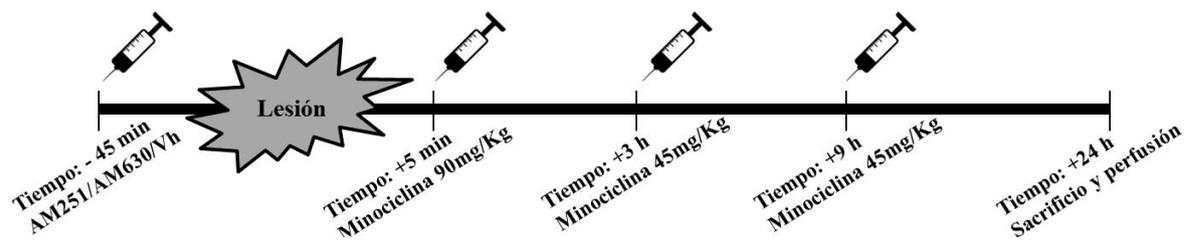
Los animales recibieron uno de los tratamientos indicados en la tabla.



Grupo	Tratamiento	Lesión	N
IntactoVh	VhCB/ VhMino	No	10
IntactoMino	VhCB / VhMino	No	10
LesiónVh	VhCB / Minociclina	Sí	10
LesiónMino	AM251 / VhMino	Sí	10

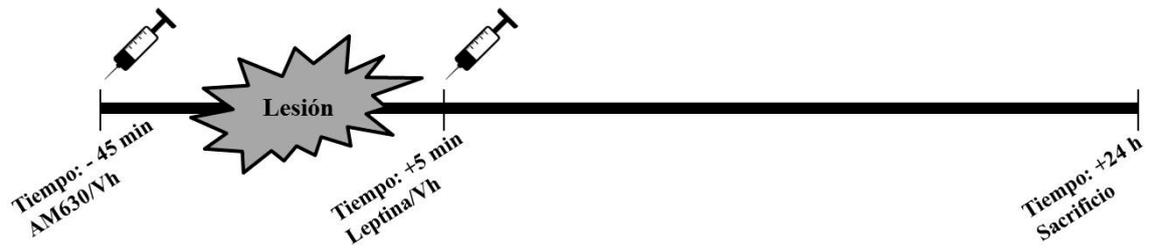
→ **Experimento #7:** TCE+Minociclina+Antagonistas cannabinoides (AM251 /

AM630). Los animales recibieron uno de los tratamientos indicados en la tabla.



Grupo	Tratamiento	Lesión	N
Intacto	VhCB/ VhMino	No	8 / 12
Lesión	VhCB / VhMino	Sí	8 / 12
LesiónMino	VhCB / Minociclina	Sí	8 / 12
LesiónAM251	AM251 / VhMino	Sí	8 / 12
LesiónAM630	AM630 / VhMino	Sí	8 / 12
LesiónAM251Mino	AM251 / Minociclina	Sí	8 / 12
LesiónAM630Mino	AM630 / Minociclina	Sí	8 / 12

→ **Experimento #8:** TCE+Leptina+Antagonista CB2 (AM630). Los animales recibieron uno de los tratamientos indicados en la tabla.



Grupo	Tratamiento	Lesión	N
Intacto	VhCB/ VhLeptina	No	8
Lesión	VhCB / VhLeptina	Sí	8
LesiónLept	VhCB / Leptina	Sí	8
LesiónAM630	AM630 / VhLeptina	Sí	8
LesiónAM630Lept	AM630 / Leptina	Sí	8

**Material y métodos**



### Animales

Para el estudio del modelo de lesión cortical penetrante, se utilizaron en todos los casos, ratas Wistar macho adultas de 10 semanas de edad procedentes de la colonia de la Universidad Complutense de Madrid. Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas y recibieron comida y agua *ad libitum*.

En el caso del modelo de traumatismo craneoencefálico (TCE), todos los experimentos fueron realizados en ratones macho de la cepa Swiss de entre 28-30 g de peso (Janvier, Le Genest St Isle, Francia y Harlan, España), realizando los estudios entre 5-7 semanas de edad. Los animales se agruparon de 6 en 6, en una sala con la temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas y con acceso libre a agua y comida.

Todos los procedimientos siguieron la normativa publicada en la Guía NIH para el uso y cuidado de animales de laboratorio, en la Guía para el Uso de animales en Investigación Neurocientífica de la Sociedad de Neurociencia, en la Guía de la Unión Europea (Directiva 86/609/EEC) y fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad Paris Descartes (P2.MJT.049.08) y el comité institucional de uso y cuidado de animales de experimentación. Además, se tomaron todas las medidas necesarias para minimizar el sufrimiento y el número de animales necesarios para alcanzar el mínimo de precisión estadística.

### Lesión penetrante

Los animales fueron anestesiados con isofluorano al 2% y se colocaron en el estereotáxico (David Kopf Instruments). Para reducir el dolor postquirúrgico, los animales recibieron dos dosis de analgésicos: una inyección i.p. de buprenorfina (1mg/kg; Buprex, Schering Plough) y una inyección s.c. de meloxicam (1mg/kg; Metacam, Boheringer Ingelheim). Tras la inducción de anestesia, se realizó una incisión en la piel y se expuso el cráneo en el que se hizo una apertura unilateral en el hemisferio derecho y se introdujo verticalmente una cuchilla estéril de 2,5 mm hasta una profundidad de 4,5 mm. La parte rostral de la cuchilla estaba colocada a 2,5 mm posterior a Bregma y 1,1 mm lateral. El final se situó a 5,0 mm posterior a Bregma y 3,0

mm lateral. Para contener el sangrado, se utilizó una esponja embebida en espuma hemostática. Estas coordenadas fueron determinadas según el atlas esterotáxico Paxinos y Watson (1998).

### Traumatismo craneoencefálico

Previo al procedimiento, los animales fueron anestesiados mediante vía inhalatoria con 2% de isoflurano. La lesión se indujo con un peso de 50 g desde una altura de 36 cm a lo largo de una barra de acero y se dejó caer sobre el hemisferio derecho. Inmediatamente después de la lesión se procedió a administrar los distintos tratamientos cuando el diseño experimental así lo requiriera y se recuperó a los animales en una jaula individual mantenida a 37° C.

### Tratamientos farmacológicos:

#### a. Lesión penetrante

Inmediatamente antes de la lesión cortical penetrante, los animales recibieron uno de los siguientes tratamientos con las dosis y vías de administración recogidas en las siguientes tablas. Estos tratamientos se repitieron 24 y 48 horas tras la lesión de tal manera que se administraron durante el periodo de activación glial y el sacrificio se realizó una semana más tarde, donde ocurre el pico de expresión de factores inflamatorios y de crecimiento (García-Ovejero et al. 2002).

Tabla 2. Tratamientos realizados en el experimento #1

Tratamiento	Dosis y vía de administración
Vehículo de los antagonistas cannabinoides	Etanol:cremofor:salino (1:1:18). 1 ml/kg; i.p.
Vehículo del 17 $\beta$ estradiol	Aceite de maíz. 1 ml/kg; s.c.
Antagonista del receptor CB1 (AM251 )	Tocris Bioscience. 1 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
Antagonista del receptor CB2 (AM630 )	Tocris Bioscience. 1 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
17 $\beta$ estradiol (E2758)	Sigma-Aldrich. 1 mg/kg; 1 ml/kg; s.c.

Tabla 3. Tratamientos realizados en el experimento #2

Tratamiento	Dosis y vía de administración
Vehículo inhibidor enzima cannabinoide	Etanol:cremofor:salino (1:1:18). 1 ml/kg; i.p.
Vehículo del 17 $\beta$ estradiol	Aceite de maíz. 1 ml/kg; s.c.
URB (inhibidor enzima FAAH)	Tocris Bioscience. 0.3 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
AA-5HT (inhibidor enzima MAGL)	Tocris Bioscience. 5 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
17 $\beta$ estradiol (E2758)	Sigma-Aldrich. 1 mg/kg; 1 ml/kg; s.c.

Tabla 4. Tratamientos realizados en el experimento #3

Tratamiento	Dosis y vía de administración
Vehículo del 17 $\beta$ estradiol	Aceite de maíz. 1 ml/kg; s.c.
17 $\beta$ estradiol (E2758)	Sigma-Aldrich. 1 mg/kg; 1 ml/kg; s.c.
Vehículo del letrozol	Carboximetil celulosa 2,5%; 0.5 mg/kg. s.c.
Letrozol (inhibidor de aromatasa; 4382)	Tocris Bioscience. 0.5 mg/kg; s.c.

### **b. Traumatismo craneoencefálico**

En el momento previo a la lesión, los animales recibieron uno de los tratamientos con las dosis y vías de administración detallados en las siguientes tablas. En el caso de la minociclina, las dosis y protocolo de administración se eligieron en base a estudios previos que habían demostrado que este protocolo ejerce efectos sobre los parámetros estudiados (Homsí et al. 2009; Siopi et al. 2011). En cuanto a la dosis de leptina, se eligió 2 mg/kg en base a un experimento piloto realizado con este mismo modelo y bajo las mismas condiciones de trabajo.

Tabla 5. Tratamientos realizados en el experimento #6

Tratamiento	Dosis y vía de administración
Primera dosis vehículo de Minociclina	Buffer fosfato salino. 10 ml/kg; i.p.
Primera dosis Minociclina	Sigma-Aldrich. 90 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
Segunda dosis vehículo de Minociclina	Buffer fosfato salino. 10 ml/kg; i.p.
Segunda dosis Minociclina	Sigma-Aldrich. 45 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.

Tabla 6. Tratamientos realizados en el experimento #7

Tratamiento	Dosis y vía de administración
Vehículo de los antagonistas cannabinoides	Etanol:cremofor:salino (1:1:18). 1 ml/kg; i.p.
Antagonista del receptor CB1 (AM251 )	Tocris Bioscience. 1 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
Antagonista del receptor CB2 (AM630 )	Tocris Bioscience. 1 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
Primera dosis vehículo de Minociclina	Buffer fosfato salino. 10 ml/kg; i.p.
Primera dosis Minociclina	Sigma-Aldrich. 90 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
Segunda dosis vehículo de Minociclina	Buffer fosfato salino. 10 ml/kg; i.p.
Segunda dosis Minociclina	Sigma-Aldrich. 45 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.

Tabla 7. Tratamientos realizados en el experimento #8

Tratamiento	Dosis y vía de administración
Vehículo del antagonista cannabinoide	Etanol:cremofor:salino (1:1:18). 1 ml/kg; i.p.
Antagonista del receptor CB2 (AM630 )	Tocris Bioscience. 1 mg/kg; 1 ml/kg; i.p.
Vehículo de la leptina	Salino 0.9%. 10 ml/kg; i.p.
Leptina	Biorad. 2 mg/kg; i.p.

## Fijación del tejido e inmunohistoquímica

Para los análisis histológicos, los animales correspondientes al modelo de lesión penetrante y al modelo de TCE fueron anestesiados con una dosis eutanásica de pentobarbital (100 mg/kg, Normon Veterinary Division, Madrid, España) y perfundidos a través del ventrículo izquierdo, primero con 50 ml de solución salina (0,9% NaCl) y luego con 250 ml (rata) o 100 ml (ratón) de solución fijadora (4% paraformaldehído en 0.1 M de tampón fosfato, pH 7.4). Se extrajeron los cerebros y se conservaron en la misma solución fijadora toda la noche a 4° C y tras esto se pasaron a tampón fosfato. Se realizaron secciones coronales de los cerebros con un grosor de 50 µm y fueron obtenidas con el vibratomo (VT 1000 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

La inmunohistoquímica se realizó con los cortes en flotación y agitación suave. Todos los lavados e incubaciones se realizaron con tampón fosfato 0.1M pH 7.4 conteniendo 0.3% albúmina sérica bovina (BSA) y 0.3% triton X-100. Previo a la incubación con los anticuerpos, se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena durante 15 minutos con una solución de 3% de peróxido de hidrógeno y 50% de metanol. Tras varios lavados para eliminar los posibles restos de la solución anterior se incubaron los cortes con el

anticuerpo primario toda la noche, a 4° C y en agitación. Las diluciones para cada uno de ellos se encuentran en la tabla 8.

Tabla 8. Anticuerpos empleados para técnicas de inmunohistoquímica.

Primario	Dilución	Casa
Policlonal conejo anti-GFAP	1:1000	Dako Z0334
Monoclonal ratón anti-Vimentina	1:500	Dako, V9 Clon
Policlonal conejo anti-β-APP	1:1000	Invitrogen 51-2700
Policlonal conejo anti-Iba-1	1:2000	Wako 019-19741

Tras esta primera incubación, los cortes fueron lavados con tampón e incubados 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG biotinilado anti-ratón hecho en cabra (dilución 1:300; Pierce, Rockford, IL, USA). Después de varios lavados, las secciones se incubaron 90 minutos a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (complejo ABC, dilución 1:250. ImmunoPure ABC peroxidase staining kit, Pierce). Tras esto se reveló el producto de la reacción mediante 2 µg/ml 3,3'-diaminobencidina (DAB. Sigma-Aldrich) y 0.01% de peróxido de hidrógeno en tampón fosfato 0.1M. Después, los cortes fueron deshidratados, montados en portas gelatinizados, cubiertos y examinados con el microscopio Leica DMRB-E.

## **Análisis morfométrico:**

### **a. Lesión penetrante**

Para realizar los análisis morfométricos se seleccionaron únicamente los cortes que mostraban una lesión completa desde la zona dorsal a la ventral de la corteza cerebral. Se analizó el número de astrocitos marcados con vimentina en un área localizada a unas 350 µm (Zona I) desde el borde de la lesión y se realizaron contajes para células GFAP positivas (GFAP+) en tres zonas diferentes: 0-350 µm desde el borde de la lesión (Zona I), 350-700 µm (Zona II) y 700-1050 µm (Zona III). Además, el número de células GFAP+ se evaluó en las regiones equivalentes del hemisferio no lesionado. El número de células fue estimado mediante el método del disector óptico (Hatton and von Bartheld 1999) y para ello se utilizó un marco de 55 µm x 55 µm. Se contabilizaron

setenta y ocho marcos por animal. El grosor de las secciones fue medido mediante un calibrador digital (Heidenhain-Metro MT 12/ND221; Traunreut, Alemania) acoplado al microscopio. Todos los contajes se realizaron con un código ciego.

Además se usó un método alternativo para evaluar la reactividad glial mediante la densidad de superficie marcada por vimentina y GFAP en la Zona II. De cada animal se estudiaron al menos dos secciones diferentes. Para ello se usó la gradilla estereológica C16, de acuerdo con el método de intersecciones de Weibel (1979). Se calculó el ratio de superficie inmunoreactiva según la siguiente fórmula:

$$D_s = 2I / L$$

Ds: Densidad de superficie

I: Número de intersecciones inmunoreactivas

L: Longitud de línea de la gradilla (2 mm)

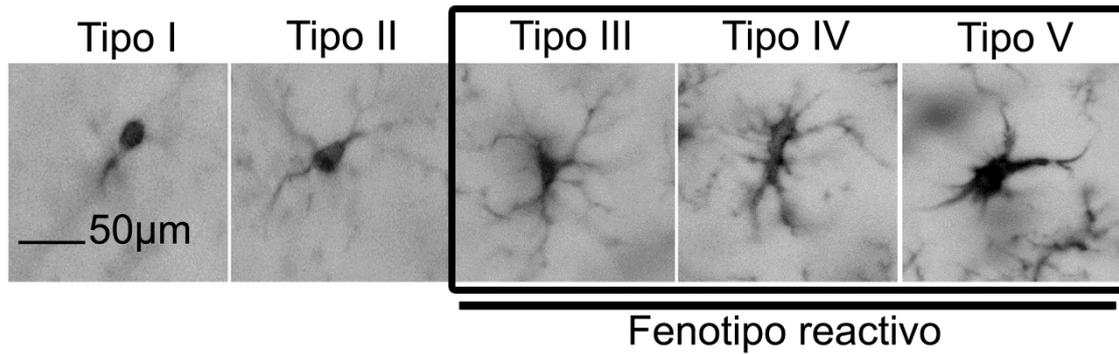
### **b. Traumatismo craneoencefálico**

Se analizaron en código ciego todos los cortes obtenidos entre 2,5 a -2 mm Bregma según el atlas Paxinos y Watson (1998). Se estudiaron 8 animales para cada grupo experimental.

#### **b.1. Reactividad microglial (Iba-1)**

Se estudió el número de células Iba-1 + alrededor de la lesión con una gradilla morfométrica que definía un área de 350 x 350 µm bajo el objetivo 10x del microscopio óptico Leica DMRB.

También se analizó la morfología de las células microgliales al objetivo de 40x, clasificándolas en cinco tipos morfológicos según se detalla en la figura 6 (Diz-Chaves et al. 2012). Para cada animal se analizó un total de cien células en cuatro cortes diferentes en la corteza ventral del hemisferio derecho, rodeando la lesión así como en la zona interhemisferio del cuerpo calloso, coincidiendo con el área estudiada para el daño axonal difuso. Estos tipos se agruparon a su vez en “Fenotipo no-reactivo” (Tipos I y II) y “Fenotipo reactivo” (Tipos III-V).



Tipo morfológico	Descripción
Tipo I	Células con pocos procesos celulares ( $\leq 2$ ).
Tipo II	Células con pocas prolongaciones y cortas (3-5).
Tipo III	Células con numerosas prolongaciones ( $\geq 5$ ), ramificaciones largas y cuerpo celular pequeño y ligeramente triangular.
Tipo IV	Células con el soma retraído, ramificaciones cortas y muy numerosas.
Tipo V	Células de morfología ameboide, ramificaciones cortas y muy numerosas junto con un intenso marcaje Iba-1 +.

Figura 6. Clasificación morfológica de las células microgliales. Basado en trabajos de Diz-Chaves et al. 2012.

### b.2. Daño axonal difuso ( $\beta$ -APP)

El daño axonal difuso se estudió mediante la inmunoreactividad de la proteína precursora de amiloide beta ( $\beta$ -APP) en la zona del interhemisferio del cuerpo calloso. Para cuantificarlo, se empleó la gradilla morfométrica C16 de Weibel (1979) que define un área de 80 x 80  $\mu$ m. El análisis se realizó a través de un monitor conectado al microscopio, con el objetivo de 40x y se anotaron el número de intersecciones de la gradilla con tejido  $\beta$ -APP +.

## Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

### a. Lesión penetrante

Se utilizaron los animales procedentes del experimento #1. Se extrajo el ARN de las cortezas cerebrales usando Trizol® (Gibco BRL Life Technologies, Baltimore, MD) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN se purificó mediante el kit RNeasy mini kit (Qiagen Hilden, Germany) obteniendo una absorbancia A260/280 entre 1.9 y 2.1. De cada muestra se usó 1  $\mu$ g de ARN para la transcripción inversa para obtener

ADN complementario (ADNc) mediante random primers hexámeros y la enzima transcriptasa inversa (RT) del kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Se incluyó un control negativo en las reacciones de la RT en las que no se añadió la enzima.

El ADNc se usó para realizar una PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) en el sistema iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con FastStart Universal SYBR Green Mastermix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Los primers para la reacción de la PCR (Sigma-Proligo France SAS, Paris, France) fueron diseñados según la base de datos para rata del NCBI (tabla 9). La expresión de los genes fue normalizada con el factor de transcripción SP1.

La cuantificación de la expresión fue llevada a cabo con una curva estándar que se hizo a la vez que cada muestra por duplicado. Los estándares fueron purificados y cuantificados por diluciones seriadas. Para obtener los estándares se purificó ARN de tejido del que se sabe que se expresan los genes que estamos analizando. Se hizo una RT para obtener el ADNc que se utilizó para la consiguiente PCR usando los primers específicos que aparecen en la tabla 9. Los productos obtenidos de la PCR fueron purificados mediante el kit high pure PCR product purification (Roche Diagnostic) y se cuantificaron a 260 nm de absorbancia y luego fueron diluidos de forma seriada hasta  $10^{-6}$  pg/ $\mu$ l. Una alícuota del producto de la PCR sin diluir fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 1% para comprobar el tamaño del fragmento y la ausencia de restos contaminantes. Se hicieron ocho pases de las diluciones seriadas desde 10 hasta  $10^{-6}$  pg/ $\mu$ l y fueron analizadas con el sistema iCycler. De entre ellas seleccionaron cinco para hacer la curva estándar.

Tabla 9. Secuencia de los primers utilizados para técnicas de RT-qPCR en rata.

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'
SP1	AGCAGGATGGTTCTGGTCAA	AGGTGATGTTCCCATTCAGG
DAGL- $\alpha$	GGGTACCTAATGGCTGCTCA	AGGACTGACCATCCAACCTG
NAPE-PLD	GGAGCTTATGAGCCAAGGTG	ACTCTCCGTGCTTCAGGATG
FAAH	GTTACAGAGTGGAGAGCTGTC	GAGGGTACTGCAGTCAAAGC
MAGL	CATGGAGCTGGGGAACACTG	GGAGATGGCACCCGCATGGAG
CB1	AGACCTCCTCTACGTGGGCTCG	GTACAGCGATGGCCAGCTGCTG
CB2	GCAGCCTGCTGCTGACTGCTG	TGCTTCCAGAGGACATACCC

**b. Traumatismo craneoencefálico**

**b.1. Homogenización del tejido y extracción de ARN y proteína**

Los animales procedentes del experimento #4 fueron sacrificados por dislocación cervical 24, 72 horas y dos semanas después de la lesión y se extrajo el cerebro. Se tomó una muestra de tejido (75-100 mg) de la zona de alrededor de la lesión (3-0 mm desde Bregma) y se congeló inmediatamente a -80° C hasta su uso. Con este material se procedió a la extracción doble de ARN y proteína mediante el método del Trizol (TRI Reagent® Solution, Ambion), homogenizando las muestras con 1ml de reactivo, siguiendo las instrucciones del fabricante. La fase acuosa se usó para la extracción de ARN y la fase fenólica para la extracción proteica. (Ver página 56 para la continuación del estudio proteico).

**b.2. RT-qPCR:**

Una vez extraído el ARN, se obtuvo la primera cadena de ADNc a partir de 2 µg de ARN utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se amplificaron 5 µl de ADNc mediante RT-qPCR (ABI Prism 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems) con el programa de ciclos recomendado por el fabricante (40 ciclos: 15 segundos a 95° C seguidos de 1 minuto a 60° C). Se empleó la enzima polimerasa SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) cuyos primers fueron diseñados con el programa Primer Express 3.0 de Applied Biosystems y sintetizados por Invitrogen, según aparece en la tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de los primers utilizados para técnicas de RT-qPCR en ratón.

Gen	Forward	Reverse
18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'	5'-CATTCTTGGCAAATGTCTTTTCG-3'
AQP4	5'-CCTGATGTGGAGCTCAAACGT-3'	5'-CCACTTGGCTCCGGTTGT-3'
BACE-1	5'-CAATCAGTCCTTCCGCATCA-3'	5'-TGTGAGACAGCGAACTTGTAACAG-3'
CB1	5'-TGCTGGTGCTATGTGTCATCCT-3'	5'-CAAAGCTGTAGACAAAGATGACACTTC-3'
CB2	5'-TGGTCACCACGCTGAGTGA-3'	5'-CCGCAGGGCGTAAATGATAG-3'
IL-10	5'-CTGGCTCAGCACTGCTATGCT-3'	5'-ACTGGGAAGTGGGTGCAGTT-3'
TGF-β	5'-AGCTGCGCTTGCAAGATTA-3'	5'-AGCAGCCGTTACCAAGGTA-3'
TNF-α	5'-GAAAAGCAAGCAGGCAACCA-3'	5'-CGGATCATGCTTTCTGTGCTC-3'
Vimentina	5'-GCTGCAGGCCAGATTCA-3'	5'-TTCATACTGCTGGCGCACAT-3'

Previo al estudio de estos genes, los primers fueron validados para demostrar que su eficiencia de amplificación fuera la misma que la del gen de control endógeno (18S). El análisis de los datos de la RT-qPCR se hizo según el método  $\Delta\Delta C_t$  (User Bulletin 2 P/N 4303859B, Applied Biosystems) y normalizando con el gen de control 18S (ARNribosomal).

### **Control del peso corporal**

Los animales del experimento #4 se pesaron 24 horas antes de someterse al modelo de TCE y de nuevo justo en el momento antes del sacrificio para caracterizar su bienestar y estado fisiológico general. Este parámetro también puede ser indicativo de la severidad de la lesión teniendo en cuenta que una pérdida de peso entre 5-10% va asociado a una lesión moderada, de 10-20% se considera lesión severa y más del 20% supone un criterio de punto final, según la Directiva 2010/63/EU.

### **Evaluación del daño neurológico (Neurological Score test)**

En los animales de los experimentos #4, #7 y #8 del modelo de TCE se evaluó la recuperación funcional 24, 72 horas y dos semanas tras la lesión. Este test es una variación de otro más extenso y considera diez parámetros esenciales para medir, estos son fáciles de evaluar, objetivos en la interpretación e independientes de la subjetividad del investigador, que en todo momento siguió un código ciego. La prueba comportamental se llevó a cabo en una arena circular de plástico (16 cm de alto y 30 cm de diámetro) iluminado 50-50% con luz blanca y con una apertura de salida (2 x 2.5 cm) que se situaba en el área más iluminada. El animal se colocaba inicialmente en la zona oscura y se le dejaba explorar libremente durante 2 minutos, registrándose los parámetros y puntuaciones detallados en la tabla 11.

Por último, para establecer relaciones del déficit neurológico con otros parámetros analizados, se separaron los datos de este test comportamental en dos grupos: Bajo/Alto déficit. Aquellos animales cuya puntuación fuera igual o mayor que 5 se colocaron en el grupo de bajo déficit y si era menor de 5, se pusieron en el grupo de alto déficit ya que “5” es la puntuación mínima que un animal puede obtener en este test comportamental incluso si no sale del círculo.

Tabla 11. Parámetros estudiados en la prueba de “Neurological Score”, descripción y puntuación.

Tarea	Descripción	Puntos
Salida del círculo	Salida del círculo en menos de 2min. El animal ejecuta tareas de evaluación de riesgo (cabeceo y estiramientos) alrededor de la apertura.	3 puntos
	Salida del círculo en más de 2min. El animal ejecuta tareas de evaluación de riesgo (cabeceo y estiramientos) alrededor de la apertura.	2 puntos
	Salida del círculo en menos de 2min. El animal no ejecuta tareas de evaluación de riesgo (cabeceo y estiramientos) alrededor de la apertura.	1 punto
	El animal no sale del círculo ni ejecuta tareas de evaluación de riesgo (cabeceo y estiramientos) alrededor de la apertura.	0 puntos
Parámetro	Descripción	Sí / No
Alerta	Reacción ante los estímulos, vigilancia. Ojos y orejas alerta.	1 / 0
Postura	Las cuatro patas apoyadas en la jaula. Sin signos de dolor (encorvamiento, piloerección...).	1 / 0
Exploración	Olfatea, explora vertical y horizontalmente.	1 / 0
Blefaroptosis	Caída del párpado superior.	0 / 1
Estereotipias	Presencia de comportamientos repetitivos o maladaptativos.	0 / 1

### Medida de la formación de edema cerebral

En el experimento #7 el edema cerebral se evaluó en el hemisferio ipsilateral a la lesión mientras que en el experimento #4 se hizo en el contralateral puesto que en este diseño experimental se usó el hemisferio ipsilateral para la valoración de parámetros bioquímicos. En todos los casos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo rápidamente el cerebro del que se tomó una muestra (75-100 mg) del hemisferio correspondiente según el diseño (3-0 mm de Bregma). Inmediatamente se pesó el tejido fresco y se mantuvo a 100° C durante 24 horas. Después se pesó de nuevo para obtener el peso seco y la cantidad de edema cerebral se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% H_2O = [(Pf - Ps) / Pf] \times 100$$

Pf: peso fresco

Ps: peso seco

## Valoración de la expresión de proteína por Western Blot

Tras la extracción proteica, se añadió tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 6.8, con 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT 100 mM y azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos. Las proteínas solubilizadas (30 µg) se resolvieron en geles de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 8-10%), a 100 V a temperatura ambiente y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm (Trans-Blot, Bio-Rad) mediante un sistema de transferencia semi-seca a 25 V, 1.0 A y 30 minutos (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad). Tras esto, las membranas fueron bloqueadas con BSA 5% (p/v) en TTBS (138 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8.0, y 0.1% (p/v) Tween-20) a temperatura ambiente durante 3 horas. Después se incubaron toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios diluidos en la misma solución de bloqueo. Las concentraciones se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Anticuerpos utilizados para técnicas de western blot.

Primario	Dilución	Casa
Policlonal conejo anti-CB1	1:1000	Frontier Institute
Policlonal cabra anti-CB2	1:1000	Santa Cruz
Policlonal conejo anti-AQP4	1:1000	Sigma
Policlonal conejo anti-Vimentina	1:1000	Sigma
Monoclonal ratón anti-β actina	1:4000	Sigma

Después las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en TTBS durante 90 minutos a temperatura ambiente. El revelado de la reacción se hizo con ECL quimioluminiscente (Amersham). El densitometrado de las bandas correspondientes se llevó a cabo con el programa Quantity One Bio-Rad y los datos se normalizaron con β actina como control de carga y se representaron como porcentajes relativos al grupo control.

## Espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Se evaluaron los niveles de endocannabinoides para los experimentos #5 y #6 mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para ello se tomaron muestras de cerebro (75-100 mg) de la zona circundante a la lesión penetrante y a la lesión cerrada así como del hemisferio contralateral.

Las muestras se lisaron y homogenizaron y se procedió a la extracción lipídica en una mezcla de reactivos deuterados que contenía 100 µg/ml de anandamida (AEA) y 2-araquidonoil glicerol (2-AG) diluidos en acetonitrilo 100%. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 14000 rpm y se conservó el supernadante que fue evaporado 2 horas a 50 ° C. Tras esto, se hicieron diluciones seriadas 1:4 en acetonitrilo y se añadió solución madre no deuterada que contenía 0.5 µg/ml de AEA y 5 µg/ml de 2-AG para hacer una curva de 11 puntos. Se liofilizaron las muestras siguiendo el mismo protocolo anterior y se reconstituyeron en acetonitrilo 65% para proceder a su análisis. Las muestras reconstituidas se transfirieron al sistema Agilent 1100 HPLC acoplado a un triple cuádruple espectrómetro de masas 6460 (Agilent Technologies, UK). Las columnas empleadas para la cromatografía fueron Zorbax® C18 (150 × 0.5 mm de diámetro interno); la fase móvil consistía en un gradiente de HPLC de H<sub>2</sub>O con ácido fórmico 0.1% y acetonitrilo con ácido fórmico 0.1% y se usó un flujo mantenido de 12µl/min. Los picos obtenidos se analizaron con el programa informático MassHunter (Agilent Technologies, UK).

### **Valoración de niveles de leptina en plasma por ELISA**

Se estudiaron los niveles de leptina plasmática en los animales del experimento #8 mediante la técnica de inmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). La sangre se obtuvo del tronco mediante exanguinación y se recogió en tubos heparinizados. Después se centrifugaron 15 minutos, a 3000 rpm y 4° C para obtener el plasma que se analizó con el kit B-Bridge Mouse/Rat Leptin ELISA, siguiendo las recomendaciones de uso del fabricante.

El plasma se diluyó 1:5 y se cargó en placas de 96 pocillos por duplicado junto con los controles de calidad y la curva patrón. Las incubaciones con el anticuerpo primario (monoclonal de ratón anti-leptina), anticuerpo secundario (policlonal de ratón anti-monoclonal de ratón para leptina) y la solución estreptoavidina-HRP conjugado se realizaron a temperatura ambiente y en agitación (300 rpm). Por último se incubó durante 10 minutos con el sustrato de peroxidasa tetrametilbenzidina (TMB), se paró la reacción con la solución Stop del kit y se procedió a la lectura de absorbancias a 450 nm (Thermo Scientific, Multiskan Fc Software). La sensibilidad del kit es 0.5 ng/ml y presenta unos coeficientes de variación de 6.5% inter-ensayo y 3.7% intra-ensayo.

### Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete informático SPSS, versión 19-21 y los datos se representaron en las gráficas como las medias + el error estándar de la media (EEM). El tamaño muestral se detalla en las gráficas para cada uno de los diferentes experimentos.

Previo a la aplicación de cualquier test estadístico se comprobó la asunción de los supuestos de normalidad llevando a cabo el test de Kolmogórov-Smirnov con la corrección del test de Lilliefors. Si los datos eran normales y se quería hacer la comparación de medias de tres o más grupos, se usó ANOVA de una, dos o tres vías dependiendo del diseño experimental. Tras esto, se comprobó la homocedasticidad de los datos mediante el test de Levene. Cuando los datos eran homocedásticos, se continuaba con el test de Bonferroni como post-hoc o en caso contrario, se empleaba Games-Howell. Si los datos no eran normales, se transformaron con el logaritmo natural, si aun así, no cumplían el supuesto de normalidad, se analizaron con tests no-paramétricos. Primero Kruskal-Wallis seguido de U-Mann Whitney. Cuando era necesaria la comparación de únicamente dos medias, se empleó t-Student. Todos los análisis se realizaron con un nivel de significación  $p < 0.05$ .

Para las correlaciones, todos los datos fueron unificados para su análisis con el test de Spearman para identificar correlaciones bivariantes seguido de un análisis de regresión lineal para hallar la ecuación de la misma con un nivel de significación  $p < 0.05$ .

**Resultados**

**Resultados**



## Experimento #1: Implicación de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en los efectos neuroprotectores del estradiol.

Se realizaron lesiones corticales penetrantes en ratas Wistar macho adultas a las que se administraron tratamientos de estradiol (1 mg/kg); AM251, antagonista del receptor CB1 (1 mg/kg); AM630, antagonista del receptor CB2 (1 mg/kg) y sus combinaciones, según se detalla en el diseño experimental (página 39). Por técnicas inmunohistoquímicas se valoró el número de células y la densidad de superficie marcada con GFAP como marcador de astrocitos totales y vimentina como marcador de astrocitos reactivos. Además, en un segundo bloque del experimento, se evaluaron los cambios en los niveles de ARNm de las enzimas cannabinoides monoacilglicerol lipasa (MAGL) y N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) y del receptor cannabinoide CB2 por RT-PCR en animales intactos y lesionados y tratados con estradiol.

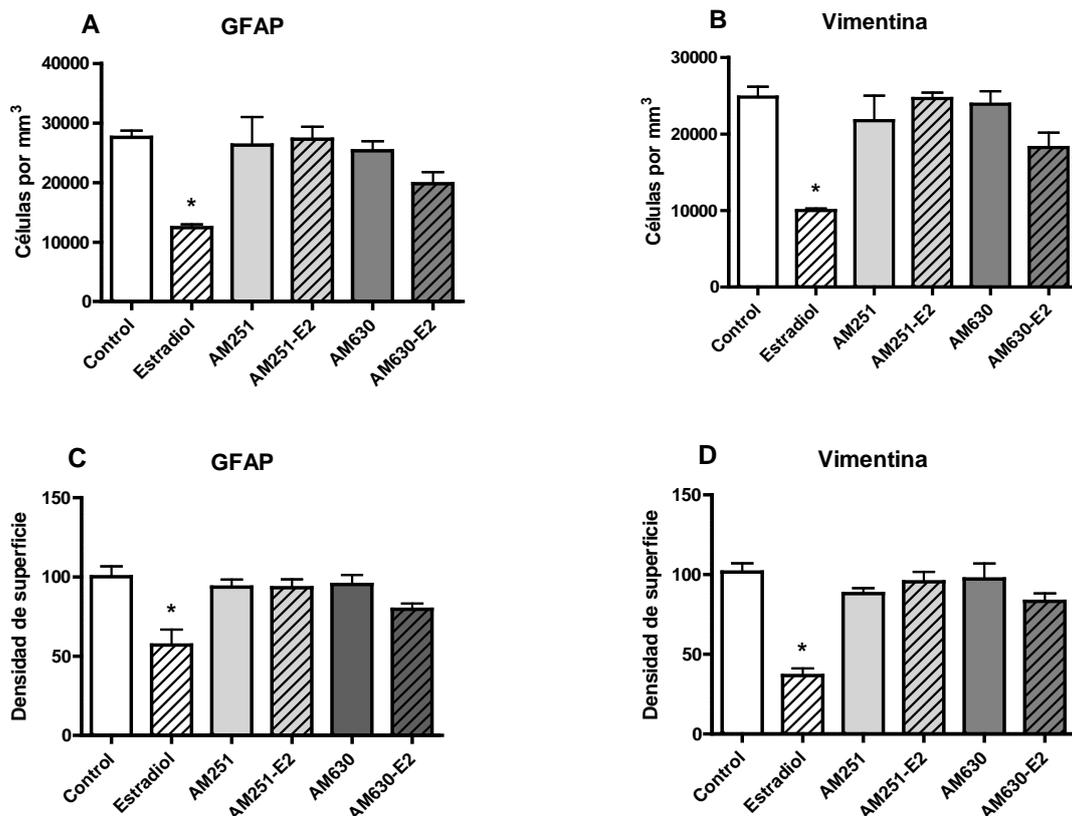


Figura 7. Resultados cuantitativos en el hemisferio lesionado del número de células inmunorreactivas (A y B) y para la densidad de superficie (C y D) de GFAP y Vimentina, respectivamente. Control, intacto; Estradiol, lesión+estradiol; AM251, lesión+antagonista CB1; AM251-E2, lesión+antagonista CB1+estradiol; AM630, +antagonista CB2; AM630-E2, lesión+antagonista CB2+estradiol ( $p < 0.05$ ).

En la figura 7 se muestra como el tratamiento con estradiol disminuyó de forma significativa el número de células por  $\text{mm}^3$  reactivas para GFAP (figura 7A) y vimentina (figura 7B) así como la densidad de superficie para ambos marcadores en el hemisferio lesionado (figuras 7C y D, respectivamente). En todas las mediciones con ambos anticuerpos se observó que el estradiol perdía su efecto antigliótico cuando se administraba de forma conjunta con cualquiera de los dos antagonistas cannabinoides, como se observa en las micrografías y los detalles de las figuras 8, 9 y 10.

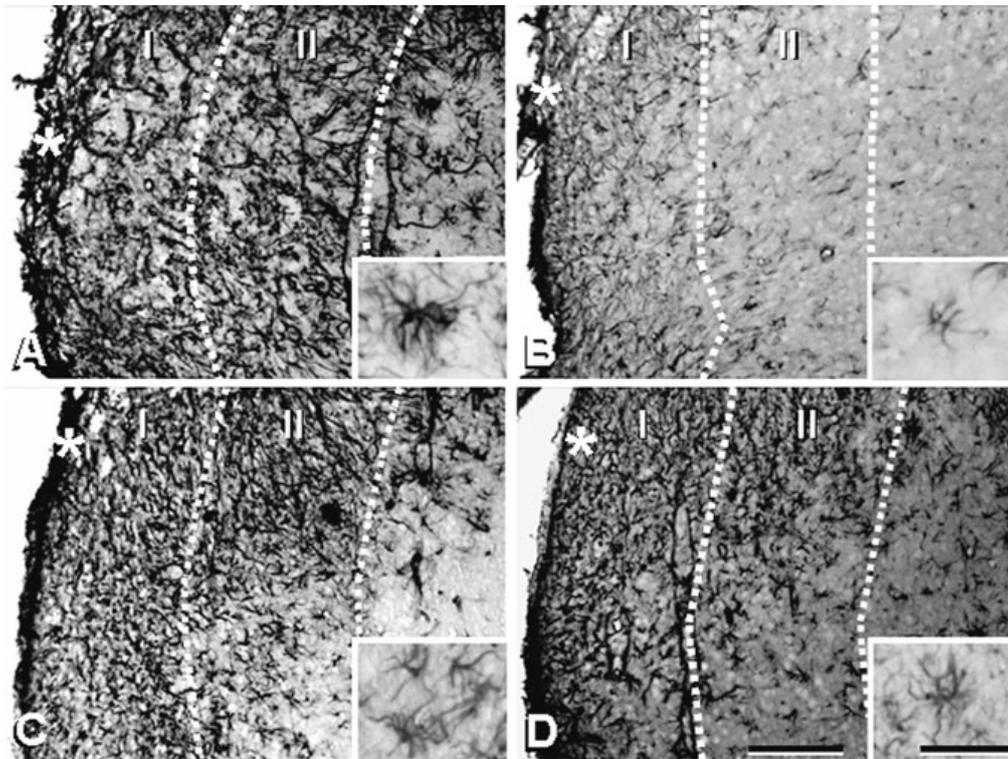


Figura 8. Micrografías representativas del hemisferio lesionado marcadas con vimentina tras la administración de los vehículos (A), estradiol (B), estradiol+antagonista CB1 (C) y estradiol+antagonista CB2 (D). Los asteriscos indican el borde de la lesión. Los recuadros muestran detalles de las células marcadas con vimentina a gran aumento. Las líneas discontinuas delimitan las regiones de la corteza cerebral próximas a la lesión en las que se evaluó el número de células inmunorreactivas (Zona I) y la densidad de superficie (Zona II). Las barras de escala representan  $200 \mu\text{m}$  en las figuras principales y  $50 \mu\text{m}$  en los recuadros.

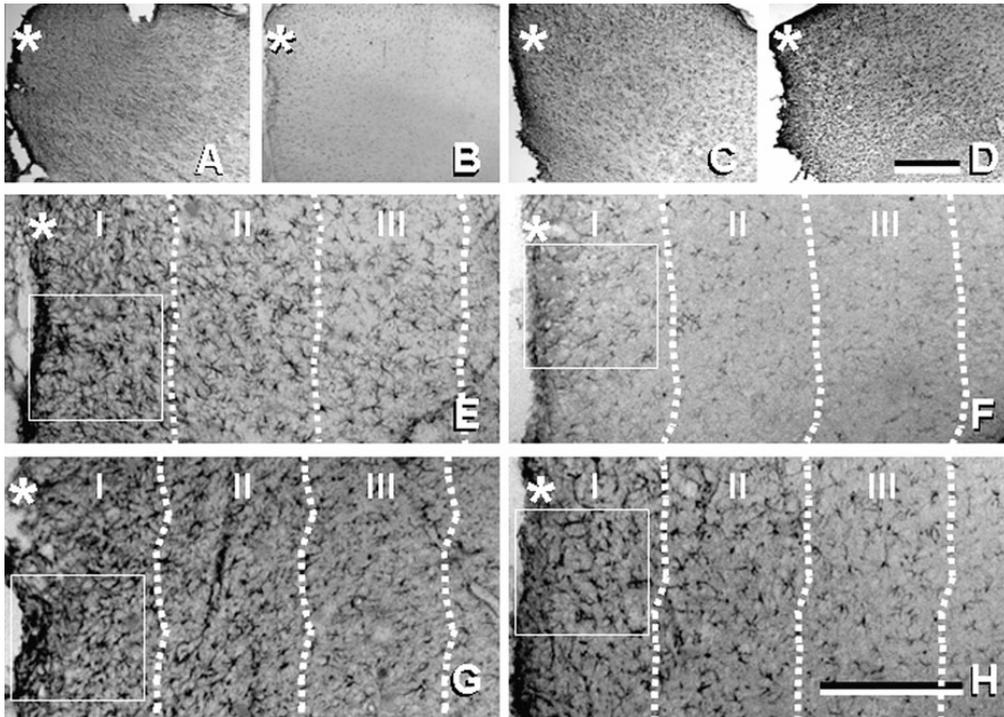


Figura 9. Micrografías representativas del hemisferio lesionado marcadas con GFAP tras la administración de los vehículos (A, E), estradiol (B, F), estradiol+antagonista CB1 (C, G) y estradiol+antagonista CB2 (D, H). Las regiones remarcadas en los paneles E-H se muestran a gran aumento en la figura 10. Las líneas discontinuas limitan las tres zonas en las cuales se evaluó el número de células inmunorreactivas para GFAP. Los asteriscos indican el borde de la lesión. Las barras de escala representan 600  $\mu\text{m}$  para los paneles A-D y 350  $\mu\text{m}$  para los paneles E-H.

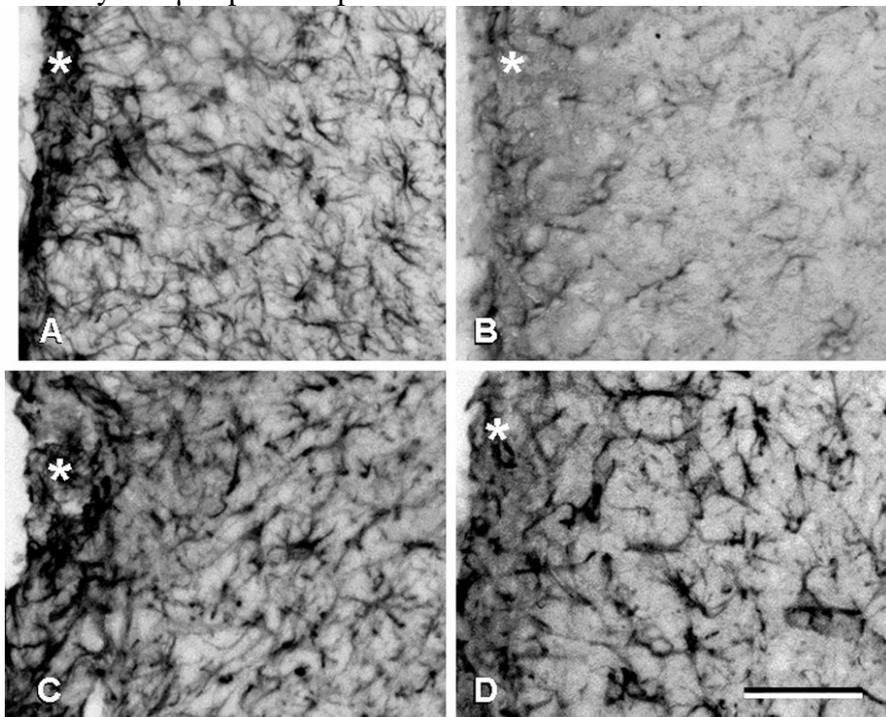


Figura 10. Detalle de las células inmunorreactivas para GFAP en la proximidad del borde de la lesión (la localización está indicada en la figura 9). (A) Vehículos, (B) Estradiol, (C) Estradiol+antagonista CB1, (D) Estradiol+antagonista CB2. Los asteriscos indican el borde de la lesión. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

## Resultados

Los niveles de expresión de ARNm de las enzimas de degradación de endocannabinoides también se vieron afectados por la lesión penetrante, como se muestra en la figura 11. MAGL y NAPE-PLD disminuyeron significativamente tras la lesión mientras que el tratamiento con estradiol tras la lesión revirtió esta disminución. En el caso de los niveles de ARNm del receptor CB2 se observó un aumento significativo de su expresión en todos los grupos en comparación con el grupo control (animales intactos y tratados con vehículos). Los animales lesionados tratados con estradiol presentaron un aumento del ARNm de CB2 muy marcado, alcanzando niveles significativamente diferentes a los del resto de grupos experimentales.

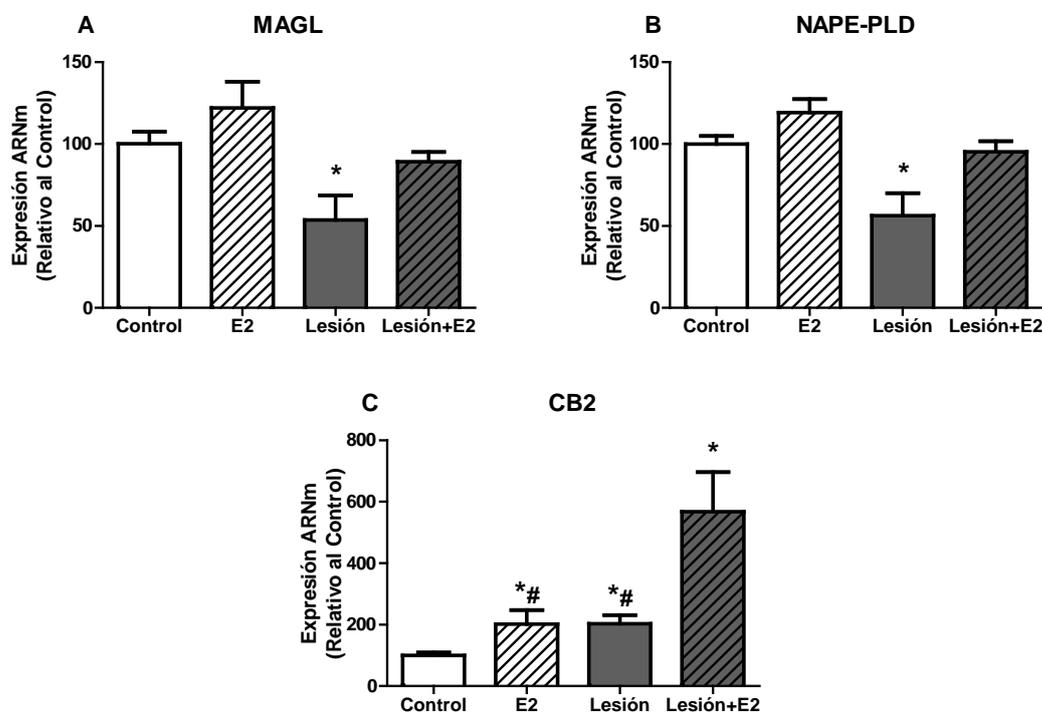


Figura 11. Efectos de la lesión penetrante en presencia y ausencia de estradiol (E2) sobre los niveles de expresión de ARNm de las enzimas (A) monoacilglicerol lipasa (MAGL), (B) N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) y (C) del receptor cannabinoide (CB2) en el hemisferio ipsilateral a la lesión. Control, intacto; E2, intacto+estradiol; Lesión, lesión+vehículo; Lesión+E2, lesión+estradiol. \*, diferencia significativa respecto al grupo control; #, diferencia significativa respecto al grupo Lesión+E2 ( $p < 0.05$ ).

## Experimento #2: Implicación de las enzimas endocannabinoides MAGL y FAAH en los efectos neuroprotectores del estradiol.

Tras los primeros resultados obtenidos en el experimento #1 y viendo que los niveles de ARNm de enzimas y de receptores cannabinoides se veían afectados por la lesión penetrante, se procedió a realizar un protocolo de lesiones similar, combinando el tratamiento de estradiol (1 mg/kg) con inhibidores de las principales enzimas cannabinoides: la hidrolasa de amidas y ácidos grasos (FAAH) con el compuesto URB597 (1 mg/kg) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) con araquidonoil serotonina (AA-5HT) (1 mg/kg) como se detalla en el diseño experimental (página 39). Por técnicas inmunohistoquímicas se valoró el número de células inmunoreactivas para GFAP como marcador del número de astrocitos totales y de vimentina para los astrocitos reactivos, como se representa en la figura 12

Los resultados obtenidos replicaron los experimentos anteriores, mostrando cómo el estradiol disminuyó significativamente el número de células inmunorreactivas para GFAP y vimentina. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el co-tratamiento con ninguno de los dos inhibidores de las enzimas cannabinoides.

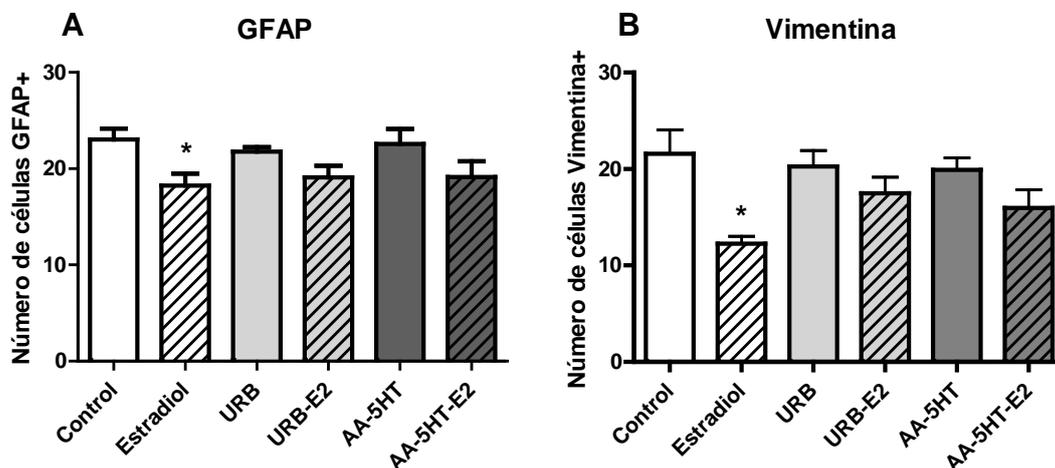


Figura 12. Resultados cuantitativos del número de células inmunorreactivas para GFAP (A) y Vimentina (B) en el hemisferio lesionado. \*, diferencia significativa respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

### Experimento #3: Efecto de la lesión penetrante en presencia y ausencia de estradiol o letrozol sobre los niveles de endocannabinoides.

Puesto que los resultados del experimento #2 sugerían que la posible interacción del estradiol con el sistema endocannabinoide no era a través de las enzimas de degradación MAGL o FAAH, se planteó el experimento #3 para ver si los niveles de endocannabinoides en cerebro se veían afectados por una lesión penetrante y por la síntesis de estradiol. Para ello se usó el mismo modelo de lesión penetrante en ratas Wistar macho adultas y se trataron con estradiol (1 mg/kg) y letrozol (0.5 mg/kg), un inhibidor de la aromatasas que bloquea la conversión de testosterona a estradiol, como se explica en el diseño experimental (página 40).

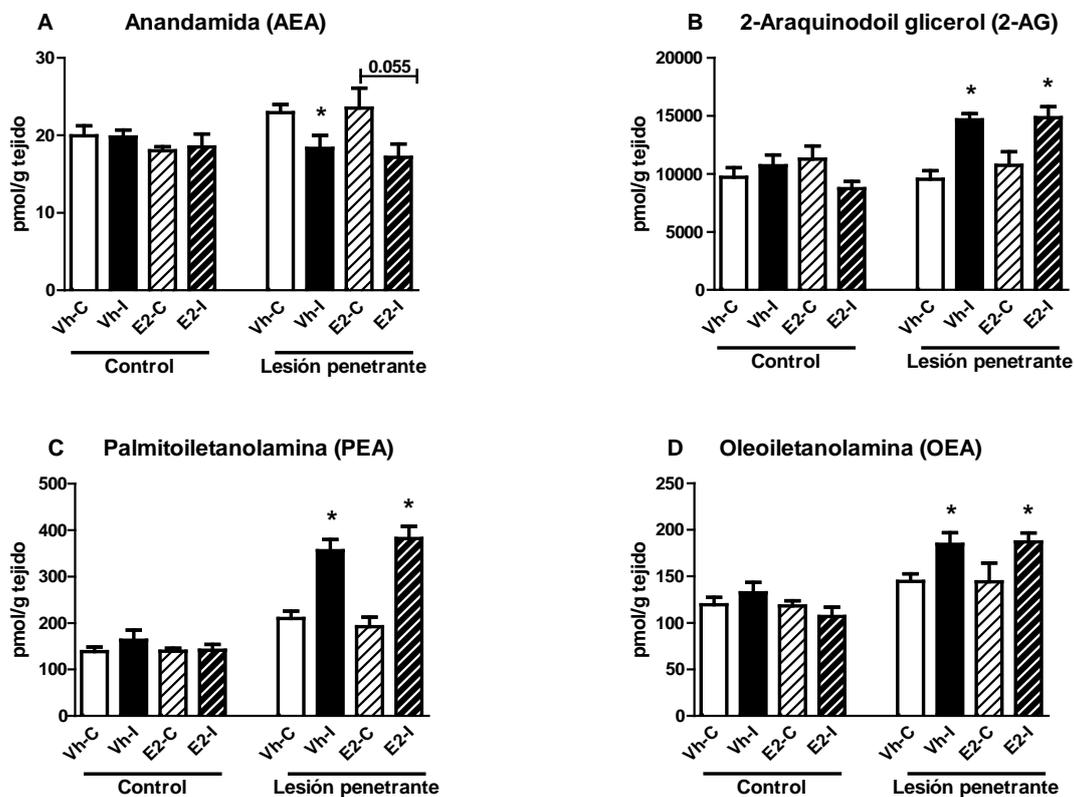


Figura 13. Efecto de la lesión penetrante en presencia y ausencia de estradiol sobre los niveles de endocannabinoides tras una lesión cortical penetrante en ratas Wistar macho adultas. Vh, Vehículo; E2, Estradiol; C, contralateral; I, ipsilateral. Anandamida, AEA (A); 2-araquidonoil glicerol, 2-AG (B); palmitoiletanolamina, PEA (C) y oleoiletanolamina, OEA (D). \*, diferencia significativa respecto a su grupo contralateral ( $p < 0.05$ ).

La lesión penetrante indujo cambios en los niveles de todos los endocannabinoides medidos en el hemisferio ipsilateral a la lesión pero ninguno de ellos se vio modificado por el tratamiento con estradiol. Los niveles de anandamida (AEA) disminuyeron mientras que 2-Araquidonoil glicerol (2-AG), palmitoiletanolamina (PEA) y oleoiletanolamina (OEA) aumentaron significativamente con respecto al hemisferio contralateral (figura 13).

Respecto al tratamiento con letrozol, inhibidor de la aromatasa, se obtuvieron resultados muy similares a los observados con el tratamiento con estradiol, como se muestra en la figura 14. La lesión penetrante indujo cambios en los niveles de endocannabinoides que no fueron alterados por el tratamiento con letrozol. Los niveles de AEA disminuyeron mientras que 2-AG y PEA aumentaron significativamente en comparación con el hemisferio contralateral.

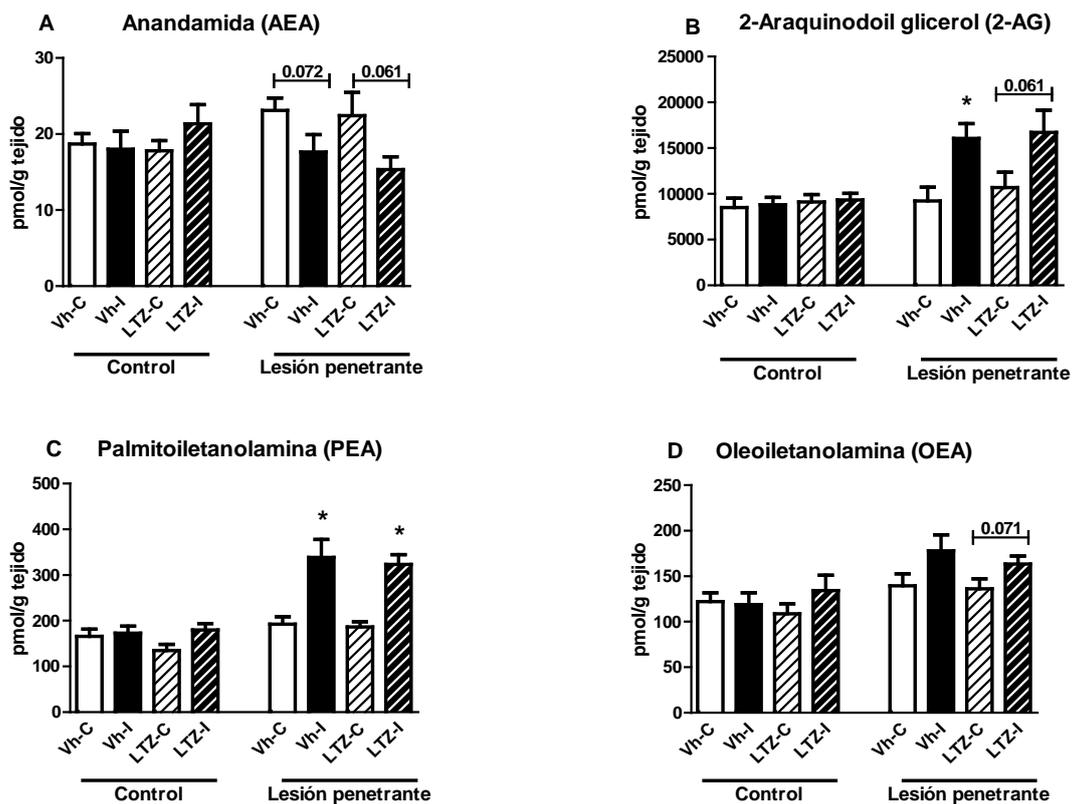


Figura 14. Efecto de la lesión penetrante en presencia y ausencia de letrozol sobre los niveles de endocannabinoides tras una lesión cortical penetrante en ratas Wistar macho adultas. Vh, Vehículo; LTZ, Letrozol; C, contralateral; I, ipsilateral. Anandamida, AEA (A); 2-araquidonoil glicerol, 2-AG (B); palmitoiletanolamina, PEA (C) y oleoiletanolamina, OEA (D). \*, diferencia significativa respecto a su grupo contralateral ( $p < 0.05$ ).

## Resultados

Al analizar estos mismos datos comparando ambos tratamientos en la misma gráfica (figura 15), se observó que no existen diferencias entre la administración de estradiol y letrozol, indicando que la interacción del sistema endocannabinoide con el estradiol tampoco cursa a través de la regulación de la síntesis de estradiol.

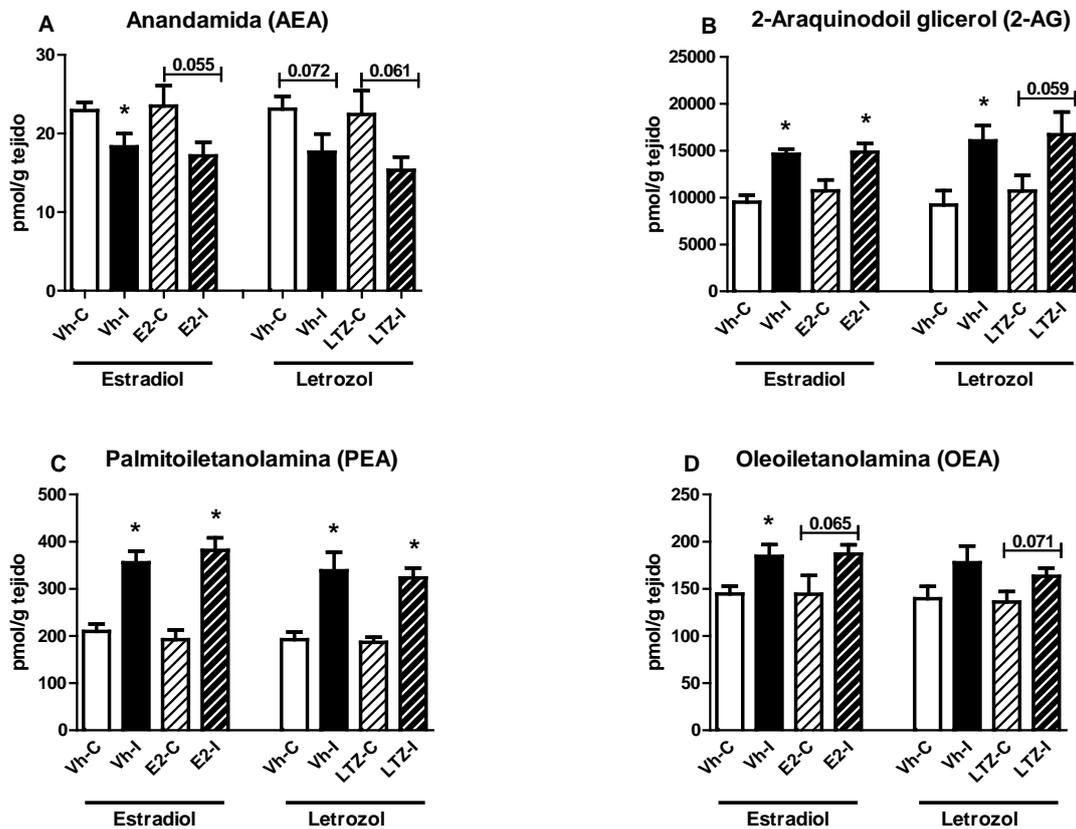


Figura 15. Efecto de la lesión penetrante en presencia y ausencia de estradiol o letrozol sobre los niveles de endocannabinoides tras una lesión cortical penetrante en ratas Wistar macho adultas. Vh, Vehículos; E2, Estradiol; LTZ, Letrozol; C, contralateral; I, ipsilateral. Anandamida, AEA (A); 2-araquidonoil glicerol, 2-AG (B); palmitoiletanolamina, PEA (C) y oleoiletanolamina, OEA (D). \*, diferencia significativa respecto a su grupo contralateral ( $p < 0.05$ ).

En conjunto, los experimentos #1, 2 y 3 con el modelo de lesión penetrante en ratas Wistar macho adultas sugieren que la interacción del sistema endocannabinoide con el estradiol no se debe a la actividad de las enzimas endocannabinoideas de degradación ni a modificaciones en los niveles de endocannabinoides en cerebro, así como tampoco está relacionado con modificaciones debidas a la síntesis de estradiol sino que parece que la interacción de estos dos sistemas es a través de los receptores CB1 y CB2.

#### **Experimento #4: Perfil temporal de cambios moleculares y correlaciones con daño neurológico y edema tras un traumatismo craneoencefálico (24h-2semanas).**

La segunda parte de esta Tesis Doctoral (experimentos #4-8) se centró en un modelo de lesión cerrada en ratón que nos permitiera analizar los efectos de los traumatismos craneoencefálicos (TCE) que son más cercanos a la realidad clínica. Se realizaron TCE con el modelo de caída libre de peso en ratones macho de la cepa CD1, según se detalla en el diseño experimental (página 40). A pesar de ser un modelo ampliamente utilizado, aún hay muchos parámetros que no han sido caracterizados a medio y largo plazo por lo que se planteó el estudio de un perfil temporal más amplio, cubriendo desde las 24 horas hasta las dos semanas después de la lesión. Se estudiaron por técnicas moleculares los cambios en sistema endocannabinoide (receptores CB1 y CB2), proteínas de barrera hematoencefálica (AQP4) y marcadores de neuroinflamación (vimentina).

Inicialmente se usaron 45 machos de los cuales 20 fueron lesionados. En los 5 primeros minutos después del TCE se observó una tasa de mortalidad de 10.53% que es comparable a la obtenida en otros estudios que han empleado este modelo.

Se estudió el porcentaje de cambio de peso (figura 16A). Los animales control mostraron una curva de crecimiento normal, acorde con su edad. En los lesionados se observó una disminución significativa con respecto a los controles que se mantuvo hasta 72 horas después de la lesión aunque también presentaron un aumento progresivo del peso según su edad.

El porcentaje de agua en tejido cerebral está representado en la figura 16B. La formación de edema aumentó a las 24 y 72 horas después del TCE y se recuperaron los niveles de los animales control a las dos semanas tras la lesión. Se observó el mismo patrón de cambios en el test neurológico (figura 16C) en el que se vio una disminución significativa de la puntuación obtenida a las 24 y 72 horas tras el TCE. Por último, los resultados del porcentaje de edema fueron separados en dos grupos dependiendo de su puntuación en el test neurológico: Bajo/Alto déficit (figura 16D). Se observó que los animales con alto déficit neurológico eran aquellos que presentaban un porcentaje más elevado de edema cerebral.

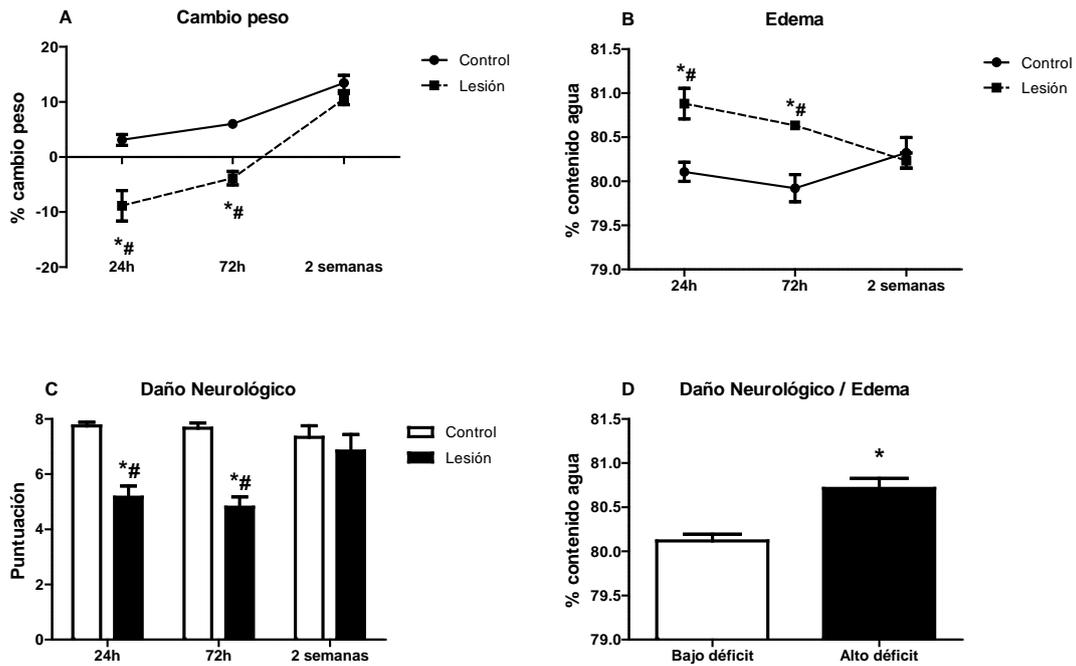


Figura 16. Efectos del traumatismo craneoencefálico sobre el peso corporal, formación de edema y daño neurológico a las 24, 72 horas y dos semanas tras el traumatismo. A) Porcentaje de cambio de peso. B) Edema cerebral. C) Déficit neurológico. D) Edema cerebral en los animales clasificados según su déficit neurológico. Los histogramas se representan + EEM. \*  $p < 0.05$  frente al grupo control del mismo tiempo; #  $p < 0.05$  frente al grupo de dos semanas del mismo tratamiento.

Los datos relativos a los cambios observados en el receptor CB1 se muestran en la figura 17. Después del TCE los niveles de ARNm y de proteína disminuyeron de forma significativa hasta 72 horas tras el TCE y después recuperaron valores equivalentes a los animales control (figuras 17A y D). Tanto los niveles de expresión de ARNm como los de proteína mostraron una correlación negativa con el porcentaje de formación de edema (figuras 17B y E) y también se observó una relación con el déficit neurológico (figuras 17C y F) siendo los animales con alto déficit los que presentaban menores niveles de receptor CB1.

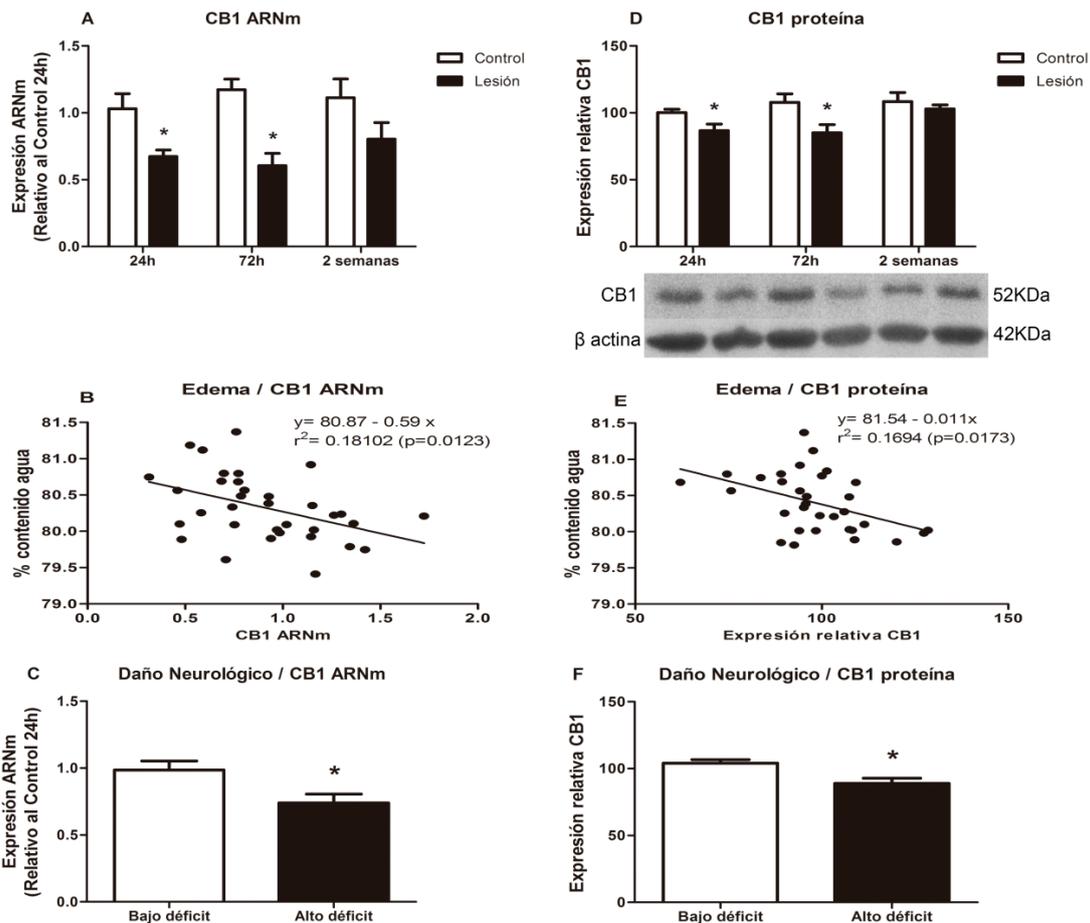


Figura 17. Efectos del traumatismo craneoencefálico sobre los niveles de expresión de ARNm y proteína del receptor CB1 a las 24, 72 horas y dos semanas tras el traumatismo. A) Niveles de ARNm de CB1. B) Análisis de correlación entre edema y niveles de ARNm de CB1. C) Niveles de ARNm de CB1 clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. D) Niveles de proteína de CB1. E) Análisis de correlación entre edema y niveles de proteína de CB1. F) Niveles de proteína de CB1 clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. Los histogramas se representan + EEM. \*  $p < 0.05$  frente al grupo control del mismo tiempo.

Con respecto al receptor CB2, los resultados se recogen en la figura 18. Los niveles de ARNm aumentaron progresivamente hasta dos semanas después del TCE (figura 18A) mientras que este aumento en la expresión de proteína sólo se observó 24 horas tras la lesión (figura 18D). En ninguno de los casos se pudo establecer una correlación con la formación de edema (figuras 18B y E) pero sí se vio una relación de los niveles de CB2 y el déficit neurológico: los animales con alto déficit, mostraban una mayor expresión de CB2 (figuras 18C y F).

## Resultados

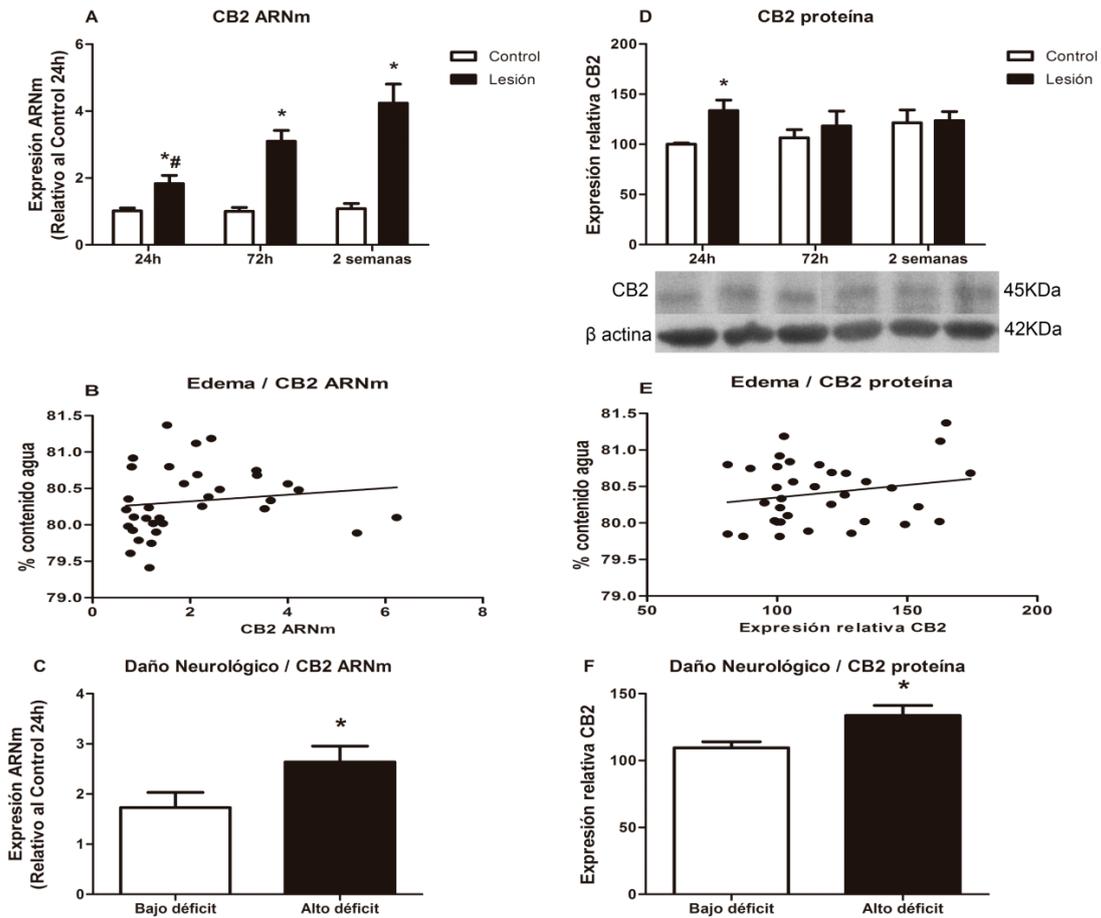


Figura 18. Efectos del traumatismo craneoencefálico sobre los niveles de expresión de ARNm y proteína del receptor CB2 a las 24, 72 horas y dos semanas tras el traumatismo. A) Niveles de ARNm de CB2. B) Análisis de correlación entre edema y niveles de ARNm de CB2. C) Niveles de ARNm de CB2 clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. D) Niveles de proteína de CB2. E) Análisis de correlación entre edema y niveles de proteína de CB2. F) Niveles de proteína de CB2 clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. Los histogramas se representan + EEM. \*  $p < 0.05$  frente al grupo control del mismo tiempo; #  $p < 0.05$  frente al grupo de dos semanas del mismo tratamiento.

El perfil temporal de la AQP4 se representa en la figura 19. Los niveles de ARNm aumentaron 24 horas después de la lesión (figura 19A) y este aumento se mantuvo hasta las 72 horas en el caso de la expresión de proteína (figura 19D). En ambos casos, se observó una correlación positiva con la formación de edema (figuras 19B y E) y una relación con el déficit neurológico, mostrando mayor déficit los animales con unos niveles más altos de AQP4 (figuras 19C y F).

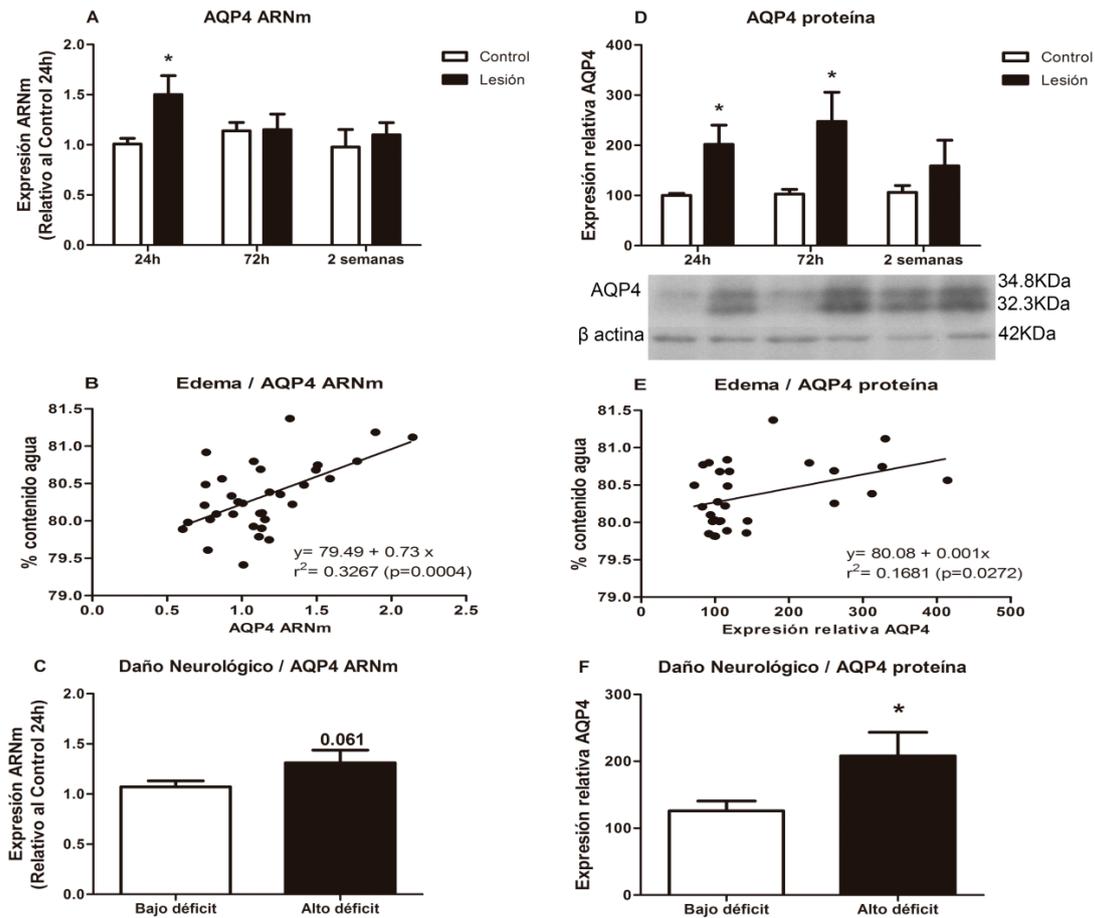


Figura 19. Efectos del traumatismo craneoencefálico sobre los niveles de expresión de ARNm y proteína del receptor AQP4 a las 24, 72 horas y dos semanas tras el traumatismo. A) Niveles de ARNm de AQP4. B) Análisis de correlación entre edema y niveles de ARNm de AQP4. C) Niveles de ARNm de AQP4 clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. D) Niveles de proteína de AQP4. E) Análisis de correlación entre edema y niveles de proteína de AQP4. F) Niveles de proteína de AQP4 clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. Los histogramas se representan + EEM. \*  $p < 0.05$  frente al grupo control del mismo tiempo.

Por último, en la figura 20 se representan los cambios relativos a vimentina. Los niveles de expresión de ARNm (figura 20A) así como los de proteína (figura 20D) aumentaron significativamente hasta 72 horas después del TCE. En ambos parámetros se observó una correlación positiva con la formación de edema (figuras 20B y E) y una relación con el déficit conductual, de forma que los animales con alto déficit neurológico presentaban niveles más altos de vimentina (figuras 20C y E).

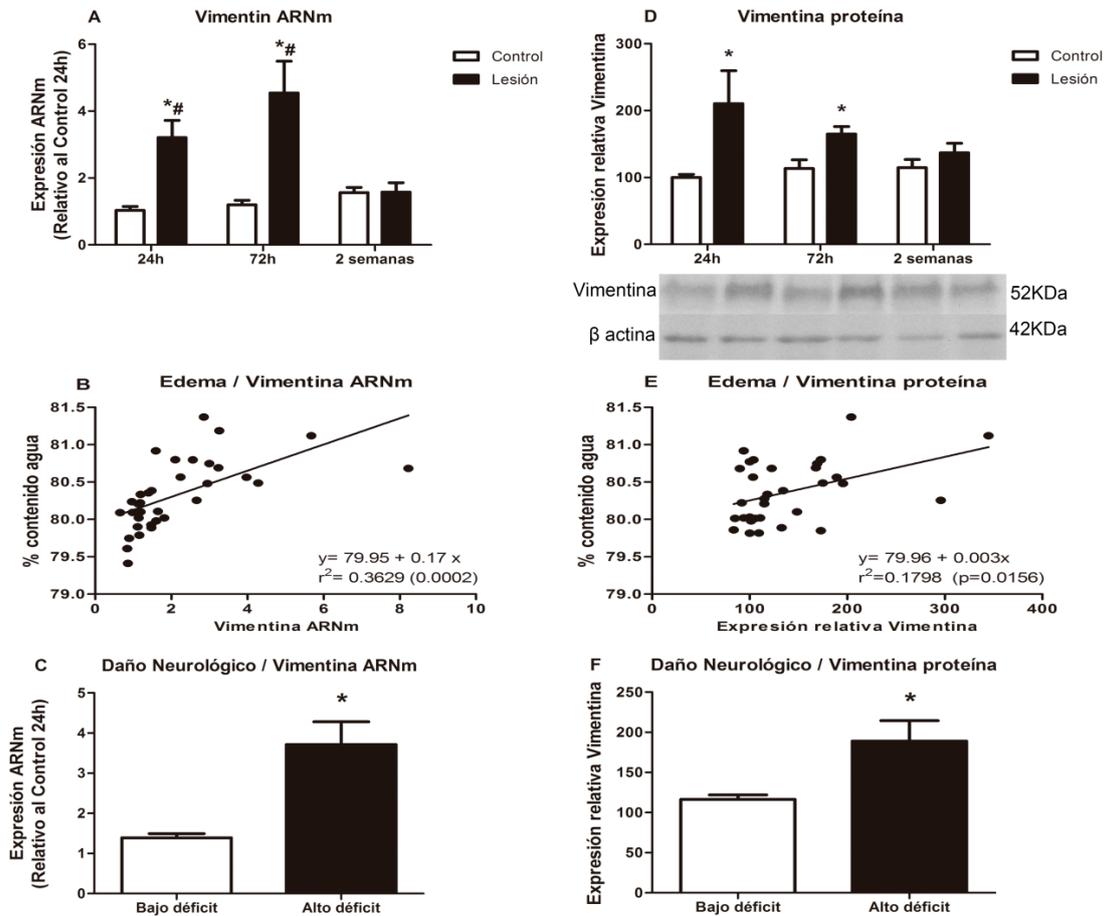


Figura 20. Efectos del traumatismo craneoencefálico sobre los niveles de expresión de ARNm y proteína del receptor vimentina a las 24, 72 horas y dos semanas tras el traumatismo. A) Niveles de ARNm de vimentina. B) Análisis de correlación entre edema y niveles de ARNm de vimentina. C) Niveles de ARNm de vimentina clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. D) Niveles de proteína de vimentina. E) Análisis de correlación entre edema y niveles de proteína de vimentina. F) Niveles de proteína de vimentina clasificados de acuerdo con el déficit neurológico. Los histogramas se representan + EEM. \*  $p < 0.05$  frente al grupo control del mismo tiempo.

### Experimento #5: Perfil temporal (3-48 horas) de los niveles de endocannabinoides tras un traumatismo craneoencefálico.

Puesto que el experimento #4 indicaba que algunos de los componentes del SEC se veían modificados tras un TCE y viendo que los mayores cambios se producían 24 horas tras la lesión, se analizaron mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS) las variaciones en los niveles cerebrales de endocannabinoides (ECB) en tiempos más cortos, abarcando la ventana temporal de 3-48 horas tras la lesión, como se detalla en el diseño experimental (página 40). En la figura 21 se observa que la AEA, PEA y OEA

aumentaron de forma significativa a las 6 horas tras la lesión con respecto al tiempo de 3 horas, manteniéndose estas dos últimas elevadas hasta 24 horas tras el traumatismo. 2-AG no varió de forma significativa después del TCE.

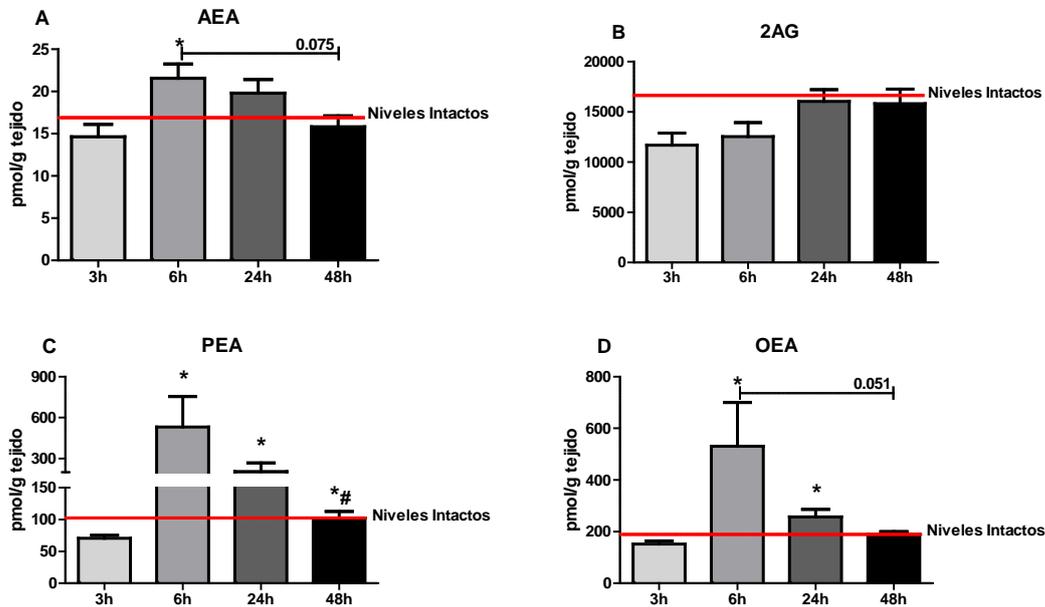


Figura 21. Perfil temporal de los niveles de endocannabinoides tras un traumatismo craneoencefálico. Anandamida, AEA (A); 2-araquidonoil glicerol, 2-AG (B); palmitoiletanolamina, PEA (C) y oleoiletanolamina, OEA (D). La línea roja indica los niveles de endocannabinoides de los animales intactos. \*, diferencia significativa respecto al grupo lesionado 3h; # versus grupo lesionado 6h ( $p < 0.05$ ).

## Experimento #6: Efecto de la minociclina sobre los niveles de endocannabinoides después de un traumatismo craneoencefálico.

Los resultados del experimento #5 indicaban que el tiempo de 6 horas tras la lesión era donde se observaban mayores cambios en los niveles de ECB por lo que se seleccionó este tiempo para estudiar cómo afectaba la acción de un compuesto neuroprotector (Minociclina, 90mg/kg inmediatamente después de la lesión y 45mg/kg, 3 horas tras la lesión) a los niveles de ECB, según se detalla en el diseño experimental (página 41). Los resultados obtenidos por espectrometría de masas se recogen en la figura 22, en la que se muestra que la minociclina no tiene efecto *per se* en animales intactos excepto en los niveles de 2-AG, que se vieron disminuidos. En animales lesionados, la minociclina disminuyó significativamente los niveles de AEA, PEA y

OEA (figura 22A, C y D respectivamente) mientras que los niveles de 2-AG no se modificaron (figura 22B).

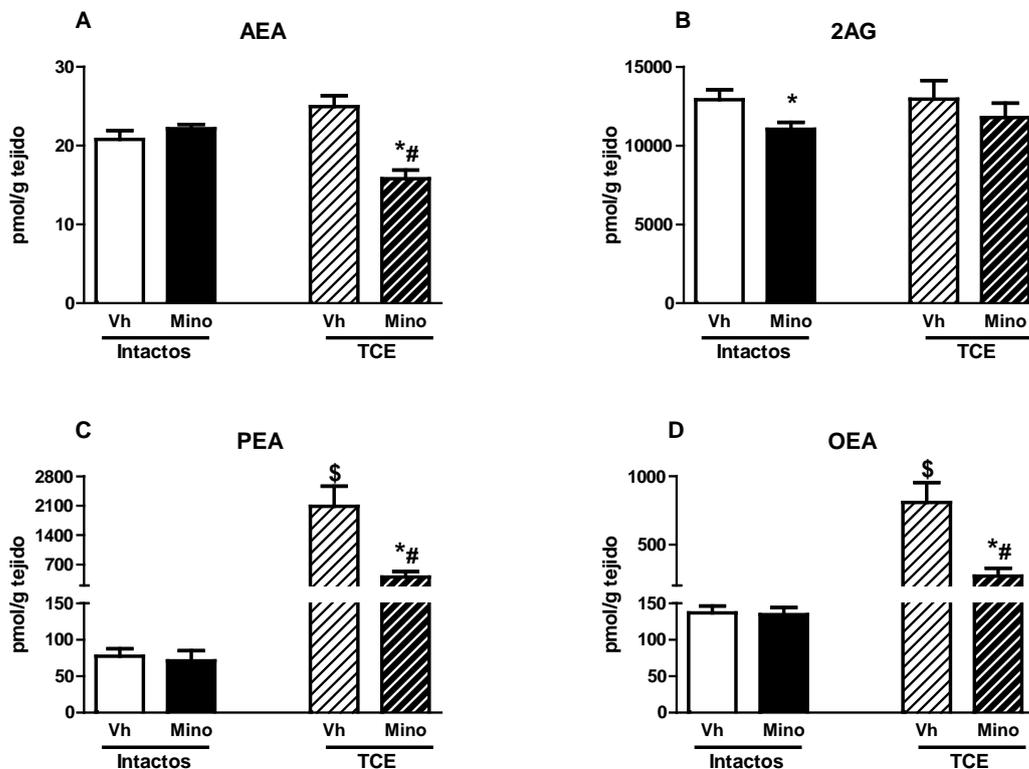


Figura 22. Efectos de la minociclina sobre los niveles de endocannabinoides 6 horas después de un traumatismo craneoencefálico (TCE). Anandamida, AEA (A); 2-araquidonoil glicerol, 2-AG (B); palmitoiletanolamina, PEA (C) y oleoiletanolamina, OEA (D). \*, diferencia significativa respecto a Lesión-Vh; # versus Intacto-Mino; \$ versus Control-Vh ( $p < 0.05$ ).

### Experimento #7: Implicación de los receptores endocannabinoides CB1 y CB2 en los efectos neuroprotectores de la minociclina tras un traumatismo craneoencefálico.

Los resultados del experimento #6 sugirieron que también existe algún tipo de interacción entre la minociclina y el SEC, al menos 6 horas después del TCE. El perfil temporal del experimento #5 mostró cómo los niveles de ECB se van modificando en tiempos cortos (3 y 6 horas tras la lesión) y que a 24 horas se recuperan los niveles basales de los animales intactos. Por ello, se decidió realizar este experimento acerca de la posible implicación de los receptores de cannabinoides en el efecto de la minociclina, 24 horas después de la lesión. Se realizaron TCE con el modelo de caída libre de peso

en ratones macho de la cepa CD1 como se explica en el diseño experimental (página 41). Se evaluó la formación de edema, el daño neurológico y mediante técnicas inmunohistoquímicas se analizaron el número de células de microglía Iba-1 +, su reactividad según la morfología y el daño axonal difuso (DAD) mediante el marcador  $\beta$ -APP.

El TCE indujo la formación de edema en el hemisferio ipsilateral y el tratamiento con minociclina lo redujo de forma significativa. Los antagonistas cannabinoides de los receptores CB1 y CB2 no tuvieron efecto por sí solos pero bloquearon el efecto protector de la minociclina cuando se administraron conjuntamente (figura 23A). El TCE también indujo daño neurológico, como se observa en la figura 23B y éste fue revertido por el tratamiento con minociclina. Los antagonistas no tuvieron efectos *per se* pero bloquearon el efecto neuroprotector de la minociclina sobre el daño neurológico.

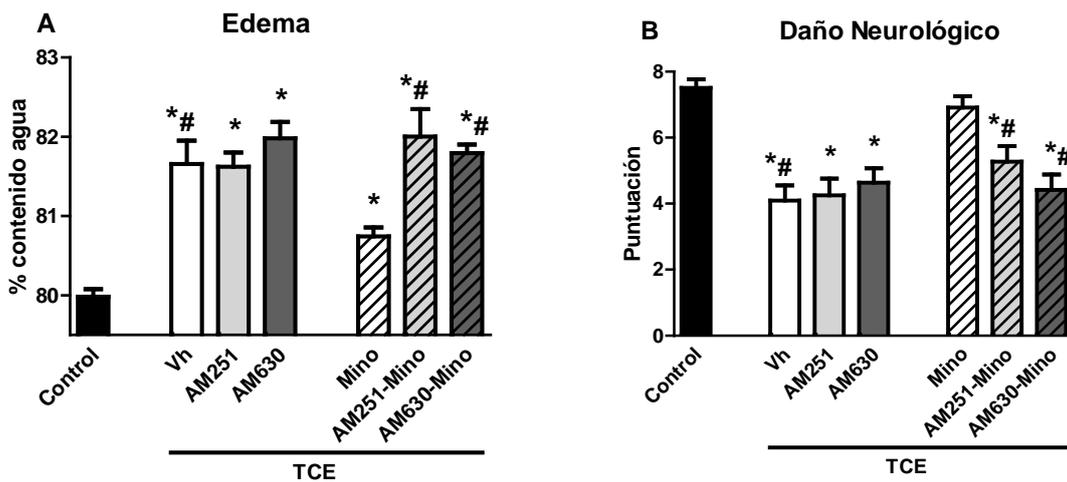


Figura 23. Efectos del traumatismo craneoencefálico (TCE), minociclina y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre la formación de edema (A) y el daño neurológico (B) 24 horas después del TCE. Los histogramas representan la media + EEM del porcentaje de contenido de agua y la puntuación del test neurológico. Control, animales intactos; Vh, lesionados-vehículos; AM251, lesionado-AM251; AM630, lesionado-AM630; Mino, minociclina; AM251-Mino, lesionado-AM251-Minociclina; AM630-Mino, lesionado-AM630-Minociclina. \*, diferencia significativa respecto al grupo control; #, diferencia significativa respecto al grupo Mino ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente se estudió el efecto de la lesión, la minociclina y los antagonistas de receptores CB1 y CB2 sobre la microglía, tanto en número de células Iba-1 + como en su reactividad a través de la clasificación de su morfología. En la figura 24 se muestra que la lesión indujo un aumento en el número de células Iba-1 + en la zona próxima a la

lesión que fue reducido de forma significativa por la minociclina en el grupo lesionado. Los antagonistas no tuvieron efecto ni administrados por separado ni de forma conjunta con la minociclina.

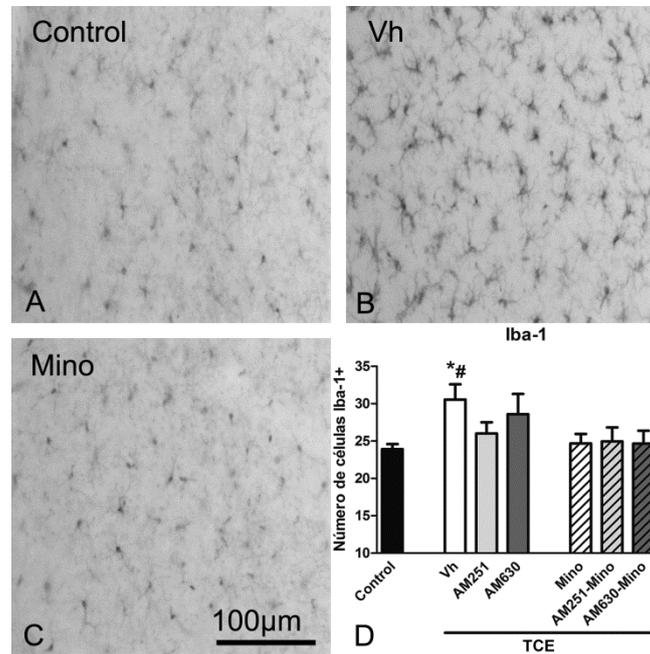


Figura 24. Efectos del traumatismo craneoencefálico, minociclina y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre el número de células Iba-1 + en el área circundante a la lesión 24 horas después del traumatismo. (A) Control, animales intactos; (B) Vh, lesionados-vehículos; (C) Mino, lesionados-minociclina; (D) Resultados cuantitativos del número de células inmunorreactivas para Iba-1. El histograma representa la media + EEM. Control, animales intactos; Vh, lesionados-vehículos; AM251, lesionados-AM251; AM630, lesionados-AM630; Mino, lesionados-minociclina; AM251-Mino, lesionados-AM251-minociclina; AM630-Mino, lesionados-AM630-minociclina. \*, diferencia significativa respecto al grupo control; #, diferencia significativa respecto al grupo Mino (p<0.05).

Para profundizar en el estudio de los cambios en microglía, se procedió al análisis de su reactividad mediante la clasificación en los cinco morfotipos que se detallan en la sección de Material y Métodos (figura 6, página 51). En la figura 25 se muestra que el traumatismo produjo un aumento del porcentaje de células con fenotipo reactivo en la zona próxima a la lesión y que el tratamiento con minociclina lo redujo de forma significativa. El tratamiento por separado con los antagonistas cannabinoides no mostró efectos significativos pero, en combinación con minociclina, bloquearon sus efectos de inhibición de la activación microglial.

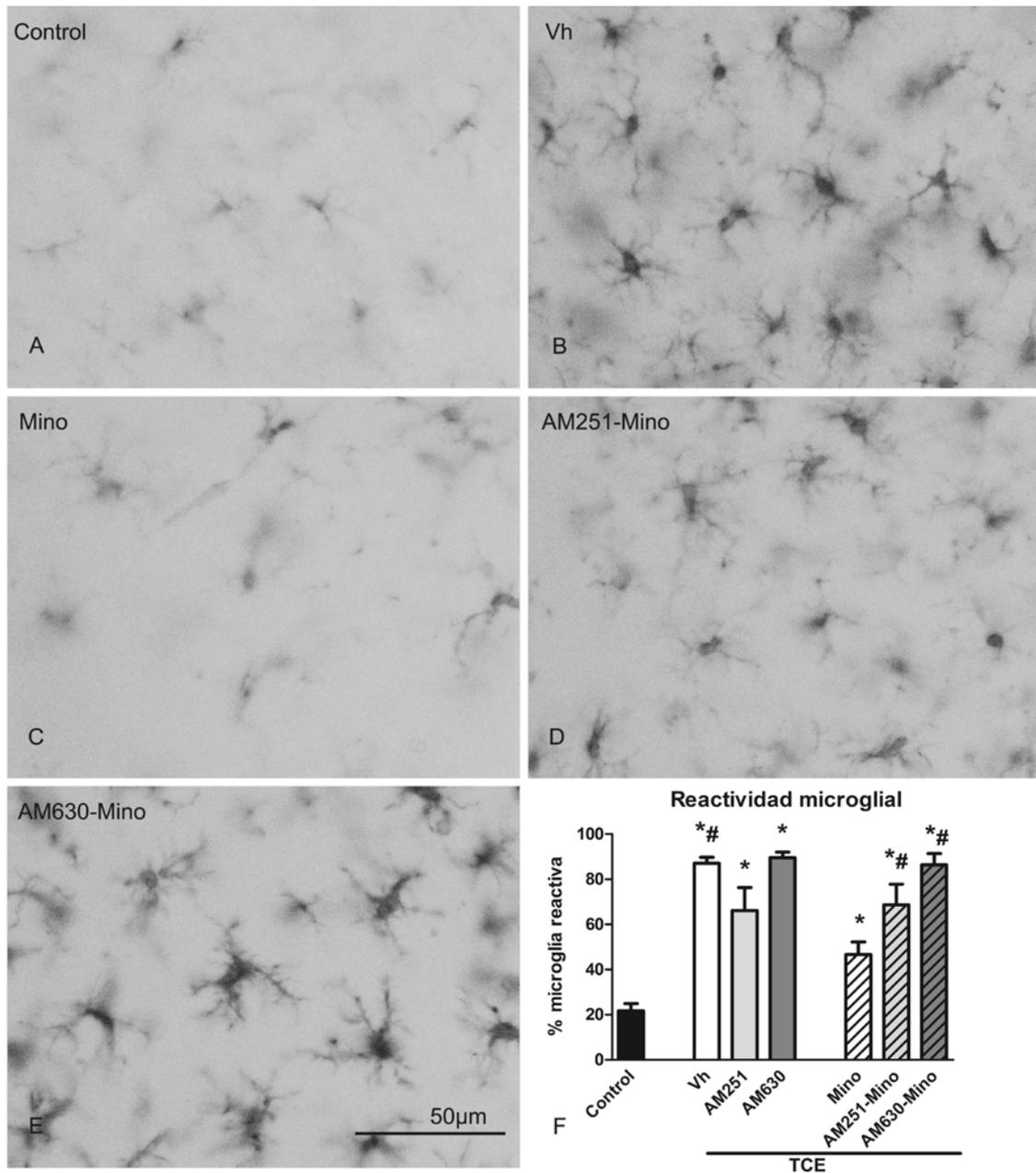


Figura 25. Efectos del traumatismo craneoencefálico, minociclina y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre el porcentaje de microglía reactiva en el área circundante a la lesión 24 horas después del traumatismo. (A) Control, animales intactos; (B) Vh, lesionados-vehículos; (C) Mino, lesionados-minociclina; (D) AM251-Mino, lesionados-AM251-minociclina; (E) AM630-Mino, lesionados-AM630-Mino; (F) Resultados cuantitativos del porcentaje de microglía reactiva. El histograma representa la media + EEM. Control, animales intactos; Vh, lesionados-vehículos; AM251, lesionados-AM251; AM630, lesionados-AM630; Mino, lesionados-minociclina; AM251-Mino, lesionados-AM251-minociclina; AM630-Mino, lesionados-AM630-minociclina. \*, diferencia significativa respecto al grupo control; #, diferencia significativa respecto al grupo Mino ( $p < 0.05$ ).

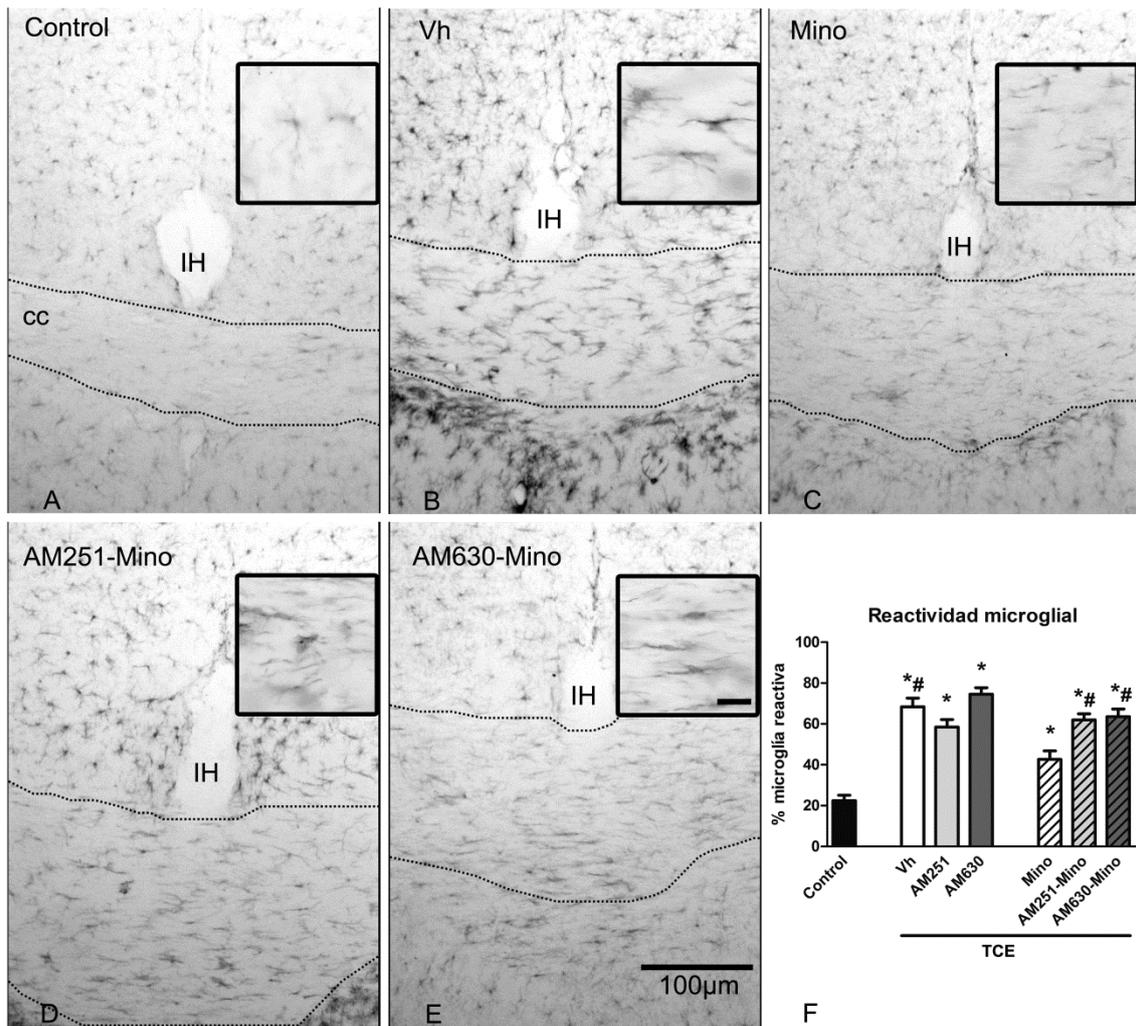


Figura 26. Efectos del traumatismo craneoencefálico, minociclina y antagonistas de los receptores cannabinoides sobre el porcentaje de microglía reactiva en la zona interhemisférica del cuerpo calloso 24 horas después del traumatismo. (A) Control, animales intactos; (B) Vh, lesionados-vehículos; (C) Mino, lesionados-minociclina; (D) AM251-Mino, lesionados-AM251-minociclina; (E) AM630-Mino, lesionados-AM630-Mino; (F) Resultados cuantitativos del porcentaje de microglía reactiva en IH. El histograma representa la media + EEM. Control, animales intactos; Vh, lesionados-vehículos; AM251, lesionados-AM251; AM630, lesionados-AM630; Mino, lesionados-minociclina; AM251-Mino, lesionados-AM251-minociclina; AM630-Mino, lesionados-AM630-minociclina; IH: interhemisferio.\*, diferencia significativa respecto al grupo control; #, diferencia significativa respecto al grupo Mino ( $p < 0.05$ ).

La reactividad microglial también se evaluó en el cuerpo calloso, en la zona interhemisférica (IH), como se observa en la figura 26 para posteriormente relacionarla con el daño axonal difuso en esa misma área. Se muestra que la lesión aumentó el porcentaje de microglía reactiva en el cuerpo calloso y que éste disminuyó por el tratamiento con minociclina. De la misma manera que en los parámetros anteriores, los

antagonistas cannabinoideos no ejercieron efectos por sí solos pero fueron capaces de bloquear el efecto protector de la minociclina.

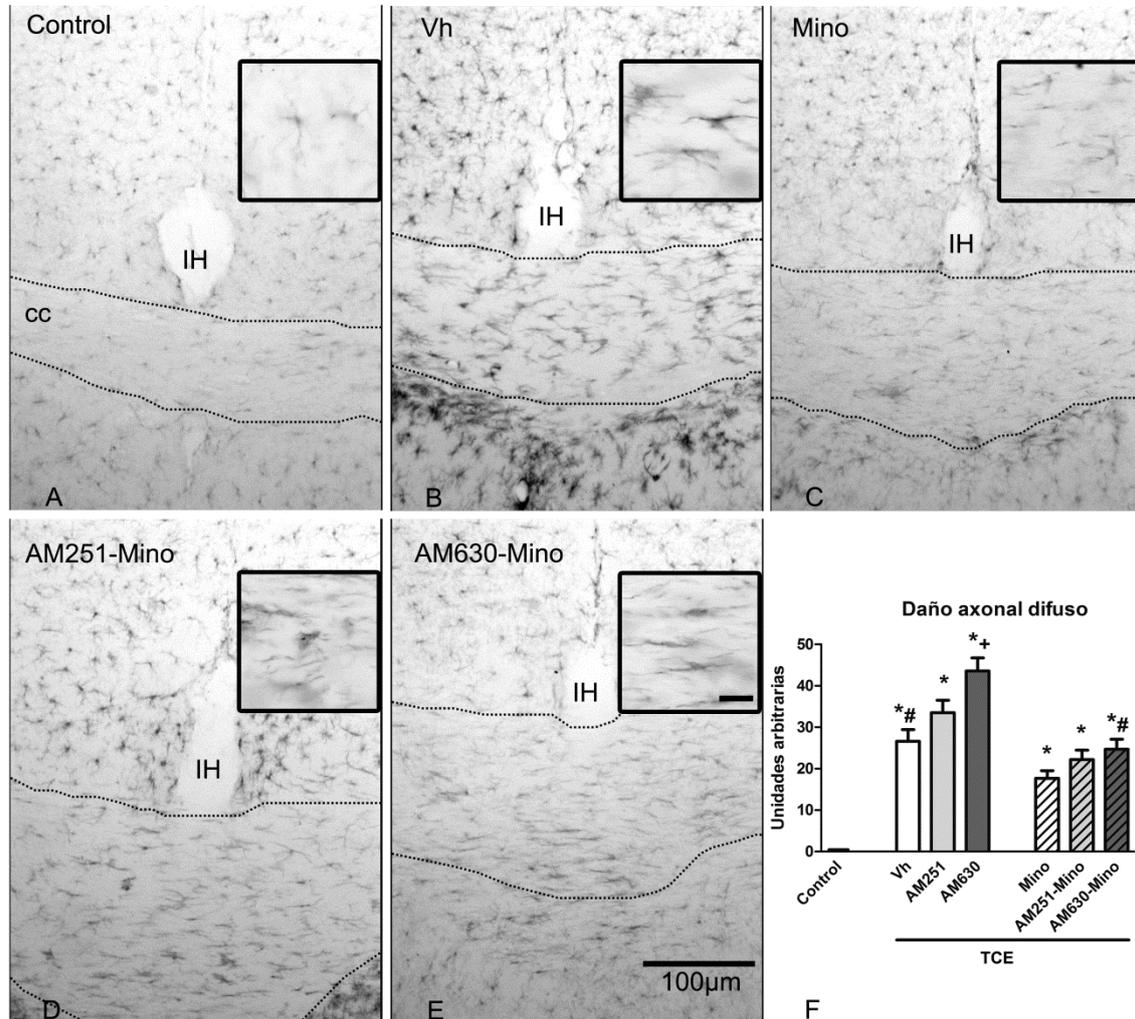


Figura 27. Efectos del traumatismo craneoencefálico, minociclina y antagonistas de los receptores cannabinoideos sobre el área marcada con  $\beta$ -APP como indicativo de daño axonal difuso en la zona interhemisférica del cuerpo calloso 24 horas después del traumatismo. (A) Control, animales intactos; (B) Vh, lesionados-vehículos; (C) AM630, lesionados-AM630; (D) Mino, lesionados-minociclina; (E) AM630-Mino, lesionados-AM630-Mino; (F) Resultados cuantitativos del área marcada con  $\beta$ -APP. El histograma representa la media + EEM. Control, animales intactos; Vh, lesionados-vehículos; AM251, lesionados-AM251; AM630, lesionados-AM630; Mino, lesionados-minociclina; AM251-Mino, lesionados-AM251-minociclina; AM630-Mino, lesionados-AM630-minociclina. \*, diferencia significativa respecto al grupo control; #, diferencia significativa respecto al grupo Mino ( $p < 0.05$ ); +, diferencia significativa respecto al grupo Vh.

El estudio del cuerpo calloso continuó con el marcador  $\beta$ -APP como indicativo de daño axonal difuso. En la figura 27 se observa que el TCE produjo un aumento del área marcada con  $\beta$ -APP y que la minociclina la disminuyó significativamente. El antagonista del receptor CB1 no tuvo efecto por sí solo, sin embargo, el antagonista del receptor CB2 sí tuvo un efecto *per se*, indujo un aumento significativo con respecto al grupo de animales lesionados no tratados. La combinación de minociclina con el antagonista CB2 redujo significativamente el efecto de la minociclina.

En conjunto, los resultados de este experimento indican que los receptores CB1 y CB2 están implicados en los efectos neuroprotectores que ejerce la minociclina sobre la formación de edema, daño neurológico y reactividad microglial. Además, los resultados sugieren que el receptor CB2 podría estar implicado en limitar el daño axonal difuso, dado que la administración de su antagonista, aumenta dicho daño. Todos estos efectos se observan en una ventana temporal de 24 horas tras un TCE.

### **Experimento #8: Implicación del receptor CB2 en los efectos neuroprotectores de la leptina tras un traumatismo craneoencefálico.**

Los datos obtenidos hasta ahora sugerían una implicación del sistema endocannabinoide en los mecanismos de acción de moléculas endógenas (estradiol) y exógenas (minociclina). En general, se observó que el receptor CB2 presentaba un papel más relevante tanto en los mecanismos de acción de ambos agentes como en la evolución y recuperación de las lesiones. Por este motivo, se hizo un último experimento para analizar la implicación del receptor CB2 en los efectos protectores de la leptina. Para ello se realizaron TCE con el modelo de caída libre de peso en ratones macho. Previo a la lesión, se hizo un pretratamiento con el antagonista del receptor CB2 (1mg/kg) y tras el TCE se trató con leptina (2mg/kg) tal y como se detalla en el diseño experimental (página 42).

Se estudió el porcentaje de cambio de peso 24 horas después de la lesión (figura 28A). Todos los animales lesionados mostraron un porcentaje de pérdida de peso muy superior a los animales intactos sin observarse diferencias significativas debidas a

ninguno de los tratamientos. Este dato podría ser indicativo de la homogeneidad de la severidad de las lesiones.

Los datos relativos al daño neurológico se recogen en la figura 28B. Se replicaron los datos obtenidos en los experimentos anteriores, observándose en los animales lesionados una disminución en la puntuación del test neurológico, relacionada con un mayor déficit conductual. El tratamiento con leptina recuperó de forma significativa estos valores hasta los niveles de los animales intactos y su efecto desapareció en combinación con el antagonista del receptor CB2.

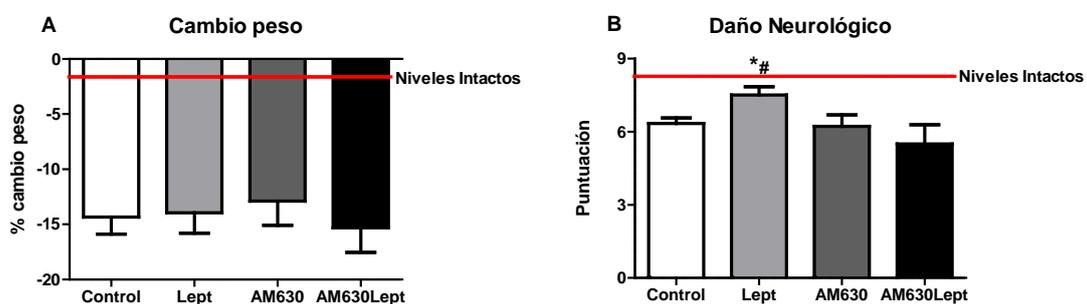


Figura 28. Efectos del traumatismo craneoencefálico, leptina y antagonista del receptor CB2, 24 horas después del traumatismo sobre el porcentaje de cambio de peso (A), daño neurológico (B) La línea roja es indicativa de los niveles observados en los animales intactos. Los histogramas representan la media + EEM. Intactos, No lesionados; Control, Lesionados-Vehículos; Lept, Lesionados-Leptina; AM630, Lesionados-AM630; AM630-Lept, Lesionados-AM630-Leptina. \* p < 0.05 frente al grupo Control; # p < 0.05 frente al grupo AM630-Lept.

De la misma manera que en el experimento #4 se analizaron por PCR los cambios de expresión de diversas moléculas. En la figura 29A se muestran los cambios relativos a los niveles de expresión del receptor CB1. Tras la lesión, la expresión de CB1 disminuyó. Se observó un efecto significativo de la leptina que indujo un aumento en los niveles de CB1 hasta los valores de los animales intactos. El antagonista no tuvo efecto *per se* pero sí se observó una interacción estadísticamente significativa entre el antagonista y la leptina, sugerente de una interacción farmacológica.

Respecto a los niveles de ARNm del receptor CB2, los cambios se recogen en la figura 29B. Tras el traumatismo, la expresión de CB2 aumentó. La leptina indujo una bajada de sus niveles aunque no alcanzó la significación estadística. El AM630 no produjo un efecto por sí solo, pero la interacción con leptina resultó, de nuevo, significativa. Se

observaron diferencias significativas entre el grupo lesionado tratado con leptina y el grupo con el doble tratamiento.

Como marcador de daño axonal, se analizaron los cambios de expresión de la enzima beta secretasa (BACE-1) (figura 29C). La lesión indujo un aumento en su expresión que fue revertido significativamente por el tratamiento con leptina. El antagonista CB2 tuvo un efecto significativo *per se*, aumentando BACE-1. El efecto neuroprotector de la leptina no se observó al administrarse en combinación con el antagonista.

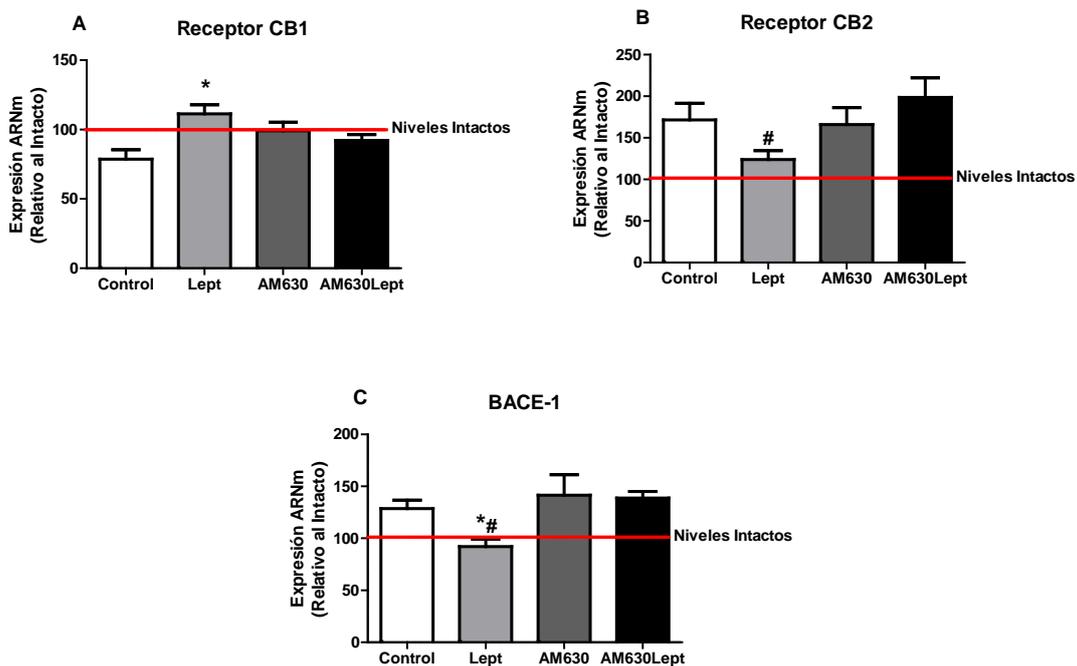


Figura 29. Efectos del traumatismo craneoencefálico, leptina y antagonista del receptor CB2, 24 horas después del traumatismo sobre los niveles de expresión de ARNm de CB1 (A), CB2 (B) y BACE-1 (C). La línea roja es indicativa de los niveles observados en los animales intactos. Los histogramas representan la media + EEM. Intactos, No lesionados; Control, Lesionados-Vehículos; Lept, Lesionados-Leptina; AM630, Lesionados-AM630; AM630-Lept, Lesionados-AM630-Leptina. \* p < 0.05 frente al grupo Control; # p < 0.05 frente al grupo AM630-Lept.

Para estudiar el componente neuroinflamatorio del TCE, se analizaron también los cambios en vimentina, como se muestra en la figura 30A. Tras la lesión se produjo un aumento de la expresión de los niveles de ARNm de vimentina en todos los grupos en comparación con los animales intactos. El análisis estadístico sólo mostró una interacción significativa entre la leptina y el antagonista CB2, pero no se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Respecto a la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ , los datos quedan recogidos en la figura 30B. Tras el TCE, los niveles de TNF- $\alpha$  aumentaron y la leptina no fue capaz de reducirlos de forma significativa aunque sí se observó una tendencia a ello. Los animales lesionados tratados sólo con leptina difirieron significativamente de aquellos que recibieron el doble tratamiento. El antagonista del receptor CB2 mostró un efecto *per se* sobre los niveles de esta citoquina, mostrando un aumento significativo respecto al grupo control y difiriendo también de los animales doblemente tratados.

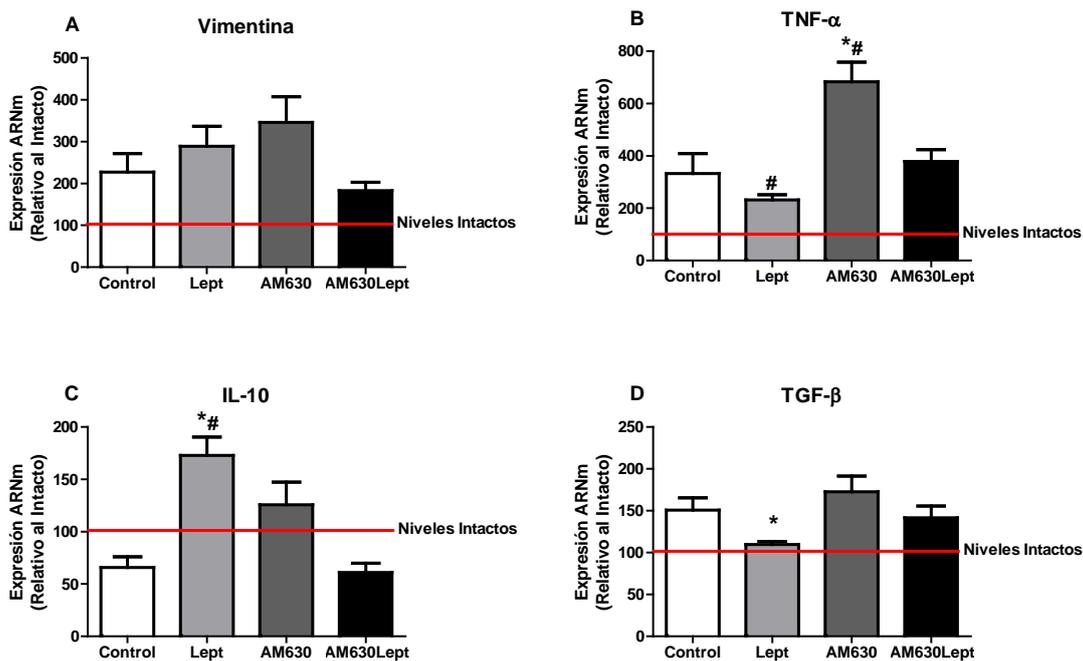


Figura 30. Efectos del traumatismo craneoencefálico, leptina y antagonista del receptor CB2, 24 horas después del traumatismo sobre los niveles de expresión de ARNm de vimentina (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) y TGF- $\beta$  (D). La línea roja es indicativa de los niveles observados en los animales intactos. Los histogramas representan la media + EEM. Intactos, No lesionados; Control, Lesionados-Vehículos; Lept, Lesionados-Leptina; AM630, Lesionados-AM630; AM630-Lept, Lesionados-AM630-Leptina. \*  $p < 0.05$  frente al grupo Control; #  $p < 0.05$  frente al grupo AM630-Lept.

Se estudiaron los cambios de IL-10, una citoquina antiinflamatoria, como se muestra en la figura 30C. También en este caso el análisis mostró una interacción significativa entre leptina y antagonista CB2, que queda reflejada en el perfil de los histogramas. Tras la lesión, IL-10 disminuyó y el tratamiento con leptina fue capaz de aumentar de forma significativa los niveles de esta citoquina incluso por encima de los niveles de los animales intactos. Este efecto antiinflamatorio fue bloqueado por el co-tratamiento con el antagonista AM630.

Respecto al factor TGF- $\beta$ , los resultados se recogen en la figura 30D. La lesión indujo un aumento en la expresión de los niveles de ARNm de TGF- $\beta$  que disminuyó significativamente tras el tratamiento con leptina.

Se agruparon los datos de todos los grupos para identificar posibles asociaciones bivariantes entre el daño neurológico y los niveles de ARNm. El test de Spearman mostró una correlación significativa entre el daño neurológico y los niveles de ARNm de CB2 ( $\rho = -0.502$ ,  $p = 0.01$ ), BACE-1 ( $\rho = -0.477$ ,  $p = 0.002$ ) y TGF- $\beta$  ( $\rho = -0.487$ ,  $p = 0.002$ ) que siguieron una regresión lineal negativa:  $r^2 = 0.2220$ ,  $n = 39$ ,  $p = 0.0025$ , para CB2 (figura 31A);  $r^2 = 0.1848$ ,  $n = 40$ ,  $p = 0.0056$ , para BACE-1 (figura 31B) y  $r^2 = 0.3108$ ,  $n = 38$ ,  $p = 0.0003$  para TGF- $\beta$  (figura 31C).

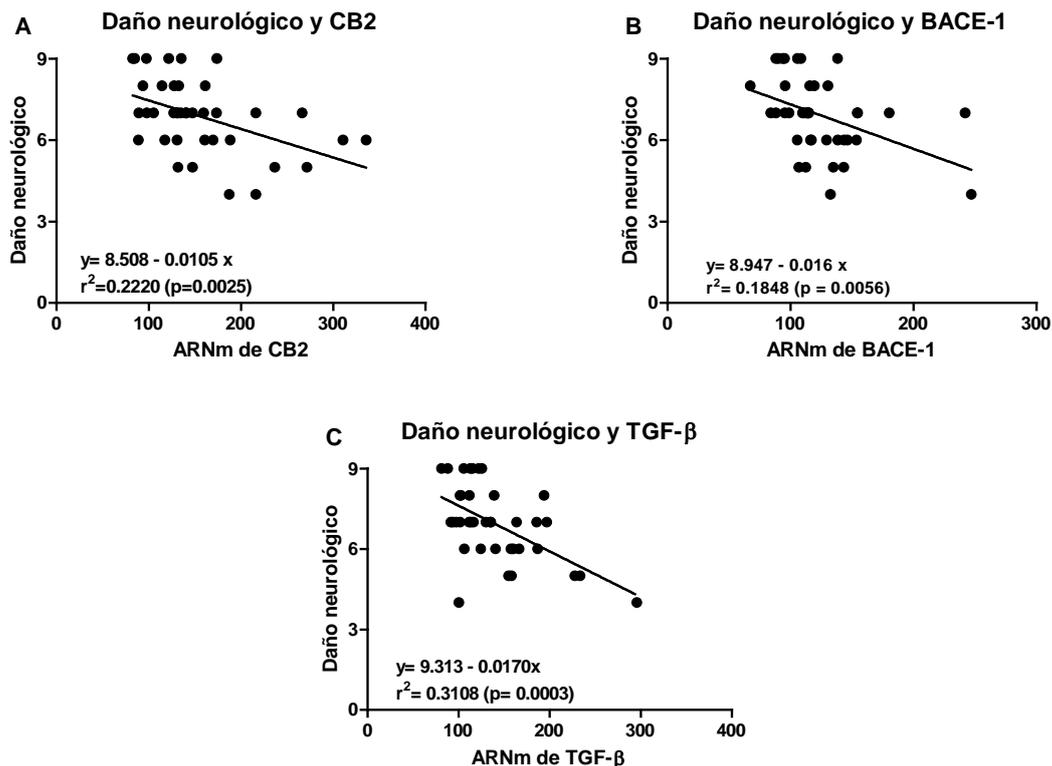


Figura 31. Correlaciones del daño neurológico con los niveles de ARNm. (A) Correlación del daño neurológico con los niveles de ARNm de CB2; (B) Correlación del daño neurológico con los niveles de ARNm de BACE-1; (C) Correlación del daño neurológico con los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ .

En la figura 32, se muestran los cambios en los niveles plasmáticos de leptina. El análisis estadístico mostró efectos significativos tanto de la leptina como del antagonista CB2. Después del TCE, los niveles plasmáticos de leptina disminuyeron y el tratamiento con leptina los recuperó hasta igualarlos a los de los animales intactos. AM630 presentó un efecto *per se*, disminuyendo los niveles de la hormona. El grupo tratado con leptina y el grupo con doble tratamiento mostraron unos niveles de leptina circulante semejantes a los animales intactos.

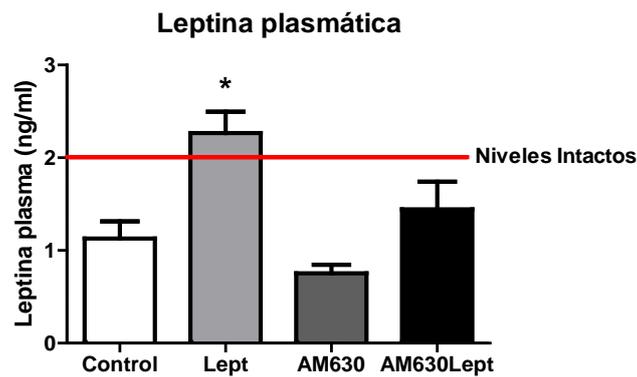


Figura 32. Efectos del traumatismo craneoencefálico, leptina y antagonista del receptor CB2, 24 horas después del traumatismo sobre los niveles plasmáticos de leptina. La línea roja es indicativa de los niveles observados en los animales intactos. Intactos, No lesionados; Control, Lesionados-Vehículos; Lept, Lesionados-Leptina; AM630, Lesionados-AM630; AM630-Lept, Lesionados-AM630-Leptina. \*  $p < 0.05$  frente al grupo Control; #  $p < 0.05$  frente al grupo AM630-Lept.



**Discusión**

**Discusión**



La búsqueda de un tratamiento y la caracterización de las lesiones cerebrales han estado presentes a lo largo de toda la Historia. La primera vez que se hizo una descripción sistemática de los síntomas de las lesiones cerebrales fue en el siglo XVI por Jacopo Berengario da Carpi (Levin et al., 1982). A pesar del tiempo transcurrido, las lesiones cerebrales siguen siendo motivo de estudio debido a la gran complejidad, variedad y heterogeneidad de síntomas así como por su gran impacto en la sociedad. En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos modelos de lesión cerebral representativos: la lesión penetrante y el modelo de traumatismo craneoencefálico.

### **Lesión penetrante**

Tradicionalmente los modelos de lesión penetrante han sido utilizados para el estudio de la reactividad glial ya que generan una lesión muy distintiva caracterizada por la formación de una cicatriz glial en la que participan distintos tipos celulares y en la que el componente principal son los astrocitos (Sofroniew y Vinters 2010). La formación de la cicatriz glial se considera beneficiosa en las fases iniciales tras la lesión ya que delimita su expansión y participa en la restauración de la homeostasis cerebral. Sin embargo, en etapas más tardías, supone un impedimento para el crecimiento axonal lo que conlleva alteraciones en la recuperación. Ante este papel dual de la cicatriz glial es esencial el entendimiento de los mecanismos implicados en su regulación. Por este motivo, la primera parte de esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de la participación del sistema endocannabinoide (SEC) en los mecanismos por los que el estradiol (E2) regula la gliosis, ya que se ha demostrado que tanto el SEC (Shohami et al. 2011) como el E2 (Liu et al. 2007) participan en la evolución y recuperación de lesiones cerebrales.

### **Experimento #1: Implicación de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en los efectos neuroprotectores del estradiol.**

Los resultados del experimento #1 confirmaron estudios previos en los que la administración sistémica de E2 a ratas macho disminuía la reactividad astrogliar en un modelo de lesión penetrante (Barreto et al. 2009, 2014). El tratamiento con E2 redujo

tanto el número de astrocitos como la densidad de superficie de material inmunoreactivo para vimentina y GFAP, marcadores indicativos de astrocitos reactivos y de astrocitos reactivos-residentes respectivamente. En condiciones fisiológicas, el E2 regula la expresión de GFAP a través de un mecanismo que implica un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) localizado en el promotor del gen de GFAP (Stone et al. 1998). El E2 podría reducir directamente los niveles de GFAP y vimentina en los astrocitos regulando fenómenos de proliferación glial (García-Estrada et al. 1993; 1999) o la síntesis y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Arevalo et al. 2010). Por tanto, aunque el E2 regule la expresión de GFAP y, potencialmente, la de vimentina por mecanismos directos, las posibilidades se amplían al existir interacciones con otros factores. Entre estas posibilidades, nuestros resultados sugieren que el SEC podría estar implicado en el efecto antigliótico del E2 ya que al antagonizar los receptores CB1 y CB2, el efecto del E2 se redujo.

Los antagonistas de CB1 y CB2 no mostraron ningún efecto *per se* sobre el número de astrocitos reactivos, lo que sugiere que el tono endógeno del SEC no afecta a la reactividad astrogliar en un modelo de lesión penetrante. Sin embargo, la modulación de los receptores sí parece ser un punto clave a través del cual el E2 podría reducir la reactividad astrogliar puesto que se observó que los niveles de ARNm del receptor CB2 aumentaron tras la lesión y que el tratamiento con E2 indujo un incremento mucho más acentuado, sugiriendo que la hormona podría estar afectando también a la señalización intercelular del SEC como apuntan estudios previos (Rodríguez de Fonseca et al. 1994; Corchero et al. 2001; Bradshaw et al. 2006; Amantea et al. 2007; Hill et al. 2007; Kellert et al. 2009). Entre otras posibilidades, el E2 podría controlar la reactividad astrogliar a través de los receptores CB1 y ejercer un control adicional mediado por los receptores CB2 de la microglía (Correa et al. 2009; Romero-Sandoval et al. 2009; Sagredo et al. 2009; Luongo et al. 2010) ya que ambos tipos celulares presentan receptores cannabinoides y receptores de estrógenos (Mor et al. 1999; Stella 2010).

Tras la lesión, los niveles de ARNm de las enzimas cannabinoides monoacilglicerol lipasa (MAGL) y N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) disminuyeron y el E2 bloqueó esta reducción. A través de esta acción, la hormona podría regular los niveles de endocannabinoides (ECB) en la corteza cerebral lesionada por lo que para responder a esta cuestión, se diseñó el siguiente experimento (#2).

### **Experimento #2: Implicación de las enzimas endocannabinoides MAGL y FAAH en los efectos neuroprotectores del estradiol.**

En un protocolo de lesión penetrante similar, se combinó el tratamiento con los inhibidores de las principales enzimas de degradación de endocannabinoides (ECB): la hidrolasa de amidas y ácidos grasos (FAAH) y la MAGL, con E2 para ver la implicación de estas enzimas en los efectos antiglióticos de la hormona. Ambas enzimas se expresan en células gliales (Witting et al. 2004; Benito et al. 2007) aunque el papel que desempeñan en estas células no se conoce aún con precisión (Correa et al. 2009). Los resultados replicaron los obtenidos anteriormente, mostrando cómo el E2 disminuía el número de células inmunorreactivas para GFAP y vimentina en la corteza ipsilateral. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el co-tratamiento con ninguno de los dos inhibidores de las enzimas. Estos resultados sugieren que el aumento de ECB que se esperaba debido a la inhibición de su inactivación no modifica el efecto del E2.

### **Experimento #3: Efecto de la lesión penetrante en presencia y ausencia de E2 o LTZ sobre los niveles de endocannabinoides.**

Para seguir profundizando en el estudio de los cambios en el SEC producidos por la lesión y los mecanismos de interacción del SEC con el E2, se planteó el experimento #3 para evaluar si la síntesis de ECB se veía alterada por la lesión, el tratamiento con E2 o el tratamiento con letrozol (LTZ), un inhibidor de la síntesis de E2.

La lesión penetrante indujo cambios en los niveles de todos los ECB medidos en el hemisferio ipsilateral a la lesión pero ninguno de ellos se vio modificado por el tratamiento con E2 ni con LTZ. Los niveles de anandamida (AEA) disminuyeron mientras que los de 2-araquidonoil glicerol (2-AG) aumentaron de forma significativa con respecto al hemisferio contralateral. Los resultados obtenidos concuerdan con los que se muestran en el experimento #1 en los que se observaba una disminución de los niveles de ARNm de NAPE-PLD y de MAGL que explicarían la reducción en la síntesis de AEA por parte de la primera y el aumento de los niveles de 2-AG debidos a la acción de la segunda.

Las aminas palmitoiletanolamina (PEA) y oleoiletanolamina (OEA) aumentaron significativamente en los animales lesionados. Puesto que PEA y OEA son análogos de la AEA (Amorós et al. 2010) y comparten una de las enzimas de síntesis de estas aminas (NAPE-PLD), se esperaba una reducción de sus niveles como ocurre con la AEA, sin embargo se observó el efecto contrario. Es importante recalcar que el ritmo y tiempo necesario para la síntesis de cada ECB varía y que los cambios observados a 24 horas en la AEA podrían replicarse en PEA y OEA en tiempos más largos ya que PEA y OEA actúan de forma independiente a las rutas de cannabinoides, activando las vías de TRPV1 y PPAR- $\alpha$  (Gaetani et al. 2008). Además, la caracterización del metabolismo de PEA y OEA aún no está completa y podrían barajarse rutas alternativas como la síntesis mediada por fosfolipasa C (PLC) seguida de la acción de fosfatasas. De hecho, en modelos de lesión cerebral se ha demostrado que PLC aumenta su expresión (Wei et al. 1982; Homayoun et al. 2000), generando ácidos grasos libres y diacilgliceroles que podrían explicar esta ruta de síntesis alternativa de las aminas.

### → Resumen lesión penetrante:

En conjunto, los experimentos #1, 2 y 3 con el modelo de lesión penetrante sugieren que la interacción del SEC con el E2 no se debe a modificaciones en los niveles de ECB en cerebro, ni parece estar relacionada con modificaciones debidas a la síntesis de E2, más bien parece que la interacción de estos dos sistemas es a través de los receptores CB1 y CB2. Podría estar ocurriendo una interacción en la señalización posterior a la activación de CB1 y CB2 ya que tanto el E2 como los cannabinoides comparten la regulación de ciertas vías implicadas en el control de la respuesta inflamatoria como MAPK y PI3K-Akt (Molina-Holgado et al. 2002; Marin et al. 2009), actividad de la PKA y de la generación de NO en células neurales (Dina et al. 2001; Kim et al. 2006). De hecho, los agonistas cannabinoides y el E2 disminuyen la reactividad glial mediante la inhibición de la transcripción de NF $\kappa$ B (Dodel et al. 1999; Curran et al. 2005; Sheng et al. 2005; Zhang y Chen 2008; Cerciat et al. 2010) y regulan la comunicación astrocito-astrocito y astrocito-neurona (Venance et al. 1995; Rao y Sikdar 2006; Navarrete y Araque 2008), que podrían estar implicadas también en la activación astrogliar.

## Traumatismo craneoencefálico

La segunda parte de esta Tesis Doctoral se centró en la caracterización de un modelo de traumatismo craneoencefálico (TCE) en ratón. La fisiopatología del TCE es muy heterogénea, variable y compleja (Walker y Tesco 2013) y su incidencia varía con la edad, ocurriendo la mayoría de los casos durante la adolescencia. La adolescencia es un período crítico en el que aumentan la búsqueda de nuevas sensaciones y las actividades de riesgo, favoreciendo que ocurran accidentes que ocasionen TCE. Los modelos experimentales más utilizados para estudiar los efectos de un TCE en adolescencia han sido la ablación cortical (Kolb et al. 1986), el impacto cortical a escala (Duhaimé et al. 2000) o lesiones con exposición de la dura (Adelson et al. 1998); sin embargo, la gran mayoría de los pacientes presentan lesiones cerradas (Masson et al. 2001; Wu et al. 2008) y por lo tanto, el uso de un modelo de TCE cerrado se aproxima mucho más a la realidad clínica. Por este motivo comenzamos por hacer un perfil temporal (24h-2semanas) de los cambios observados tras un TCE en ratones macho adolescentes. El modelo utilizado fue el de caída libre de peso que reproduce muchos de los síntomas que ocurren en humanos (Cernak 2005).

### **Experimento #4: Perfil temporal de cambios moleculares y correlaciones con daño neurológico y edema tras un traumatismo craneoencefálico (24h-2semanas).**

Nuestro modelo de TCE generó una lesión moderada, caracterizada por una pérdida de peso comprendida entre 10-14% y una tasa de mortalidad de 10.53%. Después de un TCE, la barrera hematoencefálica (BHE) se rompe y se induce la formación de edema debido a un aumento de la permeabilidad celular (Chodowski et al. 2011). En nuestro caso el edema aumentó a 24 y 72 horas tras el TCE y desapareció a las dos semanas, en conformidad con estudios previos en los que el edema aumentaba hasta cinco días después del TCE (O'Connor et al. 2006) y desaparecía totalmente a las dos semanas (Hellal et al. 2004).

Analizamos alteraciones en el comportamiento ya que el TCE produce daños cognitivos en humanos (Wortzel y Arciniegas 2012) que son reproducibles en roedores (Rochat et al. 2010; Shenq et al. 2012). Los humanos presentan dificultades para recordar listas de

números (Brooks 1972) o llevar a cabo tareas de asociaciones simples (McLean et al. 1983). En modelos animales, se observa déficit en aprendizaje espacial y memoria (Shenaq et al. 2012) e impulsividad (Rochat et al. 2010). Nuestro modelo indujo un déficit neurológico a las 24 horas que se mantuvo hasta las 72 horas tras la lesión, desapareciendo a las dos semanas. Los daños neurológicos se asociaron con niveles altos de edema, como ocurrió en estudios previos que correlacionaron las alteraciones conductuales con el daño celular (Shenaq et al. 2012) debido a aumentos en la permeabilidad y entrada de agua al interior de la célula. En humanos se ha visto que el edema está asociado consistentemente con daños neurológicos, afectando a cuatro de los ocho dominios cognitivos analizados (Kreiter et al. 2002).

Los niveles de expresión del receptor CB1 disminuyeron después de la lesión. Esta disminución podría agravar los daños neurológicos ya que se observó que los animales con mayor déficit neurológico presentaban niveles más bajos de CB1. Esto podría estar relacionado con la función de CB1 en comportamientos de ansiedad (Litvin et al. 2013) y homeostasis emocional (Marco y Viveros 2009) que podrían afectar a la manera de resolver el test conductual. CB1 presentó una correlación negativa con el edema. Ya que CB1 se localiza en los pies de los astrocitos (Rodríguez et al. 2001), que son las principales células gliales encargadas del intercambio iónico (Straiker y Mackie 2006) y de la modulación del flujo sanguíneo cerebral (Iring et al. 2013), una expresión disminuida de CB1 podría afectar el balance iónico y a la formación y resolución del edema. Nuestros resultados se ven apoyados por estudios previos en los que ratones deficientes para CB1<sup>-/-</sup> presentaron una disminución en la recuperación que afectó a la formación de edema y al test conductual (Panikashvili et al. 2005).

En condiciones fisiológicas, el receptor CB2 presenta unos niveles de expresión muy bajos que se concentran mayoritariamente en microglía (Stella 2010; Shohami et al. 2011), aunque también se expresa en progenitores neurales, neuronas y células endoteliales (Palazuelos et al. 2006; Onaivi 2011). Sin embargo, la expresión de CB2 aumenta en condiciones de neuroinflamación (Stella 2010) como ocurre en nuestro modelo de TCE y de lesión penetrante. Esto podría explicarse como un mecanismo de rescate de la lesión ya que como se demostró en el experimento #1, el bloqueo farmacológico de CB2 disminuía los efectos protectores del estradiol y el uso de sus agonistas induce una mejor recuperación y desarrollo de tests conductuales tras una lesión (García-Gutiérrez et al. 2013). No se detectó correlación entre los niveles de CB2

y edema, posiblemente porque este receptor se expresa mucho más en células microgliales que en astrocitos (Stella 2010), que como ya se ha dicho, son los principales implicados en el control del edema.

Los cambios en los niveles de AQP4 en el sistema nervioso central (SNC) dependen del tipo de edema que se genera (Verkman et al. 2006). Nuestro modelo de TCE induce predominantemente edema vasogénico (Barzó et al. 1997b; Cernak 2005) cuya resolución es dependiente de AQP4 (Yang et al. 2008). Los niveles de proteína de AQP4 aumentaron hasta 72 horas después de la lesión, lo que apoya estudios previos con este modelo (Ding et al. 2009) y se asociaron con un mayor daño neurológico y mayor formación de edema. Esto sugiere que un aumento en AQP4 tras un TCE contribuye a un aumento en la formación de edema, lo que a su vez, correlaciona con el daño neurológico.

Tras una lesión en el SNC los astrocitos sobreexpresan vimentina (Pekny et al. 2007). La vimentina es, junto a GFAP, uno de los genes que más incrementan su expresión 24 h tras una lesión cerebral (Kochanek et al. 2013). En nuestro trabajo comprobamos que este aumento se mantuvo hasta las 72 horas tras el TCE. Los niveles elevados de vimentina se asociaron con alto déficit neurológico y edema. Existe una relación muy estrecha entre la neuroinflamación y las alteraciones conductuales, pues los animales que presentan una activación del sistema inmune presentan un comportamiento enfermizo o “sickness behaviour” (Kent et al. 1992), que se caracteriza por una reducción en la ingesta y aumento de actividad, pérdida de peso y un aumento en el sueño (Larson y Dunn 2001). Con respecto al edema, los niveles altos de vimentina reflejan un aumento en la astrogliosis y por tanto, una mayor cantidad de astrocitos hipertróficos expresando altas cantidades de AQP4 (Vizueté et al. 1999) que modularía el balance hídrico cerebral (Potokar et al. 2013).

En resumen, el experimento #4 indica que existe una correlación entre la formación de edema y el déficit neurológico tras un TCE. Las correlaciones de CB1, AQP4 y vimentina con edema y daño neurológico parecen indicar un papel crítico de estas moléculas en la recuperación de un TCE mientras que los cambios en CB2 sólo se asociaron a déficit neurológico, sugiriendo que CB2 presenta una función diferente a la de CB1 tras un TCE.

### **Experimento #5: Perfil temporal (3-48 h) de los niveles de endocannabinoides tras un traumatismo craneoencefálico.**

Se planteó el experimento #5 como un ensayo preliminar en el que se evaluaron los cambios en los niveles de ECB en tiempos cortos (3 y 6 horas) así como a 24 y 48 horas tras el TCE. La AEA disminuyó a las 3 h tras el TCE, aumentó de forma significativa a las 6 horas y después comenzó a recuperarse a niveles similares a los de los animales intactos. En cambio, el 2-AG no mostró cambios significativos aunque se observó una tendencia a disminuir en tiempos cortos y a recuperarse a los niveles de los animales intactos a partir de las 24 horas. Los cambios más claros se detectaron a las 6 horas tras la lesión y fueron particularmente evidentes en PEA y OEA.

### **Experimento #6: Efecto de la minociclina sobre los niveles de endocannabinoides después de un traumatismo craneoencefálico.**

El experimento #5 indicaba que 6 horas tras el TCE era el tiempo en el que se observaban los mayores cambios en los niveles de ECB y que a las 24 horas estos volvían al estado basal. Puesto que se quería estudiar la posible implicación del SEC en los efectos de agentes protectores, se seleccionó el punto de 6 horas para ver si uno de ellos, la minociclina, modificaba los niveles de ECB en este tiempo. Para ello se administró minociclina a animales intactos y lesionados y se midieron los niveles de ECB en el lado ipsilateral.

Se replicaron los datos obtenidos en el experimento #5, observándose un ligero incremento en los niveles de AEA en los animales lesionados y un aumento muy marcado en PEA y OEA. El tratamiento con minociclina redujo los niveles de AEA, PEA y OEA. Diversos estudios han demostrado que ambos ECB median efectos neuroprotectores en distintos modelos de lesión cerebral (Sun et al. 2007; Cordaro et al. 2015). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con minociclina, un agente neuroprotector, disminuye los niveles de todas ellas. Esto parece una contradicción, sin embargo una posible explicación es que el tratamiento temprano con minociclina indujo una lesión menor en comparación con aquellos animales no tratados. La minociclina no sólo disminuyó los niveles de AEA con respecto a los lesionados sin tratar sino que también sus niveles eran menores que los de los animales sin lesionar. Esto podría

deberse a dos hechos: tras el TCE se produce muerte neuronal (Cernak 2005), por tanto hay un menor número de neuronas en los animales lesionados, que son las células que sintetizan AEA (Liu et al. 2006) y también habría una menor liberación de AEA por parte de la microglía reactiva (Merighi et al. 2012), ya que ha sido inhibida por el tratamiento con minociclina. Los niveles de 2-AG no se vieron modificados. Sin embargo, los animales intactos tratados con minociclina mostraron una disminución en 2-AG. Estudios *in vitro* han demostrado que la microglía libera al medio 2-AG y que éste actúa sobre los receptores CB2 para modular las respuestas proliferativas de la microglía (Carrier et al. 2004), lo que explicaría los niveles reducidos de 2-AG en los animales tratados con minociclina en los que la activación y proliferación microglial está inhibida (Tikka y Koistinaho 2001; Tikka et al. 2001). La falta de efecto de la minociclina en los animales lesionados podría deberse a una cuestión temporal y que las modificaciones sobre este ECB ocurran en tiempos más largos.

### **Experimento #7: Implicación del sistema endocannabinoide en los efectos protectores de la minociclina tras un traumatismo craneoencefálico.**

Ya que el experimento #6 sugería que la minociclina modificaba la actividad del SEC y se observó que las 24 horas tras el TCE suponía un tiempo clave en los cambios moleculares (#4) y niveles de ECB (#5), se realizó el experimento #7 para analizar la posible implicación del SEC en el efecto de la minociclina, 24 horas después del TCE.

La minociclina disminuyó el edema después del TCE, redujo los daños neurológicos y la actividad microglial, confirmando estudios previos (Tikka et al. 2001; Homsí et al. 2009, 2010; Siopi et al. 2011). Estos efectos fueron bloqueados por los antagonistas de CB1 y CB2, excepto en el caso del número total de células microgliales lo que indica que CB1 y CB2 están implicados en la reactividad microglial pero no afectan a los procesos de proliferación en nuestro modelo. No se encontraron efectos *per se* de los antagonistas excepto en el caso del antagonista de CB2 que aumentó significativamente el daño axonal. La acumulación de  $\beta$ -APP se debe a la actividad de la enzima de corte beta secretasa (BACE-1) (Yu et al. 2012) que está regulada por la actividad del factor NF $\kappa$ B (Chen et al. 2012) cuya actividad aumenta en el área lesionada después de un

TCE (Chen et al. 2008). El hecho de que el antagonista de CB2 aumente la acumulación de  $\beta$ -APP, sugiere que los ECB, a través de la activación de CB2 y, presumiblemente, con la participación de los mecanismos intracelulares citados, podrían tener un papel protector inhibiendo la acumulación de  $\beta$ -APP y disminuyendo por tanto el daño axonal. El TCE produjo un aumento en el edema que se vio reducido por el tratamiento con minociclina. El TCE induce la activación de las cascadas de coagulación que afectan a la función microglial, disparando la respuesta inflamatoria y produciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 (Möller et al. 2000) e IL-1 $\beta$ , que juegan un papel crucial en la formación del edema (Lazovic et al. 2005). La minociclina podría estar reduciendo la formación de edema al disminuir la activación microglial y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$  (Lazovic et al. 2005; Homsí et al. 2009). Los antagonistas de CB1 y CB2 inhibieron la acción protectora de la minociclina. Esto sugiere que la activación de CB1 y CB2 contribuye a los efectos de la minociclina, como indican estudios anteriores en los que los agonistas de CB1 y CB2 inhibieron la producción de interleuquinas pro-inflamatorias (Molina-Holgado et al. 2002; Kozela et al. 2010; Paulsen et al. 2011). Además, la activación de los receptores CB2 controla la respuesta inmune de las células microgliales, aumentando su migración hacia el área lesionada o reduciendo la producción de moléculas nocivas como el TNF- $\alpha$  o radicales libres (Walter et al. 2003; Eljaschewitsch et al. 2006; Dirikoc et al. 2007). Particularmente, en los modelos de TCE, la activación selectiva de los receptores CB2 produce una reducción de la microglía reactiva (Elliott et al. 2011), demostrando así la importancia de este receptor en la actividad microglial y su respuesta inmune.

El TCE indujo un déficit neurológico que fue recuperado por el tratamiento con minociclina. Los antagonistas no tuvieron efecto *per se*, pero ambos bloquearon el efecto neuroprotector de la minociclina. Como se demostró en el experimento #4, las disfunciones neurológicas están directamente relacionadas con la formación de edema. Por tanto, las mejoras sobre el daño neurológico ejercido por la minociclina podrían deberse al efecto anti-edematoso de la misma.

Nuestro modelo resultó en un aumento de la reactividad microglial que podría contribuir también al daño axonal difuso (DAD) observado ya que la microglía reactiva dispara respuestas de estrés oxidativo y excitotoxicidad que causan DAD (Hanisch y Kettenmann 2007). Esta posibilidad se ve apoyada por nuestros resultados en el cuerpo calloso donde el TCE aumentó la microglía reactiva y el tratamiento con minociclina la

redujo, sugiriendo que el efecto protector de la minociclina sobre el DAD podría deberse, al menos en parte, al control sobre la microglía reactiva del cuerpo calloso.

Tras el TCE, la minociclina redujo la acumulación de  $\beta$ -APP. El DAD ocurre en zonas de transición entre la materia gris y la materia blanca del cerebro como es el cuerpo calloso (Gennarelli 1994; Povlishock et al. 1994) y se puede detectar por la acumulación de  $\beta$ -APP en los axones lesionados (Roberts et al. 1994). El efecto de la minociclina sobre el DAD podría deberse al control del metabolismo del precursor de amiloide, por la inhibición de la actividad de la enzima de corte BACE-1 y la disminución de los niveles de NFkB (Ferretti et al. 2012). El antagonista CB2 aumentó *per se* la acumulación de  $\beta$ -APP, lo que concuerda con experimentos *in vitro* en los que la activación de CB2 con agonistas específicos estimula la fagocitosis de estos depósitos de  $\beta$ -APP (Tolón et al. 2009).

Como resumen, en todos los parámetros analizados los antagonistas de CB1 y CB2 bloquearon parcialmente los efectos protectores de la minociclina. Sin embargo, parece que el receptor CB2 está más involucrado en estas respuestas del fármaco. Después de una lesión, la microglía reactiva expresa niveles muy altos de CB2 mientras que los de CB1 permanecen bajos (Cabral y Marciano-Cabral 2005). Esta diferencia en la expresión de receptores podría explicar por qué el antagonista de CB1 tiene un efecto menos potente que el de CB2 sobre las acciones de la minociclina.

### **Experimento #8: Implicación del sistema endocannabinoide en los efectos protectores de la leptina tras un traumatismo craneoencefálico**

El experimento #7 sugiere que el receptor CB2 presenta una implicación especialmente relevante en el bloqueo de los efectos beneficiosos de la minociclina. Por esta razón el siguiente experimento se centró en el estudio del receptor CB2 y su implicación en los efectos del tercer agente neuroprotector que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral, la leptina.

El TCE indujo una disminución en el peso corporal, replicando todos los resultados anteriores. Esta pérdida de peso está directamente relacionada con la respuesta del

sistema inmune que libera moléculas pro-inflamatorias, principalmente IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , induciendo fatiga, falta de apetito e ingesta reducida (Kent et al. 1992; Dantzer 2009). Todos los animales lesionados presentaron una disminución de peso comprendida entre el 8-20% pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos sometidos a TCE debidas a los tratamientos con leptina, AM630 o su combinación, lo que podría ser indicativo de una homogeneidad de la severidad de las lesiones.

El TCE disminuyó la puntuación obtenida en el test conductual, indicativa de déficit neurológico. Los animales lesionados tratados con leptina recuperaron los niveles de los animales intactos en el test conductual, lo que concuerda con otros estudios que demuestran que la leptina reduce la discapacidad motora después de un infarto (Avraham et al. 2010). Además, la leptina posee efectos antidepresivos (Lu et al. 2006; Guo et al. 2012; Guo y Lu 2014), lo que podría estar influyendo en las mejoras observadas en el test conductual de los animales tratados con la hormona. El efecto de la leptina se redujo en presencia de AM630, un antagonista del receptor CB2. Ambos receptores, CB2 y el receptor de leptina (ObR), se expresan en estructuras cerebrales relacionadas con las respuestas conductuales analizadas, como el hipocampo (Tang 2008; Suárez et al. 2009). Por tanto sería posible que la señalización mediada por CB2 y ObR interactuaran en estas regiones. Alternativamente, CB2 podría tener un papel más general en la respuesta del tejido cerebral frente a una lesión ya que el antagonismo de CB2 también disminuyó el efecto neuroprotector de la minociclina en el déficit neurológico (#7). De tal modo que es plausible que el bloqueo del receptor CB2 produzca una lesión mucho más severa que la leptina no sea capaz de recuperar a nivel conductual.

Con respecto al SEC, el TCE produjo una disminución en los niveles de ARNm de CB1 y un aumento de CB2. La leptina recuperó los niveles de ARNm de ambos receptores hasta igualarlos a los de los animales intactos. En ambos casos se observó una interacción entre la leptina y el AM630, lo que sugiere que el receptor CB2 sería necesario para la expresión total de los efectos de la leptina sobre los receptores cannabinoides. Estos datos respaldan otros estudios que demuestran una relación entre la leptina y el SEC, como ocurre en el control de la leptina circulante (Deveaux et al. 2009), en el efecto hipotalámico de la leptina (Palomba et al. 2015) o en la síntesis de 2-AG (Di Marzo et al. 2001).

La señalización de supervivencia mediada por la leptina previene la muerte neuronal en diversos modelos de lesión (ver Signore et al. 2008 para revisión). El TCE se caracteriza por provocar muerte neuronal (Cernak 2005), lo que podría explicar la disminución observada en los niveles del receptor CB1 ya que un número menor de neuronas implicaría una menor expresión de CB1 puesto que es en este tipo celular donde este receptor se expresa mayoritariamente (Matsuda et al. 1990; Tsou et al. 1998; Howlett et al. 2002). En consecuencia, la recuperación de los niveles del receptor CB1 causada por el tratamiento con leptina podría reflejar una muerte neuronal reducida.

En contraste, CB2 se expresa fundamentalmente en microglía (Stella 2010). La expresión del ARNm de CB2 aumentó tras el TCE. El tratamiento con leptina previno este aumento y los recuperó hasta los niveles de los animales intactos. Las células de microglía también presentan ObR funcionales (Pinteaux et al. 2007) y la leptina disminuye su reactividad en modelos de lesión de médula espinal (Fernández-Martos et al. 2012). Por lo tanto, la reducción de los niveles del receptor CB2 observada tras el tratamiento con leptina podría deberse a una disminución de la reactividad microglial inducida por la hormona.

Otra característica distintiva del TCE es el DAD (Homsí et al. 2009, 2010), detectable por la acumulación de  $\beta$ -APP (Hortobágyi et al. 2007) y estrechamente relacionado con la sobreexpresión de BACE-1 (Yu et al. 2012). Después de la lesión, los niveles de ARNm de BACE-1 aumentaron y el tratamiento con leptina recuperó su expresión hasta valores similares a los de los animales intactos. Estudios previos han demostrado que la leptina atenúa la expresión de BACE-1 a través de la vía de señalización SIRT1-NF $\kappa$ B (Marwarha et al. 2014) y que niveles elevados de  $\beta$ -APP están asociados con muerte neuronal, disfunción conductual (Mattson 2004) y déficit cognitivo en un modelo de TCE (Smith et al. 1998). Se ha demostrado que la reducción de  $\beta$ -APP mediante la inhibición de BACE-1 aumenta la protección de tejido hipocampal y mejora la recuperación funcional (Loane et al. 2009). Esto podría explicar la mejora en el test conductual causado por el tratamiento con leptina. De hecho, se detectó una correlación negativa entre los niveles de ARNm de BACE-1 y el déficit neurológico.

Tras la lesión, se detectó un aumento en la expresión de vimentina en todos los animales lesionados en comparación con los intactos. La vimentina es expresada por los astrocitos reactivos y generalmente, los compuestos neuroprotectores que reducen el

daño cerebral producen también una reducción en la astrogliosis y en la expresión de vimentina. El hecho de que la leptina fuera incapaz de disminuir la expresión de vimentina tras el TCE parece una contradicción con el resto de efectos neuroprotectores observados. Sin embargo, se ha observado que la leptina induce la sobreexpresión de vimentina en las células de los discos intervertebrales (Li et al. 2013) y aumenta su expresión en los astrocitos hipotalámicos (García-Cáceres et al. 2011). La sobreexpresión de vimentina inducida por la leptina podría explicar que el efecto de la hormona no se asociara a una reducción en los niveles de ARNm de vimentina.

Como resultado de un TCE, se dispara una cascada de expresión de citoquinas y quimioquinas pro- y anti-inflamatorias (revisado en Tuttolomondo et al. 2014). Con nuestro modelo de TCE, se observó una disminución de los niveles del ARNm de IL-10 a las 24 horas y un aumento muy marcado de los niveles de IL-10 tras el tratamiento con leptina, lo que apoya la idea de que las terapias neuroprotectoras aumentan los niveles de IL-10 (Chen et al. 2014). La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que regula negativamente la señalización de moléculas pro-inflamatorias y el tratamiento con esta citoquina produce efectos beneficiosos en distintos modelos experimentales (Cua et al. 2001; Frenkel et al. 2005; Qian et al. 2006; Thompson et al. 2013). Además, se ha visto que los efectos de nuevas aproximaciones terapéuticas como la terapia hiperbárica de oxígeno cursan a través de incrementos en los niveles de IL-10, capaces de reducir la inflamación, la apoptosis y recuperar la integridad de la BHE (Chen et al. 2014). Las propiedades anti-inflamatorias de IL-10 están extensamente documentadas pero se sabe poco sobre su perfil de expresión temporal tras lesiones cerebrales. La expresión de IL-10 aumenta tras un modelo de lesión por percusión por fluidos (Knobloch y Faden 1998) y disminuye en un modelo de impacto cortical controlado (Lee et al. 2012), sugiriendo que el perfil de expresión de la IL-10 depende del tipo de lesión cerebral.

Respecto a las citoquinas pro-inflamatorias, se detectó un aumento significativo en los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  tras el TCE, como se ha demostrado en muchos otros modelos de lesión (Tuttolomondo et al. 2014 para revisión). Se observó un aumento muy pronunciado de los niveles de TNF- $\alpha$  tras el tratamiento con AM630, apoyando diversos estudios que han descrito que la expresión de TNF- $\alpha$  está regulada por el receptor CB2 (Gertsch et al. 2004) y que la estimulación de este receptor con un agonista selectivo atenúa los efectos mediados por TNF- $\alpha$  (Rajesh et al. 2007). En

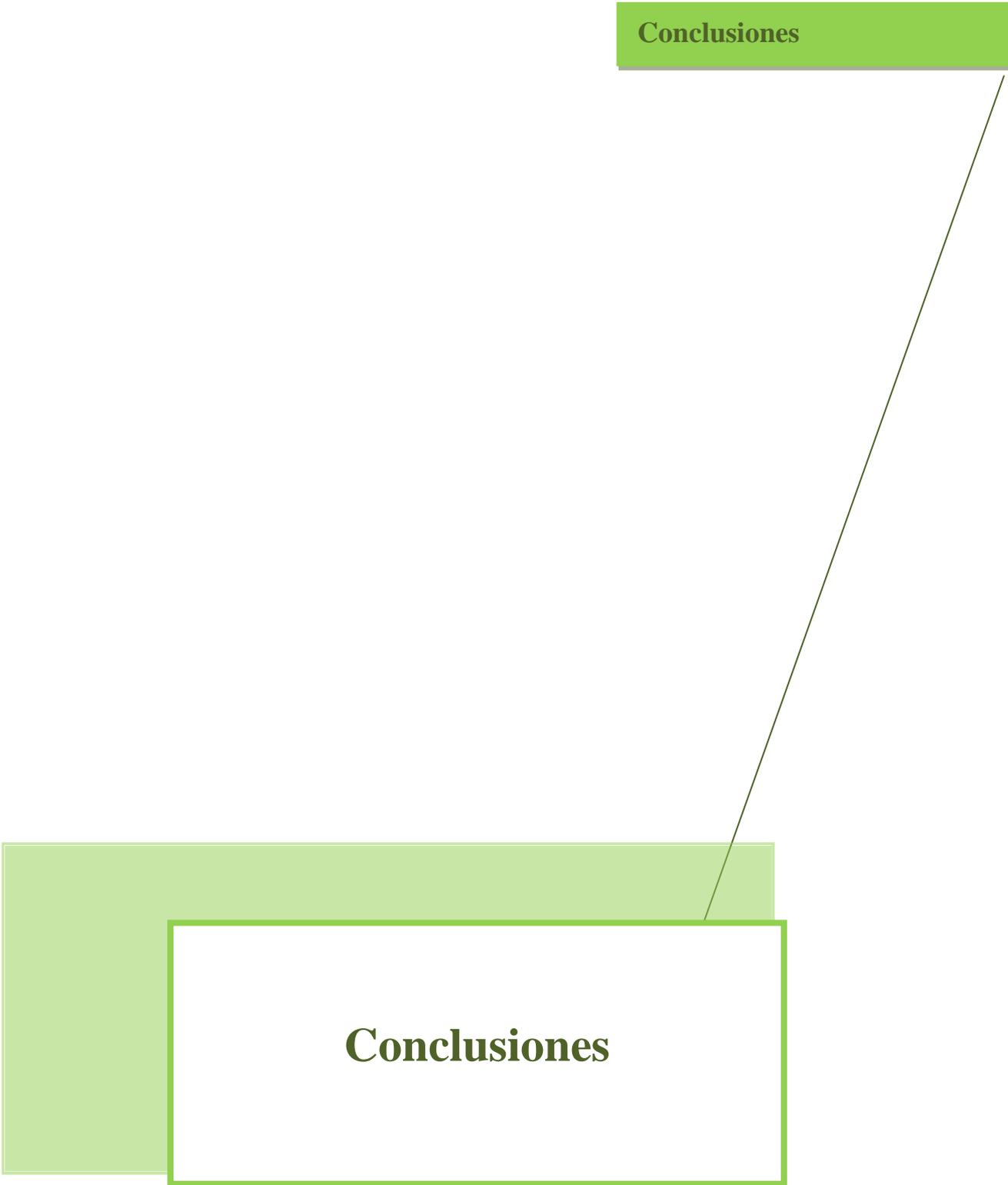
nuestro modelo, el aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  inducido por el AM630 fue revertido por el tratamiento con leptina, de la que se sabe que modula la expresión de esta citoquina mediante la activación de la vía canónica antiapoptótica de JAK-STAT, PI3-kinasa y ERK (Tang 2008).

La citoquina pro-inflamatoria TGF- $\beta$  aumenta rápidamente tras una lesión por criogenización (Cook et al. 1998), impacto cortical controlado (Chodobski et al. 2011) o infarto (Doyle et al. 2010). Nuestros resultados apoyan estos estudios al observarse un aumento en los niveles de ARNm de TGF- $\beta$  tras un TCE. Además, se observó que la leptina atenuó este aumento. Tras un TCE, la BHE se rompe y se produce la entrada masiva de plaquetas que liberan grandes cantidades de TGF- $\beta$  (Dietrich et al. 1994; Schwarzmaier et al. 2010). La regulación de la expresión de TGF- $\beta$  por la leptina podría contribuir a mantener la homeostasis del tejido dañado así como participar en los mecanismos protectores producidos por la hormona.

En resumen, nuestros resultados demostraron que la leptina induce efectos protectores tras un TCE. En varias ocasiones, se detectó una interacción significativa entre leptina y AM630, lo que sugiere que el receptor CB2 sería necesario para la expresión completa de los efectos protectores de la hormona.

**→Resumen traumatismo craneoencefálico:** El SEC participa en el desarrollo y recuperación de un TCE, jugando un papel clave en la formación de edema y del daño neurológico. Participa además en los efectos protectores de la minociclina y la leptina pues estos sistemas comparten vías de modulación relacionadas con la reactividad microglial, el daño axonal y la liberación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias. Los resultados abren nuevas vías para el estudio de la minociclina y de la leptina como tratamientos potenciales de los TCE y remarcan la importancia del receptor CB2 en la recuperación de las lesiones cerebrales.





**Conclusiones**



1. El estradiol ejerce efectos antiglióticos en un modelo de lesión penetrante en rata, disminuyendo el número de células y la densidad de superficie marcadas con GFAP y vimentina. El sistema endocannabinoide está implicado en la acción neuroprotectora del estradiol ya que los antagonistas de los receptores CB1 y CB2 bloquean este efecto de la hormona. La lesión penetrante modifica el sistema endocannabinoide disminuyendo los niveles de ARN mensajero de las enzimas monoacilglicerol lipasa y N-acil fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D específica y aumentando los del receptor CB2. Estas modificaciones del sistema endocannabinoide se ven alteradas por el tratamiento con estradiol, sugiriendo una interacción entre estos dos sistemas en este modelo de lesión.

2. La inhibición de las enzimas de degradación de endocannabinoides, hidrolasa de amidas y ácidos grasos y de la monoacilglicerol lipasa, no altera el efecto antigliótico del estradiol en el modelo de lesión penetrante.

3. La lesión penetrante induce cambios en los niveles cerebrales de endocannabinoides disminuyendo la anandamida y aumentando 2AG, PEA y OEA. El tratamiento con estradiol o con letrozol, un inhibidor de la síntesis de la hormona, no modifica los niveles de endocannabinoides tras la lesión. Los experimentos realizados con el modelo de lesión penetrante sugieren que la interacción entre ambos sistemas no parece deberse a modificaciones en la síntesis de endocannabinoides ni en la síntesis de estradiol sino que la interacción entre sistema endocannabinoide y estradiol cursa a través de los receptores CB1 y CB2.

4. El modelo murino de traumatismo craneoencefálico por caída libre de peso induce una disminución en el peso corporal, un aumento en la formación de edema cerebral y en el daño neurológico, observándose una correlación positiva entre estos dos últimos parámetros. El traumatismo craneoencefálico produce alteraciones en el sistema endocannabinoide, viéndose una disminución en la expresión del receptor CB1 que se correlaciona negativamente con la formación de edema y el daño neurológico, mientras que el receptor CB2 aumenta su expresión y se correlaciona positivamente con el daño neurológico. Los niveles de acuaporina-4 y vimentina también se ven modificados, mostrando ambos marcadores un aumento en su expresión y una correlación positiva con edema y con daño neurológico.

5. El traumatismo craneoencefálico modifica los niveles de endocannabinoides tras la lesión. Aumenta los niveles cerebrales de anandamida, PEA y OEA pero no se observan modificaciones en los de 2AG. El punto temporal donde se alcanzan las mayores diferencias es a las 6 horas tras la lesión.

6. El tratamiento con minociclina modifica los niveles de endocannabinoides 6 horas después del traumatismo craneoencefálico. Disminuye los niveles de anandamida, PEA y OEA en los animales lesionados y los de 2AG en animales intactos, sugiriendo una interacción entre el fármaco y el sistema endocannabinoide.

7. La minociclina ejerce efectos neuroprotectores en un modelo de traumatismo craneoencefálico disminuyendo el daño neurológico, la formación de edema, la reactividad microglial y el daño axonal difuso. Estos efectos son bloqueados cuando se administra la minociclina en combinación con los antagonistas de los receptores CB1 y CB2, observándose una capacidad de bloqueo mayor por parte del receptor CB2. El antagonista CB2 tiene efectos *per se* en la formación de daño axonal difuso, indicando una posible regulación de la enzima BACE-1 por parte del receptor CB2.

8. La leptina presenta efectos anti-inflamatorios en un modelo de traumatismo craneoencefálico. La hormona modifica los niveles de ARN mensajero de los receptores CB1, CB2 y de la enzima BACE-1 hasta alcanzar los niveles de los animales intactos. La leptina no altera la expresión del marcador de neuroinflamación vimentina pero sí disminuye los niveles de TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  y aumenta los de IL-10, marcadores pro- y anti-inflamatorios respectivamente. Estos efectos de la hormona se ven reducidos cuando se administra en combinación con el antagonista del receptor CB2 que presenta, además, un efecto *per se* sobre los niveles de TNF $\alpha$ . Los resultados sugieren que el receptor CB2 está implicado en el mecanismo de acción de esta hormona. El traumatismo craneoencefálico induce una disminución en los niveles plasmáticos de leptina que son recuperados con el tratamiento intraperitoneal de la hormona hasta alcanzar los valores de los animales intactos.

**Bibliografía**



- Adelson PD, Whalen MJ, Kochanek PM, Robichaud P, Carlos TM. 1998. Blood brain barrier permeability and acute inflammation in two models of traumatic brain injury in the immature rat: a preliminary report. *Acta Neurochir Suppl.* 71:104–106.
- Aguilar-Valles A, Inoue W, Rummel C, Luheshi GN. 2015. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology.* 96:124–134.
- Amantea D, Spagnuolo P, Bari M, Fezza F, Mazzei C, Tassorelli C, Morrone LA, Corasaniti MT, Maccarrone M, Bagetta G. 2007. Modulation of the endocannabinoid system by focal brain ischemia in the rat is involved in neuroprotection afforded by 17beta-estradiol. *FEBS J.* 274:4464–4775.
- Amorós I, Barana A, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Tamargo J, Delpón E. 2010. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol.* 48:201–210.
- Arciniegas DB, Anderson CA, Topkoff J, McAllister TW. 2005. Mild traumatic brain injury: a neuropsychiatric approach to diagnosis, evaluation, and treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 1:311–327.
- Arevalo M-A, Santos-Galindo M, Bellini M-J, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2010. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta.* 1800:1106–1112.
- Astiz M, Acaz-Fonseca E, Garcia-Segura LM. 2014. Sex differences and effects of estrogenic compounds on the expression of inflammatory molecules by astrocytes exposed to the insecticide dimethoate. *Neurotox Res.* 25:271–285.
- Avraham Y, Davidi N, Porat M, Chernoguz D, Magen I, Vorobeiv L, Berry EM, Leker RR. 2010. Leptin reduces infarct size in association with enhanced expression of CB2, TRPV1, SIRT-1 and leptin receptor. *Curr Neurovasc Res.* 7:136–143.
- Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. 2002. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22:367–378.
- Barreto G, Santos-Galindo M, Diz-Chaves Y, Pernía O, Carrero P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2009. Selective estrogen receptor modulators decrease reactive astrogliosis in the injured brain: effects of aging and prolonged depletion of ovarian hormones. *Endocrinology.* 150:5010–5015.
- Barreto GE, Santos-Galindo M, Garcia-Segura LM. 2014. Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury. *Front Aging Neurosci.* 6:132.
- Barzó P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F. 1997a. Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J Neurosurg.* 87:900–907.

- Barzó P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F. 1997b. Biphasic pathophysiological response of vasogenic and cellular edema in traumatic brain swelling. *Acta Neurochir Suppl.* 70:119–122.
- Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. 1996. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8374–8378.
- Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. 2008. Pharmacology of traumatic brain injury: where is the “golden bullet”? *Mol Med.* 14:731–740.
- Benito C, Romero JP, Tolón RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J. 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci.* 27:2396–2402.
- Bisagno V, Bowman R, Luine V. 2003. Functional aspects of estrogen neuroprotection. *Endocrine.* 21:33–41.
- Bradshaw HB, Rimmerman N, Krey JF, Walker JM. 2006. Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291:R349–R358.
- Brooks DN. 1972. Memory and head injury. *J Nerv Ment Dis.* 155:350–355.
- Brown SP, Brenowitz SD, Regehr WG. 2003. Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nat Neurosci.* 6:1048–1057.
- Bruno A, Conus S, Schmid I, Simon H-U. 2005. Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J Immunol.* 174:8090–8096.
- Burda JE, Sofroniew M V. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron.* 81:229–248.
- Cabral GA, Marciano-Cabral F. 2005. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol.* 78:1192–1197.
- Carbonell WS, Maris DO, McCall T, Grady MS. 1998. Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J Neurotrauma.* 15:217–229.
- Carey MR, Myoga MH, McDaniels KR, Marsicano G, Lutz B, Mackie K, Regehr WG. 2011. Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses. *J Neurophysiol.* 105:958–963.
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. 2004. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 65:999–1007.

- Cerciat M, Unkila M, Garcia-Segura LM, Arevalo M-A. 2010. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon-gamma-inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia*. 58:93–102.
- Cernak I. 2005. Animal models of head trauma. *NeuroRx*. 2:410–422.
- Chen C-H, Zhou W, Liu S, Deng Y, Cai F, Tone M, Tone Y, Tong Y, Song W. 2012. Increased NF- $\kappa$ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*. 15:77–90.
- Chen G, Shi J, Jin W, Wang L, Xie W, Sun J, Hang C. 2008. Progesterone administration modulates TLRs/NF-kappaB signaling pathway in rat brain after cortical contusion. *Ann Clin Lab Sci*. 38:65–74.
- Chen X, Duan X-S, Xu L-J, Zhao J-J, She Z-F, Chen W-W, Zheng Z-J, Jiang G-D. 2014. Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice. *Neuroscience*. 266:235–243.
- Chen Y, Buck J. 2000. Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*. 293:807–812.
- Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. 2011. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res*. 2:492–516.
- Chu L-S, Fang S-H, Zhou Y, Yin Y-J, Chen W-Y, Li J-H, Sun J, Wang M-L, Zhang W-P, Wei E-Q. 2010. Minocycline inhibits 5-lipoxygenase expression and accelerates functional recovery in chronic phase of focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci*. 86:170–177.
- Cimarosti H, Siqueira IR, Zamin LL, Nassif M, Balk R, Frozza R, Dalmaz C, Netto CA, Salbego C. 2005. Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res*. 30:583–589.
- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell*. 129:251–262.
- Cook JL, Marcheselli V, Alam J, Deininger PL, Bazan NG. 1998. Temporal changes in gene expression following cryogenic rat brain injury. *Brain Res Mol Brain Res*. 55:9–19.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA. 2001. Role of gonadal steroids in the corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin gene expression response to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in the hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology*. 74:185–192.
- Cordaro M, Impellizzeri D, Paterniti I, Bruschetta G, Siracusa R, De Stefano D, Cuzzocrea S, Esposito E. 2015. Neuroprotective Effects of Co-UltraPEALut on

- Secondary Inflammatory Process and Autophagy Involved in Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*.
- Correa F, Docagne F, Mestre L, Clemente D, Hernangómez M, Loría F, Guaza C. 2009. A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. *Biochem Pharmacol*. 77:86–100.
- Craft RM, Leidl MD. 2008. Gonadal hormone modulation of the behavioral effects of Delta9-tetrahydrocannabinol in male and female rats. *Eur J Pharmacol*. 578:37–42.
- Cua DJ, Hutchins B, LaFace DM, Stohlman SA, Coffman RL. 2001. Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 166:602–608.
- Curran NM, Griffin BD, O’Toole D, Brady KJ, Fitzgerald SN, Moynagh PN. 2005. The synthetic cannabinoid R(+)-WIN 55,212-2 inhibits the interleukin-1 signaling pathway in human astrocytes in a cannabinoid receptor-independent manner. *J Biol Chem*. 280:35797–35806.
- d’Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM, Massa S, Liu J, Swanson RA. 2012. Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation*. 9:31.
- Daniel JM, Winsauer PJ, Brauner IN, Moerschbaecher JM. 2002. Estrogen improves response accuracy and attenuates the disruptive effects of delta9-THC in ovariectomized rats responding under a multiple schedule of repeated acquisition and performance. *Behav Neurosci*. 116:989–998.
- Dantzer R. 2009. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am*. 29:247–264.
- Dardiotis E, Paterakis K, Tsivgoulis G, Tsintou M, Hadjigeorgiou GF, Dardioti M, Grigoriadis S, Simeonidou C, Komnos A, Kapsalaki E, Fountas K, Hadjigeorgiou G. 2014. AQP4 tag single nucleotide polymorphisms in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma*.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W-B. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 8:752–758.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 34:605–613.
- Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S, Nhieu JT-V, Belot MP, Zimmer A, Even P, Cani PD, Knauf C, Burcelin R, Bertola A, Le Marchand-Brustel Y, Gual P, Mallat A, Lotersztajn S. 2009. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One*. 4:e5844.

- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Jári Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. 2001. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 410:822–825.
- Dicou E, Attoub S, Gressens P. 2001. Neuroprotective effects of leptin in vivo and in vitro. *Neuroreport*. 12:3947–3951.
- Dietrich WD, Alonso O, Halley M. 1994. Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *J Neurotrauma*. 11:289–301.
- Dina OA, Aley KO, Isenberg W, Messing RO, Levine JD. 2001. Sex hormones regulate the contribution of PKCepsilon and PKA signalling in inflammatory pain in the rat. *Eur J Neurosci*. 13:2227–2233.
- Ding JY, Kreipke CW, Speirs SL, Schafer P, Schafer S, Rafols JA. 2009. Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 453:68–72.
- Dirikoc S, Priola SA, Marella M, Zsürger N, Chabry J. 2007. Nonpsychoactive cannabidiol prevents prion accumulation and protects neurons against prion toxicity. *J Neurosci*. 27:9537–9544.
- Diz-Chaves Y, Pernia O, Carrero P, Garcia-Segura LM. 2012. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation*. 9:71.
- Dodel RC, Du Y, Bales KR, Gao F, Paul SM. 1999. Sodium salicylate and 17beta-estradiol attenuate nuclear transcription factor NF-kappaB translocation in cultured rat astroglial cultures following exposure to amyloid A beta(1-40) and lipopolysaccharides. *J Neurochem*. 73:1453–1460.
- Donnelly DJ, Popovich PG. 2008. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 209:378–388.
- Doyle KP, Cekanaviciute E, Mamer LE, Buckwalter MS. 2010. TGFbeta signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke. *J Neuroinflammation*. 7:62.
- Duhaime AC, Margulies SS, Durham SR, O'Rourke MM, Golden JA, Marwaha S, Raghupathi R. 2000. Maturation-dependent response of the piglet brain to scaled cortical impact. *J Neurosurg*. 93:455–462.
- Ekmark-Lewén S, Lewén A, Israelsson C, Li GL, Farooque M, Olsson Y, Ebendal T, Hillered L. 2010. Vimentin and GFAP responses in astrocytes after contusion trauma to the murine brain. *Restor Neurol Neurosci*. 28:311–321.
- Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O. 2006. The endocannabinoid

- anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*. 49:67–79.
- Elliott MB, Tuma RF, Amenta PS, Barbe MF, Jallo JI. 2011. Acute effects of a selective cannabinoid-2 receptor agonist on neuroinflammation in a model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 28:973–981.
- Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, Iuvone T. 2001. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *J Neurochem*. 78:835–841.
- Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L, De Filippis D, Cottone P, Iuvone T, Cuomo V. 2007. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol*. 151:1272–1279.
- Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. 1989. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*. 244:798–800.
- Fernández-Martos CM, González P, Rodríguez FJ. 2012. Acute leptin treatment enhances functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One*. 7:e35594.
- Fernández-Ruiz J, Pazos MR, García-Arencibia M, Sagredo O, Ramos JA. 2008. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol Cell Endocrinol*. 286:S91–S96.
- Ferrari F, Ottani A, Giuliani D. Inhibitory effects of the cannabinoid agonist HU 210 on rat sexual behaviour. *Physiol Behav*. 69:547–554.
- Ferretti MT, Allard S, Partridge V, Ducatzenzeiler A, Cuello a C. 2012. Minocycline corrects early, pre-plaque neuroinflammation and inhibits BACE-1 in a transgenic model of Alzheimer's disease-like amyloid pathology. *J Neuroinflammation*. 9:62.
- Fowler CJ, Rojo ML, Rodríguez-Gaztelumendi A. 2010. Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? *Exp Neurol*. 224:37–47.
- Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. 1982. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation*. 23:43–59.
- Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Moskowitz MA, Weiner HL. 2005. Neuroprotection by IL-10-producing MOG CD4+ T cells following ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 233:125–132.
- Friedman JM, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395:763–770.
- Gaetani S, Kaye WH, Cuomo V, Piomelli D. 2008. Role of endocannabinoids and their analogues in obesity and eating disorders. *Eat Weight Disord*. 13:e42–e48.

- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 232:54–61.
- García-Cáceres C, Fuente-Martín E, Burgos-Ramos E, Granado M, Frago LM, Barrios V, Horvath T, Argente J, Chowen JA. 2011. Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology.* 152:1809–1818.
- García-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, García-Segura LM. 1993. Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain Res.* 628:271–278.
- García-Estrada J, Luquín S, Fernández AM, García-Segura LM. 1999. Dehydroepiandrosterone, pregnenolone and sex steroids down-regulate reactive astroglia in the male rat brain after a penetrating brain injury. *Int J Dev Neurosci.* 17:145–151.
- García-Gutiérrez MS, Ortega-Álvaro A, Busquets-García A, Pérez-Ortiz JM, Caltana L, Ricatti MJ, Brusco A, Maldonado R, Manzanares J. 2013. Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology.* 73:388–396.
- García-Martínez EM, Sanz-Blasco S, Karachitos A, Bandez MJ, Fernández-Gómez FJ, Pérez-Alvarez S, de Mera RMMF, Jordan MJ, Aguirre N, Galindo MF, Villalobos C, Navarro A, Kmita H, Jordán J. 2010. Mitochondria and calcium flux as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells. *Biochem Pharmacol.* 79:239–250.
- García-Ovejero D, Veiga S, García-Segura LM, DonCarlos LL. 2002. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol.* 450:256–271.
- García-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol.* 63:29–60.
- García-Segura, L.M. Hormones and brain plasticity. *Oxford series in Behavioral Neuroendocrinology.* Oxford University Press. 2009. Capítulo 4.
- Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J. 2013. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol.* 169:337–352.
- Gennarelli TA. 1994. Animate models of human head injury. *J Neurotrauma.* 11:357–368.
- Gentile NT, McIntosh TK. 1993. Antagonists of excitatory amino acids and endogenous opioid peptides in the treatment of experimental central nervous system injury. *Ann Emerg Med.* 22:1028–1034.

- Gertsch J, Schoop R, Kuenzle U, Suter A. 2004. Echinacea alkylamides modulate TNF- $\alpha$  gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 577:563–569.
- González JC, Egea J, Del Carmen Godino M, Fernandez-Gomez FJ, Sánchez-Prieto J, Gandía L, García AG, Jordán J, Hernández-Guijo JM. 2007. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 26:2481–2495.
- Grimaldi P, Rossi G, Catanzaro G, Maccarrone M. 2009. Modulation of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase by follicle-stimulating hormone. *Vitam Horm.* 81:231–261.
- Guasti L, Richardson D, Jhaveri M, Eldeeb K, Barrett D, Elphick MR, Alexander SPH, Kendall D, Michael GJ, Chapman V. 2009. Minocycline treatment inhibits microglial activation and alters spinal levels of endocannabinoids in a rat model of neuropathic pain. *Mol Pain.* 5:35.
- Guilbert J-J. 2006. The World Health Report 2006: working together for health. *Educ Health (Abingdon).* 19:385–387.
- Guo M, Lu X-Y. 2014. Leptin receptor deficiency confers resistance to behavioral effects of fluoxetine and desipramine via separable substrates. *Transl Psychiatry.* 4:e486.
- Guo M, Lu Y, Garza JC, Li Y, Chua SC, Zhang W, Lu B, Lu X-Y. 2012. Forebrain glutamatergic neurons mediate leptin action on depression-like behaviors and synaptic depression. *Transl Psychiatry.* 2:e83.
- Guo Y, Wang H, Okamoto Y, Ueda N, Kingsley PJ, Marnett LJ, Schmid HHO, Das SK, Dey SK. 2005. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation. *J Biol Chem.* 280:23429–23432.
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. 1995. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269:543–546.
- Hanisch U-K, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10:1387–1394.
- Hanstock CC, Faden AI, Bendall MR, Vink R. 1994. Diffusion-weighted imaging differentiates ischemic tissue from traumatized tissue. *Stroke.* 25:843–848.
- Harish G, Mahadevan A, Pruthi N, Sreenivasamurthy SK, Puttamallesh VN, Keshava Prasad TS, Shankar SK, Srinivas Bharath MM. 2015. Characterization of traumatic brain injury in human brains reveals distinct cellular and molecular changes in contusion and pericontusion. *J Neurochem.* 134:156–172.

- Harvey J. 2007. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J Neurochem.* 100:307–313.
- Hatton WJ, von Bartheld CS. 1999. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol.* 409:169–186.
- Hellal F, Bonnefont-Rousselot D, Croci N, Palmier B, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. 2004. Pattern of cerebral edema and hemorrhage in a mice model of diffuse brain injury. *Neurosci Lett.* 357:21–24.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1932–1936.
- Hill MN, Karacabeyli ES, Gorzalka BB. 2007. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology.* 32:350–357.
- Homayoun P, Parkins NE, Soblosky J, Carey ME, Rodriguez de Turco EB, Bazan NG. 2000. Cortical impact injury in rats promotes a rapid and sustained increase in polyunsaturated free fatty acids and diacylglycerols. *Neurochem Res.* 25:269–276.
- Homsí S, Federico F, Croci N, Palmier B, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. 2009. Minocycline effects on cerebral edema: relations with inflammatory and oxidative stress markers following traumatic brain injury in mice. *Brain Res.* 1291:122–132.
- Homsí S, Piaggio T, Croci N, Noble F, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. 2010. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J Neurotrauma.* 27:911–921.
- Hortobágyi T, Wise S, Hunt N, Cary N, Djurovic V, Fegan-Earl A, Shorrock K, Rouse D, Al-Sarraj S. 2007. Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 33:226–237.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161–202.
- Iring A, Ruisanchez É, Leszl-Ishiguro M, Horváth B, Benkő R, Lacza Z, Járai Z, Sándor P, Di Marzo V, Pacher P, Benyó Z. 2013. Role of endocannabinoids and cannabinoid-1 receptors in cerebrocortical blood flow regulation. *PLoS One.* 8:e53390.
- Iwata A, Stys PK, Wolf J a, Chen X-H, Taylor AG, Meaney DF, Smith DH. 2004. Traumatic axonal injury induces proteolytic cleavage of the voltage-gated sodium

- channels modulated by tetrodotoxin and protease inhibitors. *J Neurosci.* 24:4605–4613.
- Kellert BA, Nguyen MC, Nguyen C, Nguyen QH, Wagner EJ. 2009. Estrogen rapidly attenuates cannabinoid-induced changes in energy homeostasis. *Eur J Pharmacol.* 622:15–24.
- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R. 1992. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci.* 13:24–28.
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. 2006. Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol.* 69:691–696.
- Knobloch SM, Faden AI. 1998. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 153:143–151.
- Kochanek PM, Dixon CE, Shellington DK, Shin SS, Bayır H, Jackson EK, Kagan VE, Yan HQ, Swauger P V, Parks SA, Ritzel D V, Bauman R, Clark RSB, Garman RH, Bandak F, Ling G, Jenkins LW. 2013. Screening of biochemical and molecular mechanisms of secondary injury and repair in the brain after experimental blast-induced traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 30:920–937.
- Kolb B, Whishaw IQ, van der Kooy D. 1986. Brain development in the neonatally decorticated rat. *Brain Res.* 397:315–326.
- Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. 2010. Cannabinoids  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Differentially Inhibit the Lipopolysaccharide-activated NF- $\kappa$ B and Interferon- $\beta$ /STAT Proinflammatory Pathways in BV-2 Microglial Cells. *J Biol Chem.* 285:1616–1626.
- Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A, Trauger JW. 2005. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem.* 94:819–827.
- Krause M, Richards S. 2014. Prevalence of traumatic brain injury and access to services in an undergraduate population: a pilot study. *Brain Inj.* 28:1301–1310.
- Kreiter KT, Copeland D, Bernardini GL, Bates JE, Peery S, Claassen J, Du YE, Stern Y, Connolly ES, Mayer SA. 2002. Predictors of cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 33:200–208.
- Larson SJ, Dunn AJ. 2001. Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun.* 15:371–387.
- Lazovic J, Basu A, Lin H-W, Rothstein RP, Krady JK, Smith MB, Levison SW. 2005. Neuroinflammation and both cytotoxic and vasogenic edema are reduced in interleukin-1 type 1 receptor-deficient mice conferring neuroprotection. *Stroke.* 36:2226–2231.

- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*. 283:401–404.
- Lee H-F, Lee T-S, Kou YR. 2012. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of triptolide on traumatic brain injury in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 182:1–8.
- Lephart ED. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev*. 22:1–26.
- Levin HS, Benton AL, Grossman R (1982). "Historical review of head injury". *Neurobehavioral Consequences of Closed Head Injury*. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. pp. 3–5. ISBN 0-19-503008-7. Retrieved 2008-11-08.
- Levin HS, Diaz-Arrastia RR. 2015. Diagnosis, prognosis, and clinical management of mild traumatic brain injury. *Lancet Neurol*. 14:506–517.
- Lewis JS, Jordan VC. 2005. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res*. 591:247–263.
- Li Z, Shen J, Wu WKK, Yu X, Liang J, Qiu G, Liu J. 2013. The role of leptin on the organization and expression of cytoskeleton elements in nucleus pulposus cells. *J Orthop Res*. 31:847–857.
- Licinio J, Negrao AB, Wong M-L. 2014. Plasma leptin concentrations are highly correlated to emotional states throughout the day. *Transl Psychiatry*. 4:e475.
- Litvin Y, Phan A, Hill MN, Pfaff DW, McEwen BS. 2013. CB1 receptor signaling regulates social anxiety and memory. *Genes Brain Behav*. 12:479–489.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim H-Y, Kunos G. 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:13345–13350.
- Liu R, Wang X, Liu Q, Yang S-H, Simpkins JW. 2007. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of 17beta-estradiol when administered after cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 415:237–241.
- Loane DJ, Pocivavsek A, Moussa CE-H, Thompson R, Matsuoka Y, Faden AI, Rebeck GW, Burns MP. 2009. Amyloid precursor protein secretases as therapeutic targets for traumatic brain injury. *Nat Med*. 15:377–379.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 12:57–65.
- López HH. 2010. Cannabinoid-hormone interactions in the regulation of motivational processes. *Horm Behav*. 58:100–110.

- López HH, Zappia K, Cushman CL, Chadwick B. 2010. Acute cannabinoid administration attenuates female socio-sexual motivation. *Pharmacol Biochem Behav.* 94:482–487.
- Lu H, Lei X-Y, Hu H, He Z-P. 2013. Relationship between AQP4 expression and structural damage to the blood-brain barrier at early stages of traumatic brain injury in rats. *Chin Med J (Engl).* 126:4316–4321.
- Lu J, Park C-S, Lee S-K, Shin DW, Kang J-H. 2006. Leptin inhibits 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett.* 407:240–243.
- Lucas S-M, Rothwell NJ, Gibson RM. 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 147:S232–S240.
- Luongo L, Palazzo E, Tambaro S, Giordano C, Gatta L, Scafuro MA, Rossi FS, Lazzari P, Pani L, de Novellis V, Malcangio M, Maione S. 2010. 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. *Neurobiol Dis.* 37:177–185.
- Lynn AB, Herkenham M. 1994. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 268:1612–1623.
- MacCarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agrò A. 2000. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem.* 267:2991–2997.
- Mackie K. 2006. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:101–122.
- Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E. 2004. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol.* 66:291–313.
- Marco EM, Viveros MP. 2009. The critical role of the endocannabinoid system in emotional homeostasis: avoiding excess and deficiencies. *Mini Rev Med Chem.* 9:1407–1415.
- Marin R, Díaz M, Alonso R, Sanz A, Arévalo MA, Garcia-Segura LM. 2009. Role of estrogen receptor alpha in membrane-initiated signaling in neural cells: interaction with IGF-1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 114:2–7.
- Markovic DS, Vinnakota K, Van Rooijen N, Kiwit J, Synowitz M, Glass R, Kettenmann H. 2011. Minocycline reduces glioma expansion and invasion by attenuating microglial MT1-MMP expression. *Brain Behav Immun.* 25:624–628.
- Marmarou A. 2003. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir Suppl.* 86:7–10.

- Marwarha G, Raza S, Meiers C, Ghribi O. 2014. Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- $\beta$  genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1842:1587–1595.
- Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. 2015. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1851:503–518.
- Masson F, Thicoipe M, Aye P, Mokni T, Senjean P, Schmitt V, Dessalles PH, Cazaugade M, Labadens P. 2001. Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study. *J Trauma*. 51:481–489.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561–564.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. 430:631–639.
- McAllister TW. 2008. Neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury: evaluation and management. *World Psychiatry*. 7:3–10.
- McLean A, Temkin NR, Dikmen S, Wyler AR. 1983. The behavioral sequelae of head injury. *J Clin Neuropsychol*. 5:361–376.
- Merighi S, Gessi S, Varani K, Simioni C, Fazzi D, Mirandola P, Borea PA. 2012. Cannabinoid CB2 receptors modulate ERK-1/2 kinase signalling and NO release in microglial cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*. 165:1773–1788.
- Merrill JE, Benveniste EN. 1996. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci*. 19:331–338.
- Micale V, Mazzola C, Drago F. 2007. Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc*. 56:382–392.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. 2002. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci*. 22:9742–9753.
- Molina-Holgado F, Lledó A, Guaza C. 1997. Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport*. 8:1929–1933.
- Möller T, Hanisch UK, Ransom BR. 2000. Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia. *J Neurochem*. 75:1539–1547.

- Mor G, Nilsen J, Horvath T, Bechmann I, Brown S, Garcia-Segura LM, Naftolin F. 1999. Estrogen and microglia: A regulatory system that affects the brain. *J Neurobiol.* 40:484–496.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61–65.
- Myburgh JA, Cooper DJ, Finfer SR, Venkatesh B, Jones D, Higgins A, Bishop N, Higglett T. 2008. Epidemiology and 12-month outcomes from traumatic brain injury in australia and new zealand. *J Trauma.* 64:854–862.
- Naftolin F, MacLusky NJ. 1982. Aromatase in the central nervous system. *Cancer Res.* 42:3274s – 3276s.
- Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA. 1999. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci.* 19:2987–2995.
- Navarrete M, Araque A. 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron.* 57:883–893.
- Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. 2006. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem.* 96:314–323.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308:1314–1318.
- Nishino A, Suzuki M, Ohtani H, Motohashi O, Umezawa K, Nagura H, Yoshimoto T. 1993. Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. *J Neurotrauma.* 10:167–179.
- O'Connor CA, Cernak I, Vink R. 2006. The temporal profile of edema formation differs between male and female rats following diffuse traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl.* 96:121–124.
- Onaivi ES. 2011. Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropharmacol.* 9:205–208.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. 2006. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20:2405–2407.
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia I, Fernández-Ruiz J, Guzmán M, Galve-Roperh I. 2009. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain.* 132:3152–3164.

- Palomba L, Silvestri C, Imperatore R, Morello G, Piscitelli F, Martella A, Cristino L, Di Marzo V. 2015. Negative Regulation of Leptin-induced ROS Formation by CB1 Receptor Activation in Hypothalamic Neurons. *J Biol Chem.* 290:13669–13677.
- Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E. 2005. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25:477–484.
- Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E. 2006. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis.* 22:257–264.
- Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer a, Mechoulam R, Shohami E. 2001. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.* 413:527–531.
- Parvathy SS, Masocha W. 2015. Coadministration of indomethacin and minocycline attenuates established paclitaxel-induced neuropathic thermal hyperalgesia: Involvement of cannabinoid CB1 receptors. *Sci Rep.* 5:10541.
- Paulsen K, Tauber S, Timm J, Goelz N, Dumrese C, Stolzing A, Hass R, Ullrich O. 2011. The cannabinoid receptors agonist WIN55212-2 inhibits macrophageal differentiation and alters expression and phosphorylation of cell cycle control proteins. *Cell Commun Signal CCS.* 9:33.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4th ed. New York: Elsevier 256 p.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestål YR, Pekna M. 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol.* 82:95–111.
- Pinteaux E, Inoue W, Schmidt L, Molina-Holgado F, Rothwell NJ, Luheshi GN. 2007. Leptin induces interleukin-1beta release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. *J Neurochem.* 102:826–833.
- Piomelli D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4:873–884.
- Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, Deng W. 2010. Prospects for minocycline neuroprotection. *Arch Neurol.* 67:1442–1448.
- Potokar M, Stenovec M, Jorgačevski J, Holen T, Kreft M, Ottersen OP, Zorec R. 2013. Regulation of AQP4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes. *Glia.* 61:917–928.
- Povlishock JT, Hayes RL, Michel ME, McIntosh TK. 1994. Workshop on animal models of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 11:723–732.

- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol.* 70:165–190.
- Qian L, Block ML, Wei S-J, Lin C-F, Reece J, Pang H, Wilson B, Hong J-S, Flood PM. 2006. Interleukin-10 protects lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in primary midbrain cultures by inhibiting the function of NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther.* 319:44–52.
- Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Krust A, Graham SM, Murphy SJ, Korach KS, Chambon P, Scanlan TS, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. 2006. A G-protein-coupled estrogen receptor is involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Neurosci.* 26:5649–5655.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Haskó G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. 2007. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H2210–H2218.
- Rao SP, Sikdar SK. 2006. Astrocytes in 17beta-estradiol treated mixed hippocampal cultures show attenuated calcium response to neuronal activity. *Glia.* 53:817–826.
- Ren Z, Iliff JJ, Yang L, Yang J, Chen X, Chen MJ, Giese RN, Wang B, Shi X, Nedergaard M. 2013. “Hit & Run” model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 33:834–845.
- Ribeiro ML, Vercelli CA, Sordelli MS, Farina MG, Cervini M, Billi S, Franchi AM. 2009. 17beta-oestradiol and progesterone regulate anandamide synthesis in the rat uterus. *Reprod Biomed Online.* 18:209–218.
- Roberts GW, Gentleman SM, Lynch a, Murray L, Landon M, Graham DI. 1994. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 57:419–425.
- Rochat L, Beni C, Billieux J, Azouvi P, Annoni J-M, Van der Linden M. 2010. Assessment of impulsivity after moderate to severe traumatic brain injury. *Neuropsychol Rehabil.* 20:778–797.
- Rodríguez de Fonseca F, Cebeira M, Ramos JA, Martín M, Fernández-Ruiz JJ. 1994. Cannabinoid receptors in rat brain areas: sexual differences, fluctuations during estrous cycle and changes after gonadectomy and sex steroid replacement. *Life Sci.* 54:159–170.
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM. 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci.* 21:823–833.

- Romero-Perez D, Fricovsky E, Yamasaki KG, Griffin M, Barraza-Hidalgo M, Dillmann W, Villarreal F. 2008. Cardiac uptake of minocycline and mechanisms for in vivo cardioprotection. *J Am Coll Cardiol.* 52:1086–1094.
- Romero-Sandoval EA, Horvath R, Landry RP, DeLeo JA. 2009. Cannabinoid receptor type 2 activation induces a microglial anti-inflammatory phenotype and reduces migration via MKP induction and ERK dephosphorylation. *Mol Pain.* 5:25.
- Ryu JK, Davalos D, Akassoglou K. 2009. Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost.* 7 Suppl 1:151–154.
- Sagredo O, González S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, Romero JP, Tolón RM, Mechoulam R, Brouillet E, Romero J, Fernández-Ruiz J. 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia.* 57:1154–1167.
- Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. 2001. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery.* 48:1393–1399; discussion 1399–1401.
- Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. 2000. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett.* 472:39–44.
- Sarne Y, Asaf F, Fishbein M, Gafni M, Keren O. 2011. The dual neuroprotective-neurotoxic profile of cannabinoid drugs. *Br J Pharmacol.* 163:1391–1401.
- Schwarzmaier SM, Kim S-W, Trabold R, Plesnila N. 2010. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma.* 27:121–130.
- Segars JH, Driggers PH. 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab.* 13:349–354.
- Shenaq M, Kassem H, Peng C, Schafer S, Ding JY, Fredrickson V, Guthikonda M, Kreipke CW, Rafols J a, Ding Y. 2012. Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1 $\alpha$  after traumatic brain injury (TBI). *J Neurol Sci.* 323:134–140.
- Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. 2005. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia.* 49:211–219.
- Shohami E, Cohen-Yeshurun A, Magid L, Algali M, Mechoulam R. 2011. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* 163:1402–1410.
- Siegl D, Annecke T, Johnson BL, Schlag C, Martignoni A, Huber N, Conzen P, Caldwell CC, Tschöp J. 2014. Obesity-induced hyperleptinemia improves survival and immune response in a murine model of sepsis. *Anesthesiology.* 121:98–114.

- Signore AP, Zhang F, Weng Z, Gao Y, Chen J. 2008. Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem.* 106:1977–1990.
- Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA. 2000. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 278:157–160.
- Siopi E, Calabria S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. 2012. Minocycline restores olfactory bulb volume and olfactory behavior after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma.* 29:354–361.
- Siopi E, Cho AH, Homsy S, Croci N, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. 2011. Minocycline restores sAPP $\alpha$  levels and reduces the late histopathological consequences of traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma.* 28:2135–2143.
- Siopi E, Llufríu-Dabén G, Cho AH, Vidal-Lletjós S, Plotkine M, Marchand-Leroux C, Jafarian-Tehrani M. 2012. Etazolate, an  $\alpha$ -secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *Neuropharmacology.* 67C:183–192.
- Smith DH, Nakamura M, McIntosh TK, Wang J, Rodríguez A, Chen XH, Raghupathi R, Saatman KE, Clemens J, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ. 1998. Brain trauma induces massive hippocampal neuron death linked to a surge in beta-amyloid levels in mice overexpressing mutant amyloid precursor protein. *Am J Pathol.* 153:1005–1010.
- Sofroniew M V, Vinters H V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119:7–35.
- Stella N. 2010. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia.* 58:1017–1030.
- Stone DJ, Song Y, Anderson CP, Krohn KK, Finch CE, Rozovsky I. 1998. Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 139:3202–3209.
- Straiker A, Mackie K. 2006. Cannabinoids, electrophysiology, and retrograde messengers: challenges for the next 5 years. *AAPS J.* 8:E272–E276.
- Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros M-P. 2009. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus.* 19:623–632.
- Sun Y, Alexander SPH, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ. 2007. Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol.* 152:734–743.
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM. 2006. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine.* 29:209–215.

- Tang BL. 2008. Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem Biophys Res Commun.* 368:181–185.
- Thompson CD, Zurko JC, Hanna BF, Hellenbrand DJ, Hanna A. 2013. The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 30:1311–1324.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci.* 21:2580–2588.
- Tikka TM, Koistinaho JE. 2001. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol.* 166:7527–7533.
- Tolón RM, Núñez E, Pazos MR, Benito C, Castillo AI, Martínez-Orgado JA, Romero J. 2009. The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Res.* 1283:148–154.
- Tschöp J, Nogueiras R, Haas-Lockie S, Kasten KR, Castañeda TR, Huber N, Guanciale K, Perez-Tilve D, Habegger K, Ottaway N, Woods SC, Oldfield B, Clarke I, Chua S, Farooqi IS, O’Rahilly S, Caldwell CC, Tschöp MH. 2010. CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. *J Neurosci.* 30:6036–6047.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 83:393–411.
- Tuttolomondo A, Pecoraro R, Pinto A. 2014. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drug Des Devel Ther.* 8:2221–2238.
- Van der Stelt M, Di Marzo V. 2005. Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 77:111–122.
- Vanezis P, Chan KK, Scholtz CL. 1987. White matter damage following acute head injury. *Forensic Sci Int.* 35:1–10.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. 1995. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature.* 376:590–594.
- Vendel E, de Lange ECM. 2014. Functions of the CB1 and CB 2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier. *Neuromolecular Med.* 16:620–642.
- Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC. 2006. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta.* 1758:1085–1093.

- Vizuete ML, Venero JL, Vargas C, Ilundáin AA, Echevarría M, Machado A, Cano J. 1999. Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis.* 6:245–258.
- Walker KR, Tesco G. 2013. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. *Front Aging Neurosci.* 5:29.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. 2003. Microglial Cell Migration. 23:1398–1405.
- Walter L, Stella N. 2004. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol.* 141:775–785.
- Wang H, Gao J, Lassiter TF, McDonagh DL, Sheng H, Warner DS, Lynch JR, Laskowitz DT. 2006. Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 5:71–78.
- Wei EP, Lamb RG, Kontos HA. 1982. Increased phospholipase C activity after experimental brain injury. *J Neurosurg.* 56:695–698.
- Werner C, Engelhard K. 2000. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Crit Care Nurs Q.* 23:14–25; quiz 65.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Möller T, Stella N. 2004. P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3214–3219.
- Wortzel HS, Arciniegas DB. 2012. Treatment of post-traumatic cognitive impairments. *Curr Treat Options Neurol.* 14:493–508.
- Wu X, Hu J, Zhuo L, Fu C, Hui G, Wang Y, Yang W, Teng L, Lu S, Xu G. 2008. Epidemiology of traumatic brain injury in eastern China, 2004: a prospective large case study. *J Trauma.* 64:1313–1319.
- Xiao AZ, Zhao YG, Duan EK. 2002. Expression and regulation of the fatty acid amide hydrolase gene in the rat uterus during the estrous cycle and peri-implantation period. *Mol Hum Reprod.* 8:651–658.
- Xiao E, Xia-Zhang L, Vulliémoz NR, Ferin M, Wardlaw SL. 2003. Leptin modulates inflammatory cytokine and neuroendocrine responses to endotoxin in the primate. *Endocrinology.* 144:4350–4353.
- Xiong Y, Gu Q, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP. 1997. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 14:23–34.
- Yang B, Zador Z, Verkman AS. 2008. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem.* 283:15280–15286.

- Yu F, Zhang Y, Chuang D-M. 2012. Lithium reduces BACE1 overexpression,  $\beta$  amyloid accumulation, and spatial learning deficits in mice with traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 29:2342–2351.
- Zhang J, Chen C. 2008. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J Biol Chem*. 283:22601–22611.
- Zhang J, Deng Z, Liao J, Song C, Liang C, Xue H, Wang L, Zhang K, Yan G. 2013. Leptin attenuates cerebral ischemia injury through the promotion of energy metabolism via the PI3K/Akt pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 33:567–574.
- Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RJ, Kong W, Ganea D, Tuma RF. 2009. Modulation of cannabinoid receptor activation as a neuroprotective strategy for EAE and stroke. *J Neuroimmune Pharmacol*. 4:249–259.



**Anexo I**

**Publicaciones derivadas de la Tesis**



**Anexo II**

**Otras publicaciones**

