

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

**“Efecto del cannabidiol en la sobreliberación de glutamato y la expresión de
citocinas inflamatorias inducidas por un traumatismo craneoencefálico severo
en rata”**

T E S I S

Que presenta:

M. EN C. CINDY LIZBETH SANTIAGO CASTAÑEDA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL

Directora de la tesis:

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

Dra. Sandra Adela Orozco Suárez

✚ La presente investigación se realizó en el laboratorio No. 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV, Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta y la Dra. Sandra A. Orozco Suárez, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

✚ Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado número 615621 y proyecto A3-S-26782.

Índice general

I. Índice figuras	i
II. Índice tablas	ii
III. Abreviaturas	iii
IV. Resumen	iv
V. Abstract	v
1. Introducción.....	1
1.1. Traumatismo Craneoencefálico.....	1
1.1.1. Epidemiología	1
1.1.1.1. Poblaciones de alto riesgo a TCE	2
1.1.2. Fisiopatología.....	2
1.1.2.1. Excitotoxicidad.....	3
1.1.2.2. Neuroinflamación	5
1.1.3. Estructuras cerebrales dañadas post-TCE y su relación funcional.....	7
1.2. Tratamiento clínico para las consecuencias inducidas por el TCE	9
1.3. Cannabidiol.....	10
1.3.1.1. Farmacocinética.....	10
1.3.1.2. Mecanismo de acción y efectos	11
2. Justificación	14
3. Hipótesis y Objetivos	15
3.1. Hipótesis	15
3.2. Objetivos.....	15
3.2.1. General	15
3.2.2. Específicos	15
4. Metodología experimental.....	16
4.1. Animales.....	16
4.2. Inducción de TCE.....	16
4.2.1. Craneotomía	16
4.2.2. Lesión lateral por percusión de fluidos (LLPF)	16
4.3. Grupos experimentales	17
4.3.1. Experimento I.....	17

4.3.1.1.	Grupo CBD200-TCE.....	17
4.3.1.2.	Grupo CBD100-TCE.....	18
4.3.1.3.	Grupo CBD50-TCE.....	18
4.3.1.4.	Grupo TCE	19
4.3.1.5.	Grupo SHAM	19
4.3.2.	Experimento II	19
4.3.2.1.	Grupo CBD-TCE-CBD	19
4.3.2.2.	Grupo CBD-TCE.....	20
4.3.2.3.	Grupo TCE	20
4.3.2.4.	Grupo SHAM	20
4.3.2.5.	Grupo CBD.....	20
4.4.	Neuroscore.....	21
4.4.1.	Prueba de contraflexión.....	21
4.4.2.	Prueba de extensión de extremidades posteriores.....	22
4.4.3.	Pulsión lateral.....	23
4.4.4.	Plano inclinado.....	24
4.5.	Evaluación de la concentración extracelular de glutamato	25
4.5.1.	Cirugía para implantación de cánula guía.....	25
4.5.2.	Microdiálisis.....	25
4.5.3.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	26
4.6.	Evaluación de citocinas proinflamatorias.....	27
4.6.1.	Obtención y preparación del tejido cerebral	27
4.6.2.	Western Blot.....	27
4.6.2.1.	Extracción de proteínas totales y cuantificación	27
4.6.2.2.	Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	27
4.6.2.3.	Inmunodetección de las proteínas de interés	28
4.7.	Análisis estadístico	28
5.	Experimento 1:	29
5.1.	Resultados.....	29
5.1.1.	Evaluación del efecto del CBD en la concentración de glutamato extracelular antes y después de un TCE severo.....	29
5.1.2.	Evaluación del efecto del CBD en la expresión de citocinas proinflamatorias 24 h después de un TCE severo	33

5.1.3. Evaluación del efecto del CBD en la función sensoriomotora, peso y mortalidad	36
5.2. Discusión	38
6. Experimento 2:	45
6.1. Resultados.....	45
6.1.1. Evaluación del efecto del CBD en la concentración de glutamato extracelular a los 30 días posterior a un TCE severo	45
6.1.2. Evaluación del efecto del CBD en la expresión de citocinas proinflamatorias a los 31 días posterior a un TCE severo.	45
6.1.3. Evaluación del efecto del CBD en la función sensoriomotora, peso y mortalidad al día 28 post-TCE.....	48
6.2. Discusión	49
7. Conclusiones.....	53
8. Perspectivas	54
9. Referencias	55

I. Índice figuras

Figura 1. Fisiopatología de un TCE.....	13
Figura 2. Excitotoxicidad mediada por glutamato.....	4
Figura 3. Daño en la BHE posterior a un TCE	6
Figura 4. Estructura molecular del cannabidiol	10
Figura 5. Modelo de LLFP	17
Figura 6. Diseño experimental del experimento I	18
Figura 7. Diseño experimental del experimento II	20
Figura 8. Prueba de contraflexión.....	22
Figura 9. Prueba de extensión de extremidades posteriores	23
Figura 10. Pulsión lateral	23
Figura 11. Evaluación de plano inclinado	25
Figura 12. Efecto de la administración oral de diferentes dosis de CBD sobre la liberación de glutamato inducido por un TCE severo	30
Figura 13. Área bajo la curva	32
Figura 14. Expresión de citocinas proinflamatorias 24h post-TCE en corteza cerebral.....	35
Figura 15. Concentración extracelular de glutamato al día 30 post-TCE.....	46
Figura 16. Expresión de citocinas proinflamatorias al día 31 post-TCE en corteza cerebral	47

II. Índice tablas

Tabla 1. Plano inclinado24

Tabla 2. Efecto del pretratamiento con CBD en los cambios en peso, función sensoriomotora y mortalidad inducidos a las 48 horas post-TCE37

Tabla 3. Efecto del tratamiento con CBD sobre los cambios inducidos por un TCE severo en el peso corporal, la función sensoriomotora y la mortalidad en ratas al día 28 post-TCE49

III. Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CBD	Cannabidiol
Ca ²⁺	Calcio
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés)
EE	Error estándar
h	Horas
HyE	Tinción de Hematoxilina-Eosina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
K ⁺	Potasio
kg	Kilogramo
LLPF	Lesión lateral por percusión de fluidos
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Na ⁺	Sodio
nm	Nanómetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
TBS	Buffer de fosfatos
s	Segundos
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
TCE	Traumatismo craneoencefálico

IV. Resumen

Dada la relevancia epidemiológica del traumatismo craneoencefálico (TCE) se buscan nuevas estrategias neuroprotectoras para prevenir la inflamación y excitotoxicidad post-TCE. El cannabidiol (CBD) es una molécula multiblanco que induce neuroprotección en diversos modelos animales. El presente estudio estuvo enfocado en evaluar el tratamiento con CBD en las concentraciones extracelulares de glutamato y la expresión de citocinas proinflamatorias después de un TCE severo.

Métodos. Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g). A) Efectos a corto plazo. Las ratas se implantaron con una cánula guía en la corteza cerebral y se pretrataron con CBD (50, 100 o 200 mg/kg v.o. diariamente durante 7 días, n=7 por dosis), o vehículo (n=7). Doce horas después de la última administración, los animales se utilizaron para experimentos de microdialísis. Los animales recibieron un TCE severo por medio del modelo de percusión de fluidos lateral. Los dializados se recuperaron continuamente antes, durante y después del TCE. Adicionalmente, se trabajó con grupos independientes que no se sometieron al experimento de microdialísis. Estos animales se sacrificaron 24 horas post-TCE y sus cerebros se utilizaron para evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Los resultados de este experimento se usaron para determinar la dosis óptima de CBD, es decir, la dosis más efectiva que disminuyera la sobre liberación de glutamato y de citocinas proinflamatorias post-TCE. B) Efectos a largo plazo (n=35). Las ratas fueron pretratadas (CBD 100 mg/kg o vehículo) y divididas en 5 grupos independientes (n=7 por grupo), 12 h después de la última administración, se indujo un TCE severo (excepto grupo SHAM y CBD). El grupo CBD+TCE+CBD continuó con la administración de CBD durante 7 días post-TCE. Al día 23 post-TCE, las ratas se implantaron con una cánula guía en la corteza cerebral. Una semana después se realizó un el experimento de microdialísis cortical. Se evaluó la mortalidad después de la inducción del TCE, así como la ganancia de peso corporal y la capacidad sensoriomotora (Neuroscore, NS) un día antes y a los días 2, 7, 14, 21 y 28 post-TCE.

Resultados. A) Experimentos a corto plazo. El grupo TCE presentó un incremento en la concentración de glutamato 30 min post-TCE (738% \pm 173 p<0.001) así como de TNF- α (53.4 \pm 3.4%, p<0.05), IL-1 β (59.2 \pm 7.7 %, p<0.05) e IL-6 (49.9 \pm 4.0 %, p<0,05) vs SHAM respectivamente. El grupo pretratado con CBD a 100 mg/kg presentó menor liberación de glutamato post-TCE (222% \pm 33 p<0.01 vs TCE) así como menor expresión de IL-6 (p<0.05 vs TCE). Estos efectos fueron menos evidente con CBD a 50 o 200 mg/kg. Por lo anterior, se estableció la dosis de 100 mg/kg como la dosis óptima. B) Experimentos a largo plazo. El grupo TCE presentó una mayor concentración de glutamato (2.0 \pm 0.27 μ M, p<0.01 vs SHAM). Por el contrario, en el grupo pre y/o tratado con CBD 100 mg/kg, la concentración de glutamato fue de 0.73 \pm 0.19 μ M y 1 \pm 0.21 μ M respectivamente, que fue inferior al obtenido por el grupo TCE (p<0.01 y p<0.05). La expresión de citocinas proinflamatorias fue mayor en el grupo TCE: TNF- α (86 \pm 27.5%, p<0.01), IL-1 β (61.2 \pm 16.1%, p<0.01) e IL-6 (53 \pm 11 %, p<0.05) vs SHAM respectivamente. El aumento de la expresión de IL-6 también se observó en el grupo pretratado con CBD 100 mg/kg (43.8 \pm 16.9% p<0.05 vs SHAM) pero no en el grupo pre y postratado con CBD (p=0.454 vs SHAM). El NS antes del TCE fue de 26-27 puntos en todos los grupos y los grupos SHAM y CBD mantuvieron esta puntuación en todo el experimento. Por el contrario, el grupo TCE presentó un NS de 11.29 \pm 1.8 (p<0.001 vs SHAM) al día 2 post-TCE. Los valores aumentaron gradualmente y alcanzaron 17.6 \pm 1.1 puntos al día 28 (p<0.001 vs SHAM). Esta recuperación a largo plazo fue más evidente en los grupos pre y/o tratados con CBD (p<0.05 vs TCE).

Conclusión. El tratamiento con CBD reduce las consecuencias a largo plazo inducidas por un TCE severo. Esto podría representar una posible estrategia neuroprotectora futura para el TCE.

V. Abstract

Strategies to prevent the short- and long-term consequences induced by traumatic brain injury (TBI) are prompted. On the other hand, cannabidiol (CBD) is a multitarget molecule that induces neuroprotection and reduces excitotoxicity in animal models. The present study focused to demonstrate that treatment with CBD lessens the high extracellular levels of glutamate and proinflammatory cytokines, short- and long-term after a severe TBI. **Methods.** Male Wistar rats (250-300 g) were used. A) Short-term effects. Rats previously implanted with a guide-cannula in sensorimotor cortex were pretreated with CBD (50, 100 or 200 mg/kg p.o. daily for 7 days, n=7 per dose), or vehicle (n=7). Twelve hours after the last administration, animals were used for microdialysis experiments. Under isoflurane anesthesia animals received a lateral fluid percussion injury to induce a severe TBI. Dialysates were continuously recovered before, during and after TBI. Additionally, independent groups that did not undergo the microdialysis experiment were worked on. These animals were sacrificed 24 hours after TBI induction, and the brains were used to evaluate the expression of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). The results from this experiment were used to determine the optimal dose of CBD, i.e., the dose more effective to lessen the high glutamate release and proinflammatory cytokines after TBI. B) Long-term effects (n=35). Rats were pretreated (CBD 100 mg/kg or vehicle) and divided in 5 groups (n=7 per group), one day later, a severe TBI was induced (except SHAM and CBD group). The group CBD+TBI+CBD continued administration for 7 days more after TBI. On day 23rd post-TBI, rats underwent a stereotactic surgery to implant a guide-cannula in the brain cortex. One week after, cortical microdialysis was performed. Mortality after TBI induction was assessed and neuroscore test (NS)-body weight gain was evaluated one day before and 2,7,14,21 and 28 post-TBI. **Results.** A) Short-term experiments. TBI group showed an increased glutamate concentration 30 min post-TBI (738% \pm 173 p<0.001 vs SHAM) and TNF- α (53.4 \pm 3.4%, p<0.05), IL-1 β (59.2 \pm 7.7 %, p<0.05) e IL-6 (49.9 \pm 4.0 %, p<0.05) vs SHAM respectively. CBD at 100 mg/kg reduced the TBI-induced glutamate release (222% \pm 33 p<0.01 vs TBI) and a lower expression of IL-6 (p<0.05 vs TBI). This effect was less evident with CBD at 50 or 200 mg/kg. Then, 100 mg/kg was established as the optimal dose. B) Long-term experiments. TBI group showed a higher glutamate concentration (2.0 \pm 0.27 μ M, p<0.01 vs SHAM group). In contrast, in the group pre or/and treated with CBD 100 mg/kg, glutamate concentration was 0.73 \pm 0.19 μ M and 1 \pm 0.21 μ M respectively, which was lower than TBI group (p<0.01 and p<0.05). The expression of proinflammatory cytokines was higher in the TBI group TNF- α (86 \pm 27.5 %, p<0.01), IL-1 β (61.2 \pm 16.1 %, p<0.01) e IL-6 (53 \pm 11 %, p<0.05) vs SHAM respectively. The increase in the expression of IL-6 was also observed in the group pre-treated with CBD 100 mg/kg (43.8 \pm 16.9% p<0.05 vs SHAM) but not in the group pre- and post-treated with CBD (p=0.454 vs SHAM). The NS before TBI was 26-27 points in all groups and SHAM and CBD groups maintaining this score all experiment. In contrast, TBI group presented a NS of 11.29 \pm 1.8 (p<0.001 vs SHAM group) on day 2 post-TBI and values gradually augmented and achieved 17.6 \pm 1.1 points at day 28 (p<0.001 vs SHAM group). This long-term recovery was more evident in groups pre or/and treated with CBD (p<0.05 vs TBI). Post-TBI mortality was reduced in all the experimental groups treated with CBD, being more evident with the dose of 100 mg/kg. **Conclusions.** CBD 100 mg/kg reduce long-term consequences induced by TBI. This could represent a possible neuroprotective strategy on the treatment of TBI.

1. Introducción

1.1. Traumatismo Craneoencefálico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es causado por una fuerza de contacto e inercia (golpe, sacudida, herida penetrante o explosión) sobre el cráneo que interrumpe alguna función normal del cerebro y conduce a un deterioro de este (McAllister *et al.*, 2011; CDC, 2013). No existe una clasificación que unifique todas las consecuencias moleculares, celulares, patológicos y clínicos producidos por un TCE (Blennow, 2016). Sin embargo, se han establecido diferentes tipos de clasificaciones por tanto, el TCE se puede clasificar patológicamente en lesión focal o difusa, mecánicamente lesión cerrada o abierta, fisiopatológicamente en lesión primaria y secundaria y clínicamente por su severidad en leve, moderado o severo (Smith, 2011) Respecto a la clasificación clínica, el sistema de puntuación aceptado globalmente es la escala de coma de Glasgow, la cual tiene una alta confiabilidad entre observadores y, en general, buenas capacidades de pronóstico (Teasdale *et al.*, 1974).

1.1.1. Epidemiología

El TCE se considera la principal causa de muerte y discapacidad grave en personas menores de 45 años, representando un problema de salud mundial. Cada año aproximadamente 74 millones de personas sufren algún tipo TCE y en 2014 causó la muerte de 56,800 pacientes en USA (Capizzi *et al.*, 2020, Haarbauer-Krupa *et al.*, 2021).

En México, el TCE severo es la tercera causa de muerte y con mayor incidencia en hombres jóvenes (15 a 45 años) (Ontiveros *et al.*, 2014). Esta mayor incidencia en hombres coincide con un estudio realizado de 2008 a 2013 en 690 pacientes donde el 61% de los pacientes con TCE fueron hombres y la causa de los TCE estuvo relacionado con consumo de alcohol (25%) (Owens *et al.*, 2018). Adicionalmente, aproximadamente el 52% de los pacientes con TCE cursan con alguna discapacidad moderada a severa por lo menos 1 año posterior al insulto inicial y los costos de atención medica rebasan los \$81 millones de dólares en costos directos y \$2300 millones de dólares en costos indirectos de atención médica (Humphreys *et al.*, 2013).

1.1.1.1. Poblaciones de alto riesgo a TCE

Toda la población es susceptible a un evento de TCE de diferente gravedad en algún momento de su vida, sin embargo, ciertas poblaciones son más susceptibles a presentar un evento o más de uno. El TCE se atribuye comúnmente a accidentes viales, sin embargo, las lesiones deportivas o TCE por eventos explosivos en personal militar toma relevancia para establecer poblaciones susceptibles (Hampton 2011). La estimación de la incidencia de TCE en la población deportiva es variable, pero se determinó entre 1,6 y 3,8 millones y representa aproximadamente el 30.3% de los casos de TCE anuales (Theadom *et al.*, 2020; Stern *et al.*, 2011). Entre los deportes que reportan más eventos de TCE anuales destaca el boxeo, el fútbol americano, el hockey profesional, la lucha libre profesional, el rugby y el béisbol. Dependiendo del deporte específico o el nivel de competencia, pueden conferir diferentes grados de riesgo a TCE (Barnes *et al.*, 2018; Stern *et al.*, 2011). Respecto al personal militar, el 59% de las tropas de Irak y Afganistán reportaron haber experimentado algún tipo de TCE durante la guerra principalmente ocasionado por ondas explosivas (Wilk *et al.*, 2012).

Adicionalmente el desarrollo de encefalopatía traumática crónica (ETC) en exjugadores de la Liga Nacional de Fútbol Americano con antecedentes de TCE repetidos puso en evidencia la importancia de los eventos subsecuentes al trauma en el desarrollo de trastornos neurológicos a largo plazo (Omalu *et al.*, 2005). En un estudio de cohorte donde se consideraron 350 000 veteranos de guerra se asoció que el TCE aumentó más del doble el riesgo de diagnóstico de demencia (Barnes *et al.*, 2018). El Ejército de EE. UU. y la Liga Nacional de Fútbol Americano se asociaron para compartir investigaciones y alentar al reconocimiento de eventos de TCE, así como el manejo y la prevención (Peskind *et al.*, 2013). Los mecanismos por los cuales un TCE o varios eventos conducen al deterioro a largo plazo no son claros. Actualmente, aún sigue en discusión si considerar al TCE como el inicio de una enfermedad, por lo tanto, diversos grupos de investigación aún sigue tratando de elucidar la compleja fisiopatología detrás del trauma (Gardner *et al.*, 2015; Mouzon *et al.*, 2018).

1.1.2. Fisiopatología

La fisiopatología de un TCE cambia dependiendo del tipo de trauma, recurrencia y el tiempo. Independiente de la severidad del impacto se han descrito 2 tipos de lesiones. La

primera se produce de manera inmediata y se conoce como lesión primaria. La lesión puede ser focal, difusa o una combinación de ambas y es consecuencia del daño mecánico causado por el desgarro y/o estiramiento de neuronas, axones, glía y vasos sanguíneos (Lozano *et al.*, 2015; Werner y Engelhard., 2007). Derivado de este daño biomecánico se genera lesión axonal difusa, formación de edemas, hemorragias, e isquemia (Loane y Faden, 2010; Ng *et al.*, 2019).

La lesión secundaria es progresiva a la primaria y se asocia con la activación de cascadas bioquímicas que conducen a cambios metabólicos y celulares (Figura 1) (Kabadi y Faden, 2014). Entre los mecanismos subsecuentes a la lesión primaria se encuentra la disfunción mitocondrial, que promueve el aumento de especies reactivas de oxígeno (EROS). El aumento de EROS aumenta la peroxidación de lípidos membranales y por consiguiente daño celular (Chen *et al.*, 2012). También existen fallas en las bombas Na^+/K^+ ATPasa la cuales conduce a un desequilibrio iónico. El fallo en los sistemas compensatorios celulares promueve la sobre activación de caspasas y endonucleasas que en conjunto con los mecanismos previos conducen a una disminución de la energía celular y por consiguiente a incrementar procesos apoptóticos (Diaz-Arrastia *et al.*, 2014; Masel y DeWitt., 2010).

En adición al fallo de homeostasis, el aumento del calcio intracelular favorece la activación de proteasas como la calpaína, la cual promueve la degradación de proteínas del citoesqueleto. El calcio también favorece el aumento de la liberación de neurotransmisores, entre estos últimos el glutamato juega un papel importante en los procesos excitotoxicos y de muerte neuronal subsecuente (Clark *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2018).

1.1.2.1. **Excitotoxicidad**

La neurotransmisión excitatoria está orquestada principalmente por glutamato, en condiciones de homeostasis el glutamato es esencial para la comunicación neuronal, así como en procesos de plasticidad sináptica incluyendo el aprendizaje y la memoria (Armada-Moreira *et al.*, 2020; Meldrum *et al.*, 2000). Sin embargo, después de un TCE, el glutamato tiene un papel importante en los eventos excitotóxicos posteriores al trauma (Figura 2). La excitotoxicidad es la muerte neuronal ocasionada por la sobreactivación de receptores de aminoácidos excitadores, el termino fue propuesto por Olney desde 1969 (Szydłowska *et al.*, 2010; Olney *et al.*, 1969).

El glutamato es sintetizado a partir de la glutamina por la enzima glutaminasa (Figura 1). Posteriormente el glutamato es convertido en glutamina posterior a la recaptura del glutamato por las células astrocíticas para continuar con el ciclo glutamato-glutamina (Cooper *et al.*, 2016). El glutamato también puede ser sintetizado a partir del α -cetoglutarato (Mark *et al.*, 2001). En el cerebro el glutamato se encuentra en una concentración de 10 a 12 mM y se deben de mantener niveles por debajo de $<100 \mu\text{M}$ en el líquido cefalorraquídeo (LRC) para evitar procesos excitotóxicos (Schousboe *et al.*, 2019).

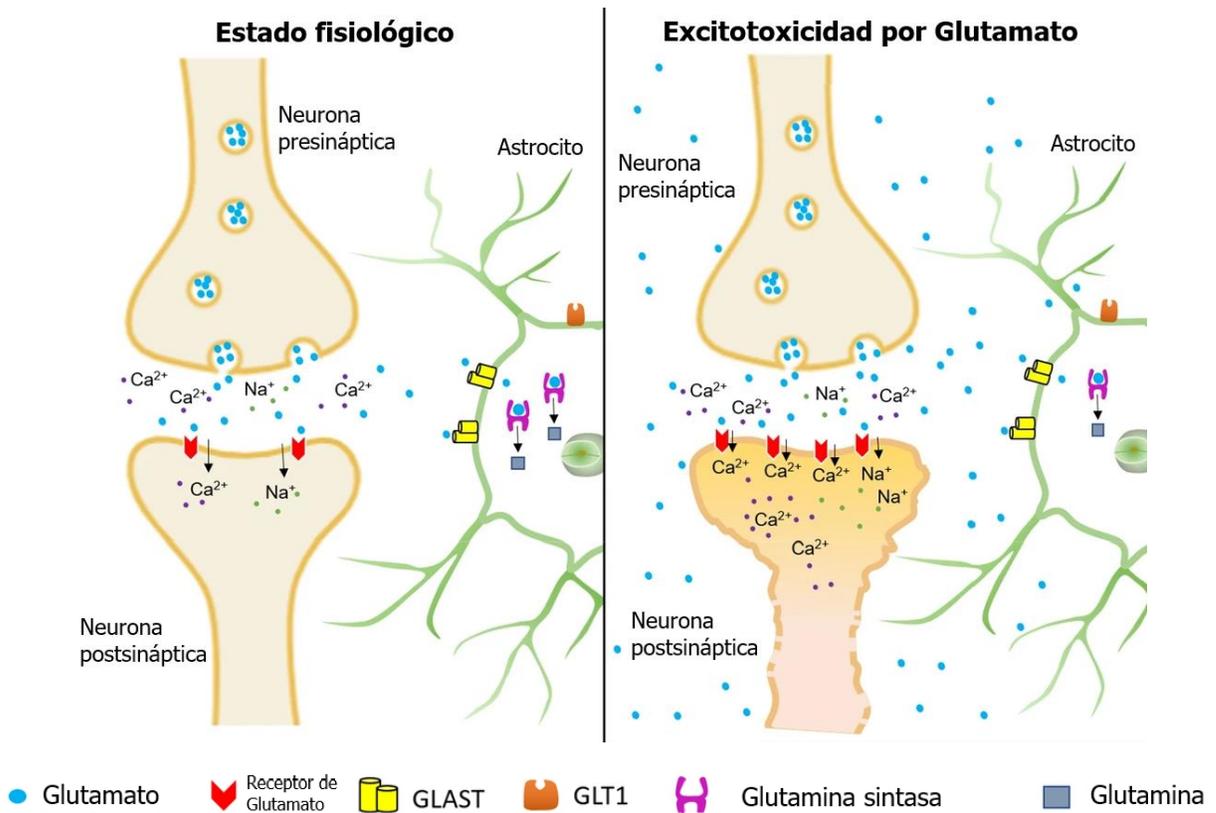


Figura 2. Excitotoxicidad mediada por glutamato (Modificado de Ferreira *et al.*, 2021)

Desde 1989, Faden y colaboradores demostraron un incremento dependiente de la intensidad de la lesión en la liberación de glutamato en hipocampo de ratas sometidas a TCE. (Faden *et al.*, 1989). Este incremento en liberación de glutamato también ha sido observado en corteza cerebral. En esta última, existen reportes de incrementos significativos hasta 5 horas posteriores al trauma (Folkersma *et al.*, 2011; Globus *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1992).

En condiciones de homeostasis, el control glutamatérgico es modulado en gran parte por la recaptura que realizan los transportadores de glutamato en astrocitos principalmente GLT-1 y GLAST. En condiciones de trauma cerebral se ha reportado una disminución de estos transportadores (Van Landeghem *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 1998) lo que puede contribuir a que el glutamato permanezca más tiempo en el espacio sináptico. Este descontrol en la liberación y recaptura de glutamato facilita su interacción con receptores NMDA que favorece la excitotoxicidad y que facilita la entrada masiva de calcio a las neuronas promoviendo la muerte neuronal (Choi *et al.*, 1996; Zipfel *et al.*, 2000). Por otra parte, la microglía tiene receptores a glutamato favoreciendo la liberación de mediadores inflamatorios. Estos mediadores incrementan procesos de neuroinflamación cerebral postraumática (Gallo *et al.*, 2000; Kelley *et al.*, 2007; Ziebell *et al.*, 2010).

1.1.2.2. Neuroinflamación

El papel de la respuesta inflamatoria post-TCE es compleja. La inflamación es benéfica para limpiar los desechos celulares después de la lesión y desencadenar señales de regeneración. Sin embargo, la activación prolongada de la microglía, astrocitos junto con la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) (Figura 3), incrementan el daño neuronal mediante la facilitación de la liberación de moléculas de mediadores inflamatorios y de moléculas neurotóxicas como óxido nítrico y glutamato (Byrnes y Faden, 2007; Kabadi y Faden, 2014; Maas *et al.*, 2008).

La BHE está formada por células endoteliales unidas por proteínas de unión las cuales posterior a un TCE se rompen y permiten la extravasación de mediadores inflamatorios, albúmina y fibrinógeno al parénquima cerebral y la activación subsecuente de la microglía residente. Adicionalmente, existe un incremento de moléculas de adhesión en el endotelio que facilita la permeabilidad de células proinflamatorias de la circulación sanguínea hacia el sitio de lesión (Chodobski *et al.*, 2011). Después de un TCE existe una disminución de proteínas de unión como ocludina, ZO-1 y claudina-5 así como un aumento de transportadores como AQP-4 que favorece la formación de edema (Blixt *et al.*, 2015).

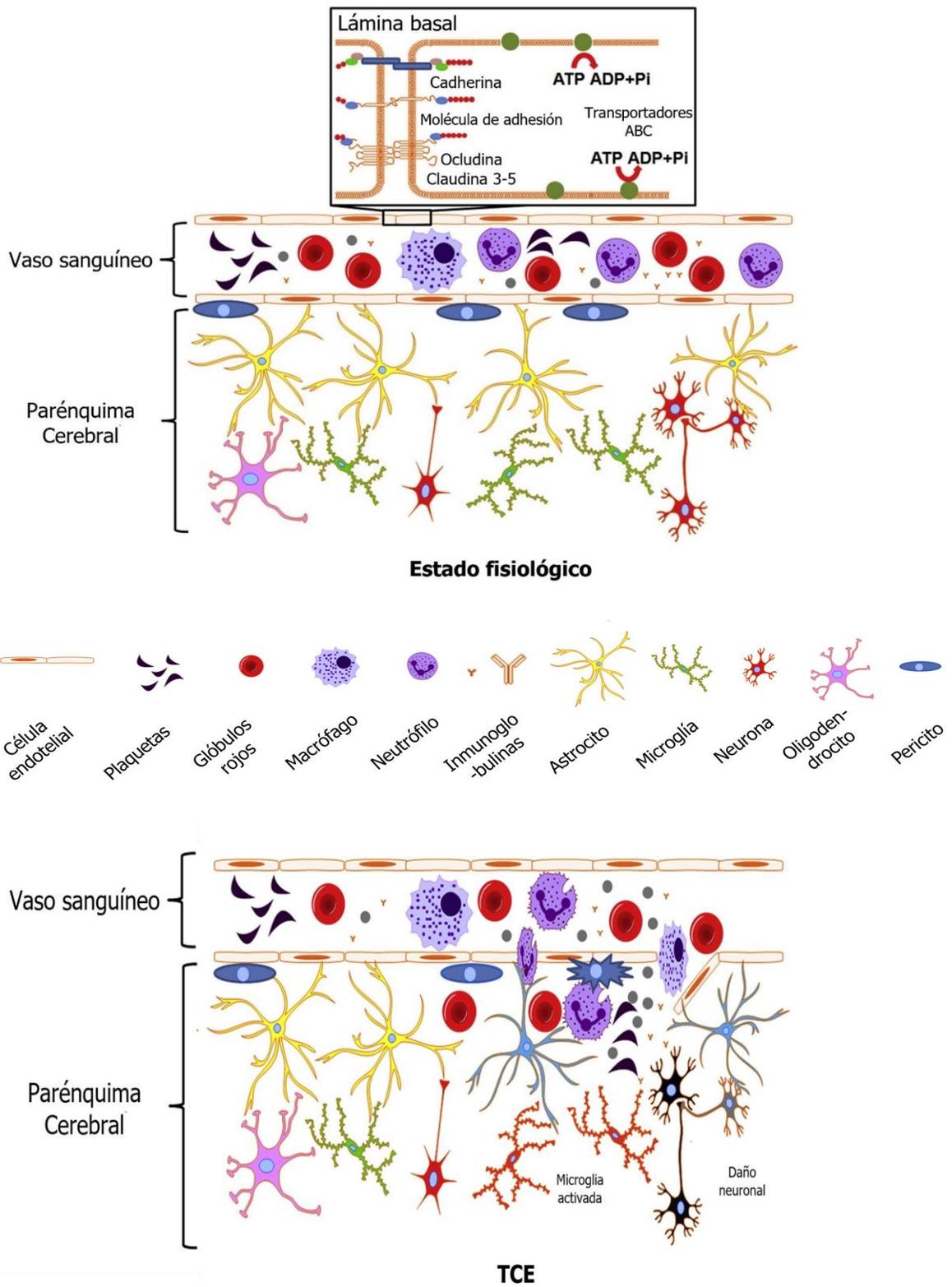


Figura 3. Daño en la BHE posterior a un TCE (Modificado de Thal *et al.*, 2014)

Por otra parte, se describió un aumento de citocinas proinflamatorias posterior al TCE. Estudios de microdiálisis en pacientes detectaron un incremento en citocinas como IL- β e IL-6 durante las primeras 5 horas posteriores al trauma (Folkersma *et al.*, 2008). En modelos animales la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10) aumenta en las estructuras lesionadas, sin embargo, aún se debate si la microglía se polariza a macrófagos del tipo M1 o M2 (Morganti-Kossmann *et al.*, 2019). Estos cambios se detectaron tempranamente 1 hr después de la lesión con picos variables hasta 24 h post-TCE (Fan *et al.*, 1996; Magid *et al.*, 2019). Las citocinas proinflamatorias facilitan la progresión a un estado inflamatorio crónico mediante el aumento de la permeabilidad de la BHE y su capacidad para inducir la síntesis de quimiocinas (Chodobski *et al.*, 2011).

Por otra parte, el perfil transcripcional y proteómico de la microglía y astrocítica se modifica posterior al TCE y está presente de forma aguda (Bye *et al.*, 2006; Folkersma *et al.*, 2011) e inclusive de forma crónica 17 años posterior al trauma (Ramlackhansingh *et al.*, 2011). Los procesos involucrados en la preservación de la neuroinflamación crónica son indeterminados, sin embargo, se sugiere que existe un fenotipo microglial “pre-activado” subsecuente al TCE, que permanece de forma latente y responde de manera exacerbada a cualquier reto inmunológico. En ratones sometidos a TCE, se determinó que la depleción de la microglía con una posterior renovación forzada atenuaba en gran medida los procesos inflamatorios subsecuentes (Bray *et al.*, 2022).

La neuroinflamación en conjunto con la excitotoxicidad favorecen los procesos de muerte neuronal (Smith *et al.*, 1997) e hiperexcitabilidad cerebral (Santhakumar *et al.*, 2001) los cuales pueden influir en el daño de estructuras corticales y subcorticales que participan en los déficits funcionales y en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos postraumáticos a largo plazo (Casaul *et al.*, 2019; Mrak *et al.*, 2001; Najjar *et al.*, 2011).

1.1.3. Estructuras cerebrales dañadas post-TCE y su relación funcional

Se debe entender a la lesión subsecuente al TCE como un evento de constantes cambios en las estructuras cerebrales que llevan al desarrollo de consecuencias a largo plazo. En pacientes con TCE se reportó atrofia en áreas como: tálamo, ganglios basales, cuerpo caloso, hipocampo y corteza, así como daño en las redes neuronales en corteza parietal, lateral y medial que puede influir en un mal funcionamiento de estructuras subcorticales. Respecto a

la atrofia aún no está claro si la lesión refleja un daño estructural y/o funcional permanente (Gordon *et al.*, 2018; Kaplan *et al.*, 2017; Peskind *et al.*, 2011). Sin embargo, se estableció que el déficit neuropsicológico post-TCE puede tener relación con el daño en la materia blanca y en la red neuronal, así como la capacidad de esas redes para readaptarse (Hayes *et al.*, 2016).

El daño en la comunicación entre estructuras corticales a subcorticales se da principalmente por lesión axonal difusa por lo que establecer la localización o distribución del daño es complejo, por lo tanto, el desarrollo de imágenes de tensor de difusión proporciona un método cuantitativo para evaluar la estructura de la materia blanca in vivo utilizadas como indicador de su integridad (Jolly *et al.*, 2021). En ese sentido, se analizaron 28 pacientes mediante mapas de difusividad para medir la integridad de la materia blanca encontrando anomalías generalizadas de la sustancia blanca post-TCE. Este daño difuso se relacionó con perfiles de déficits cognitivos y de memoria (Kinnunen *et al.*, 2011).

En animales sometidos a una lesión por percusión de fluidos se estudió por mapeo de alta definición la morfometría hipocampal posterior al TCE. En este estudio se encontró una disminución del volumen hipocampal 6 meses post-TCE, con cambios en la morfometría detectados desde la primera semana. Estos cambios morfológicos no fueron suficientes para predecir el desarrollo de epilepsia postraumática, la cual se desarrolla post-TCE en aproximadamente el 30 % de los pacientes (Shultz *et al.*, 2013).

Por otra parte, los pacientes con TCE presentan déficits motores persistentes lo cual puede estar asociado con daño en estructuras involucradas en el movimiento como corteza premotora, motora, tálamo, cuerpo calloso y cerebelo y a afectaciones en las proyecciones motoras-estriatales y hacia las neuronas motoras de la médula espinal (Hayes *et al.*, 2016; Shumskaya *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2005). Por otra parte, la pérdida de células neuronales en subregiones del hipocampo también se correlacionó con disfunción sensoriomotora y déficits cognitivos (Zhao *et al.*, 2012). En animales, el daño sensoriomotor se reportó hasta 12 semanas post-TCE (Webster *et al.*, 2015) y en pacientes se reportan déficits motores 3 años post-TCE (Keren *et al.*, 2001).

La relación entre las múltiples estructuras cerebrales dañadas posterior al TCE son consistentes con la hipótesis de que la disfunción, muerte neuronal, atrofia e

hiperexcitabilidad cerebral pueden explicar la patogénesis de consecuencias a largo plazo. Como ejemplo de las consecuencias tardías destacan, el deterioro en aprendizaje y memoria, desarrollo de enfermedades como Alzheimer, Parkinson y epilepsia post-traumática (EPT) así como trastornos del estado del ánimo (Golarai *et al.*, 2001; Lowenstein *et al.*, 1992). Debido a las diversas secuelas cognitivas y neuroconductuales post-TCE, así como a los factores personales del propio paciente, ha sido difícil explicar adecuadamente los mecanismos que contribuyen en la fisiopatología (Kreutzer *et al.*, 2001; Jorge *et al.*, 2004; Rosenthal *et al.*, 1998). A pesar de las diversas investigaciones que proponen al TCE como un proceso dinámico sin punto final, los objetivos terapéuticos se siguen enfocando en la lesión primaria dejando a un lado la prevención de consecuencias postraumáticas a largo plazo.

1.2. Tratamiento clínico para las consecuencias inducidas por el TCE

El tratamiento actual en la etapa aguda para los pacientes con TCE, depende en gran medida de la evaluación neurológica inicial en donde la escala de coma de Glasgow representa un examen neurológico importante para las medidas terapéuticas a tomar. Lo primordial es mantener la presión intracraneal y las variables hemodinámicas estables. Inicialmente se maneja el monitoreo de la presión intracraneal, procesos de hiperventilación, profilaxis de convulsiones, terapia hiperosmolar, enfriamiento terapéutico, inducción de coma, así como intervenciones quirúrgicas como craneotomías (Galvano *et al.*, 2017).

Entre los fármacos anestésicos utilizados para el control de las vías aéreas se encuentra el propofol, el tiopental y etomidato. La sedación y la relajación muscular tienden a reducir el requerimiento de oxígeno metabólico cerebral. Para el manejo de la hipovolemia se administra solución salina o solución de lactato Ringer mientras que para el manejo osmótico la solución con manitol es la primera elección. Por otro lado, el manejo profiláctico de convulsiones se realiza administrando anticonvulsivantes como fenitoína y levetiracetam. Entre otros fármacos se utilizan los que ayuden a la tolerancia alimentaria o a la nutrición enteral, así como la prevención de infecciones en el sitio de lesión mediante el uso de antibióticos (Dash *et al.*, 2018)

Sin embargo, para delimitar el alcance de la lesión secundaria, se necesitan agentes terapéuticos neuroprotectores eficientes que controlen la inflamación, apoptosis y la

excitotoxicidad neuronal (Thapa, 2021). Actualmente ningún fármaco en fase de investigación III ha probado ser neuroprotector para las consecuencias post-TCE (Watzlawick *et al.*, 2016). En el desarrollo de nuevas moléculas se invierte aproximadamente 350 millones de dólares y más de 10 años de investigación, con tan solo un 5% de probabilidad de que el fármaco alcance la comercialización global (Löscher *et al.*, 2013). Esto representa un problema en países con economía emergente, ya que no existe inversión en el descubrimiento de nuevas moléculas (KPMG 2017). Ensayos en modelos animales post-TCE han permitido avanzar en el descubrimiento de nuevas moléculas multiblancos que tienen efectos en la inflamación, hipoxia, neurogénesis e hiperexcitabilidad post-TCE (Xiong., *et al.*, 2009). Un ejemplo de ellos es el cannabidiol (CBD) que demostró efectos neuroprotectores en un modelo de hipoxia-isquemia (Barata *et al.*, 2019).

1.3. Cannabidiol

El CBD es uno de los fitocannabinoides más estudiados obtenido de la planta *cannabis sativa*. El CBD no tiene efectos psicoactivos detectables en comparación con el delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC). Respecto a la estructura molecular del CBD se compone por un anillo de resorcinol, un resto de monoterpeno y una cadena lateral de alquilo. El CBD se biosintetiza como ácido cannabidólico (CBD-A) a partir de un precursor común del ácido cannabigerólico (CBG) (Figura 4) (Cushing *et al.*, 2018; Maroon *et al.*, 2018; Taura *et al.*, 2007).

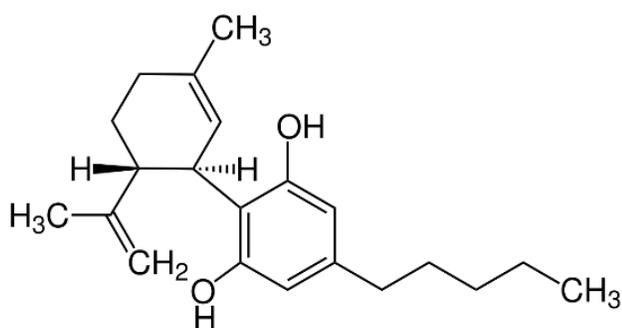


Figura 4. Estructura molecular del cannabidiol

1.3.1.1. Farmacocinética

La biodisponibilidad del CBD depende de la vía de administración y de la dosis. La biodisponibilidad después de la administración inhalado oscila entre el 13-39% mientras que

administrado por vía oral se encuentra entre 5-19% y este puede aumentar si se da en concomitancia con la dieta (Taylor *et al.*, 2018). En sujetos sanos después de la administración oral de 30 mg/kg de CBD, este se detectó en sangre 15 min posteriores a la administración, con una C_{max} de 2,82 ng/ml. En este estudio no se observaron cambios significativos en la frecuencia cardíaca y la presión del pulso después de la administración de CBD (Hobbs *et al.*, 2020). La vida media del CBD evaluado en perros (2 mg/kg, v.o) fue de 5 horas aproximadamente y no se observaron efectos secundarios aparentes (Gamble *et al.*, 2018). Sin embargo, la vida media está influenciada por el número de administraciones ya que el CBD administrado de forma crónica tiene una vida media de 2 a 5 días (Consroe *et al.*, 1991). El CBD sufre metabolismo de primer paso, los metabolitos principales que resultan son 6-OH-CBD, 7-OH-CBD y CBD-COOH, estos se excretan intactos o como conjugados de glucurónido principalmente de forma renal (Abbotts *et al.*, 2022; Millar *et al.*, 2018). Este metabolismo está principalmente modulado por la familia de enzimas del CYP 450: CYP1A1; CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5 las diferencias interindividuales en la expresión y función de estas enzimas podría ser relevante en la acción terapéutica, interacciones con otros fármacos y en los posibles efectos adversos del CBD (Ujváry *et al.*, 2016).

Algunos cannabinoides pueden alterarse por el ácido estomacal y por la microbiota intestinal, lo que da como resultado niveles plasmáticos bajos del compuesto intacto. Respecto a esto, en un modelo murino de esclerosis múltiple se observó que el CBD no modificó la microbiota intestinal cuando se administró a una dosis de 20 mg/kg, sin embargo se encontró menor inflamación en el tracto gastrointestinal posterior a la administración. Más estudios son necesarios para elucidar el papel del CBD sobre estos sistemas (Dopkins *et al.*, 2021).

1.3.1.2. Mecanismo de acción y efectos

Los mecanismos por los que el CBD ejerce sus efectos no han sido elucidados por completo. Se sabe que el CBD tiene múltiples blancos farmacológicos (Rong *et al.*, 2017). Entre estos blancos se encuentra una baja afinidad por receptores CB₁ y CB₂ donde actúa como agonista y agonista inverso respectivamente (Thomas *et al.*, 2007), adicionalmente, el CBD actúa indirectamente sobre el sistema endocannabinoide (Bornheim *et al.*, 1993; Massi

et al., 2008). Otros blancos con los que el CBD demostró interacción es el receptor GPR55 (Ryberg *et al.*, 2007), PPAR γ (O'Sullivan *et al.*, 2009) así como una interacción con el receptor 5HT $_{1A}$ (Magen *et al.*, 2010; Pazos *et al.*, 2013).

Actualmente el estudio del CBD tomó relevancia clínica por su efecto neuroprotector en diversas patologías, así como por su baja toxicidad y alta tolerabilidad (Cunha *et al.*, 1980; Pisanti *et al.*, 2017). Ejemplo de estos últimos son sus efectos antiinflamatorios (Costa *et al.*, 2004; De Filippis *et al.*, 2011; Vuolo *et al.*, 2019), antioxidantes (Cassol-Jr *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016; Hampson *et al.*, 1998; Iuvone *et al.*, 2004), facilitación de neurogénesis hipocampal (Esposito *et al.*, 2011; Fogaça *et al.*, 2018), disminución de la hiperexcitabilidad (Jones *et al.*, 2012) y como antiexcitotóxico (Castillo *et al.*, 2010; Gobira *et al.*, 2015; Hampson *et al.*, 1998; El-Remessy *et al.*, 2003). A pesar de la evidencia neuroprotectora del CBD que lo identifica como una molécula de interés, aun no existen estudios que lo aborden en las consecuencias secundarias de un TCE.

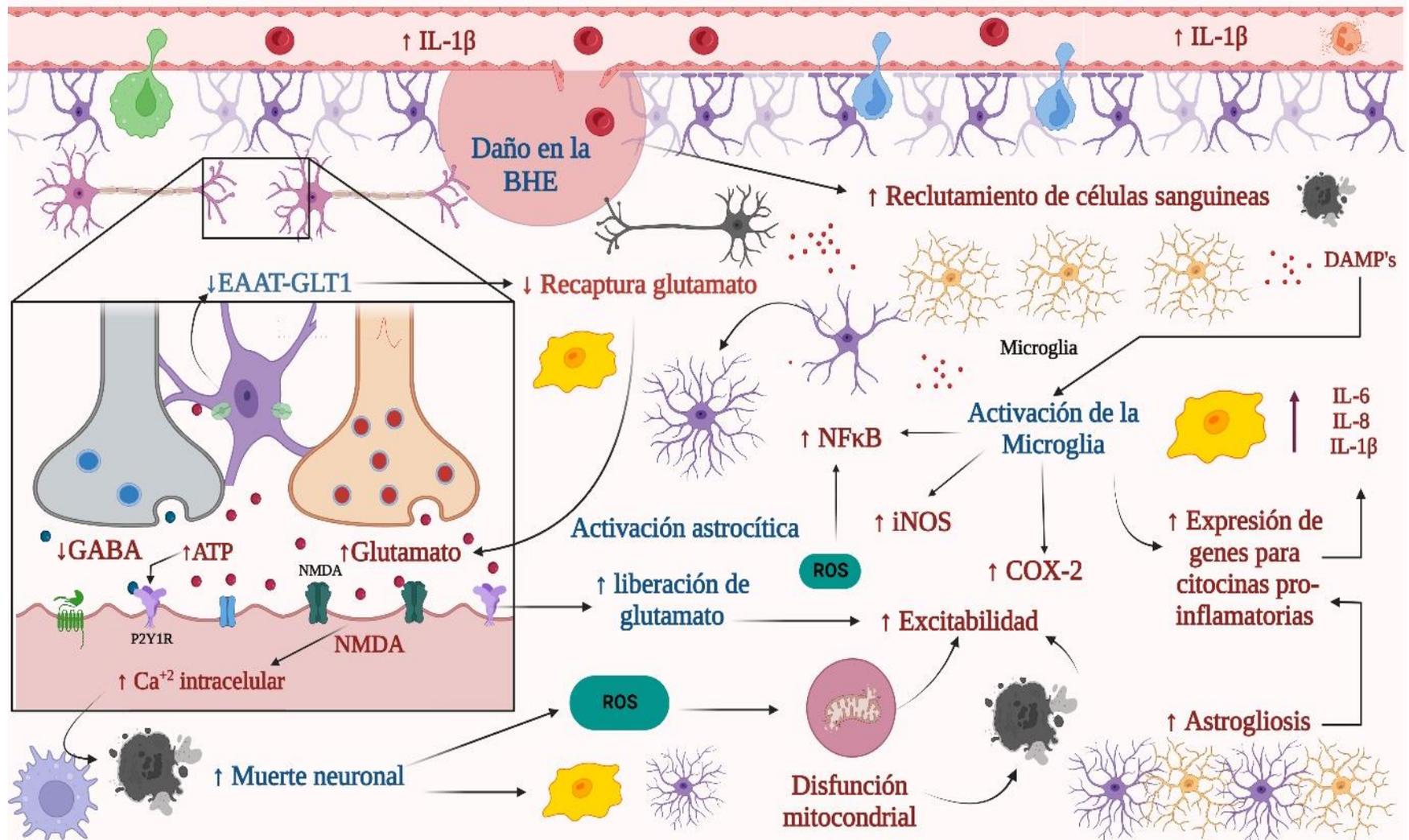


Figura 1. Fisiopatología de un TCE. El TCE induce un daño en la BHE que permite la infiltración de células de la circulación sanguínea hacia el parénquima cerebral. Esta infiltración se acompaña con la activación astrocítica y microglial que facilita el incremento de mediadores inflamatorios. Por otra parte, existe un incremento de la liberación de glutamato, así como una disminución de su recaptura. El aumento de glutamato favorece procesos excitotóxicos con aumento de calcio intracelular que facilita los procesos de muerte neuronal. La muerte neuronal subsecuente al TCE incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disfunción mitocondrial que preserva los procesos inflamatorios.

2. Justificación

Después de un TCE severo existe una liberación excesiva de glutamato y de citocinas proinflamatorias. Estos eventos contribuyen a exacerbar procesos de excitotoxicidad, inflamación y muerte neuronal, los cuales favorecen la neurodegeneración e hiperexcitabilidad post-TCE en diversas áreas cerebrales. Las alteraciones cerebrales que resultan de un TCE se relacionan con déficits motores, cognitivos y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas a largo plazo.

A pesar de la búsqueda de nuevos tratamientos terapéuticos, ninguno evita las consecuencias del TCE. Por otra parte, el CBD reduce la neurotransmisión glutamatérgica y la subsecuente excitotoxicidad, inflamación, estrés oxidativo y la muerte neuronal en diferentes modelos animales a través de su interacción con diversos blancos terapéuticos. Las evidencias protectoras del CBD se presentan tanto a corto y largo plazo, sin la presencia aparente de efectos adversos. Por lo anterior, la administración de CBD se posiciona como una estrategia terapéutica para inducir efectos neuroprotectores en las consecuencias subsecuentes al TCE.

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

En animales con TCE severo, el tratamiento oral con CBD evitará el incremento de la concentración extracelular de glutamato y de citocinas pro-inflamatorias, a corto y largo plazo.

3.2. Objetivos

3.2.1. General

Evaluar a corto y largo plazo, el efecto del tratamiento oral con CBD en la concentración extracelular de glutamato y de citocinas pro-inflamatorias en animales con TCE severo

3.2.2. Específicos

En ratas sometidas a TCE severo:

- Identificar la dosis óptima de CBD oral que, como pre-tratamiento, evite el incremento agudo en la concentración extracelular de glutamato y citocinas pro-inflamatorias en la corteza cerebral.
- Analizar a largo plazo el efecto del pre- y post-tratamiento oral con una dosis óptima de CBD en la concentración extracelular de glutamato, la expresión de citocinas pro-inflamatorias y consecuencias funcionales.

4. Metodología experimental

4.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre 250-300 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparente bajo condiciones ambientales controladas (ciclos de luz/oscuridad 12 h, 22-25 °C), con acceso a alimento y agua *ad libitum*. El protocolo experimental se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y los Comités de Ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (protocolo CICUAL 0326-22).

4.2. Inducción de TCE

4.2.1. Craneotomía

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilacina (17 mg/kg, i.m.). Posteriormente se montaron sobre el marco estereotáxico y se procedió a realizar una incisión sagital de 1.5 cm en la línea media entre las orejas extendiéndose hacia la nariz. Con la ayuda de un hisopo de algodón se eliminó el periostio que recubre el cráneo. Se realizó un trépano de 5 mm de diámetro lateral a la línea media (5 mm de lambda y bregma y 4.0 mm de la sutura sagital). Se confirmó que la duramadre estuviera intacta, se utilizó pegamento tisular Vetbond para fijar un “*luer-lock*” hembra al diámetro del trépano y se rellenó con solución salina para verificar la ausencia de fugas entre el sello *luer* y el cráneo. Se colocó 1 tornillo de acero inoxidable en la parte lateral anterior a bregma para dar soporte a un casco de acrílico dental colocado temporalmente. La inducción del TCE se realizó 90 minutos posteriores al inicio de la anestesia (McIntosh, *et al.*, 1989).

4.2.2. Lesión lateral por percusión de fluidos (LLPF)

El fundamento de LLPF se basa en un pulso de presión aplicado al cerebro a través de la duramadre intacta (Rostami, 2016). El equipo de LLPF modelo FP302 (Figura 5) está compuesto por un cilíndrico de Plexiglás relleno de solución salina estéril con un extremo terminal unido a un transductor que se conecta al “*luer lock*” del casco de acrílico dental. La lesión se generó por medio de un péndulo que golpeó el pistón del cilindro y que generó un pulso de presión. Este último viajó a través del transductor hasta el cráneo del animal. Se

consideró que los animales recibieron una lesión severa si el pulso de presión entró en el rango de 2.6 a 3.3 atm (McIntosh *et al.*, 1989). Después de la inducción del TCE los animales se dejaron en observación en camas térmicas hasta su recuperación.

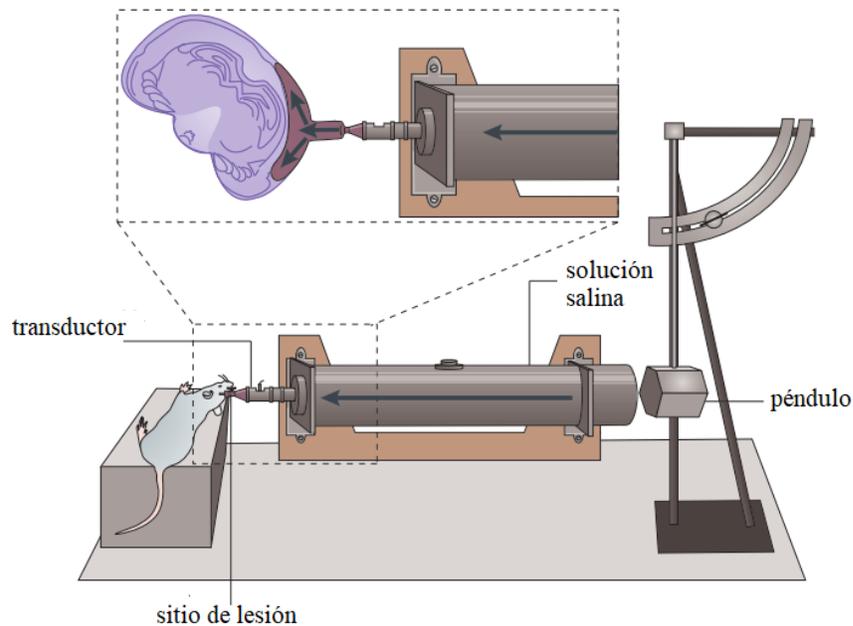


Figura 5. Modelo de LLFP (Modificado de Xiong *et al.*, 2013)

4.3. Grupos experimentales

4.3.1. Experimento I

4.3.1.1. Grupo CBD200-TCE (n=11)

Se utilizaron ratas a las cuales se les realizó una craneotomía (implantación de luer-lock y cánula guía para microdiálisis). Posterior a esto, los animales se dejaron recuperar durante 7 días sin ninguna manipulación adicional. Concluido este tiempo, se comenzó con la administración de CBD 200 mg/kg, v.o. diluido en aceite de coco. Esta administración se repitió cada 24 h durante 7 días. Al día 14 posterior a la cirugía de implante se colocó la sonda para el experimento de microdiálisis. Para lo anterior, se realizó una estabilización del sistema durante 2 horas y posteriormente se comenzó la recolección de los dializados basales (cada 30 minutos) durante 2 horas. Al término de este tiempo se realizó la inducción de TCE severo utilizando el modelo de LLFP. Posterior a la inducción del trauma, se continuó con el

experimento de microdiálisis durante 5 horas más. Cinco días posteriores a los experimentos de TCE/microdiálisis se sacrificaron a los animales y sus cerebros fueron obtenidos y preservados para análisis histológicos (Figura 6). De manera paralela se realizaron grupos independientes ($n=4$) para el análisis por Western blot (WB) de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Estos grupos se manejaron similar a lo descrito anteriormente con la diferencia de que no se realizó el experimento de microdiálisis y estos animales se sacrificaron 24 horas post-TCE y los cerebros se congelaron a -70°C hasta el análisis por Western blot. Se evaluó la actividad sensoriomotora (*neuroscore*), el peso corporal de los animales (24 horas previas a la inducción del TCE (basal) y al día 2 post-TCE), así como la mortalidad desde la inducción del TCE y hasta 5 días posteriores a este.

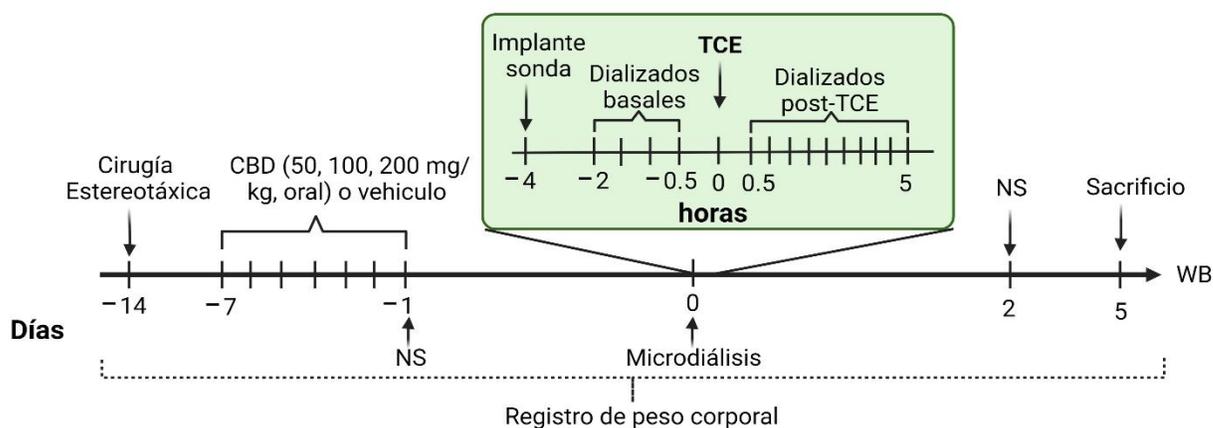


Figura 6. Diseño experimental del experimento I (Imagen creada con Biorender.com)

4.3.1.2. Grupo CBD100-TCE ($n=9$)

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección anterior con la diferencia de que se administró CBD a una dosis de 100 mg/kg v.o.

4.3.1.3. Grupo CBD50-TCE ($n=9$)

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección anterior con la diferencia de que se administró CBD a una dosis de 50 mg/kg v.o.

4.3.1.4. *Grupo TCE (n=14)*

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección anterior con la diferencia de que solo se administró el vehículo del CBD: aceite de coco (ACC) 5 ml/kg v.o.

4.3.1.5. *Grupo SHAM (n=7)*

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en el grupo TCE con la diferencia de que no se realizó inducción del trauma.

4.3.2. **Experimento II**

4.3.2.1. *Grupo CBD-TCE-CBD (n=10)*

Se utilizaron ratas a las cuales se les administró la dosis óptima de CBD v.o. identificada del experimento I. El CBD se administró cada 24 h durante 7 días (Figura 7). Al día 8, las ratas fueron anestesiadas con ketamina 80 mg/kg ip y xilacina 17 mg/kg im y se realizó una craneotomía (ver sección 4.2.1), y 90 min posteriores a la anestesia se realizó la inducción de un TCE severo. Después de la inducción del TCE, se retiró el casco de acrílico y la piel de la cabeza de los animales fue suturada y se mantuvieron en observación durante 3 horas. Posteriormente, las ratas recibieron la administración de la dosis óptima de CBD v.o. durante 7 días más después del TCE. Al día 23 post-TCE, los animales se anestesiaron con el esquema previamente descrito y se realizó el implante de una cánula guía (3 mm cercana a la craneotomía) a nivel de corteza cerebral (ver sección 4.5.1). Siete días posterior al implante de la cánula se realizó durante 3 horas el experimento de microdiálisis para la evaluación de las concentraciones de glutamato extracelular (ver sección 4.5.2). Cinco días posteriores al experimento de microdiálisis se sacrificaron a los animales y se recuperó el tejido cerebral el cual se congeló a -70° C y posteriormente se utilizó para análisis por Western-blot de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α). Se realizó evaluación de la actividad sensoriomotora (*neuroscore*) así como un registro del peso a las 24 horas previas a la inducción del trauma (basal) y al día 2, 7, 14, 21 y 28 post-TCE.

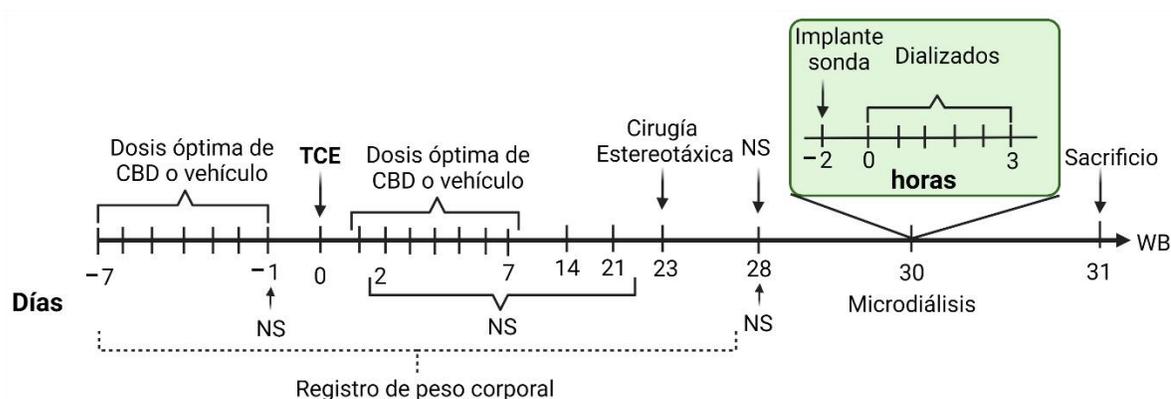


Figura 7. Diseño experimental del experimento II (Imagen creada con Biorender.com)

4.3.2.2. Grupo CBD-TCE ($n=9$)

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección anterior con la diferencia de que se continuó con la administración de CBD durante 7 días más posterior al TCE.

4.3.2.3. Grupo TCE ($n=11$)

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección anterior con la diferencia que solo se administró ACC 5 ml/kg vía oral.

4.3.2.4. Grupo SHAM ($n=8$)

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en el grupo CBD-TCE con la diferencia que solo se administró ACC 5 ml/kg vía oral y no se realizó inducción del TCE.

4.3.2.5. Grupo CBD ($n=7$)

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en el grupo CBD-TCE con la diferencia que no se realizó inducción del TCE.

4.4. Neuroscore

Para evaluar la función sensoriomotora se utilizó la prueba compuesta *Neuroscore* (NS). La prueba consiste en cuatro pruebas: prueba de extensión de extremidades anteriores (izquierda y derecha por separado), prueba de extensión de extremidades posteriores (izquierda y derecha por separado), pulsión lateral y plano inclinado. El máximo puntaje que se puede obtener en el NS es de 28 puntos.

4.4.1. Prueba de contraflexión

La prueba de contraflexión consistió en sujetar al animal en la parte media de la cola y elevarlo 10 cm con respecto a la base de una superficie plana. Posteriormente se acercó de forma lenta, suave y uniforme al animal hacia la superficie para inducir un reflejo de paracaídas (extensión rápida de las extremidades anteriores). Para calificar esta prueba cada extremidad recibió un puntaje de 0 a 4 puntos. Se dio “0” puntos si no existió respuesta (la nariz del animal toca el tapete) y si se observó pérdida del tono muscular de la extremidad anterior. Se dio “1” punto si existió alguna respuesta, si el brazo se extendió de forma perpendicular al plano del cuerpo del animal cuando estuvo suspendido y si la extremidad mostró espasticidad en flexión o extensión. La extremidad recibió “2” puntos si se presentaron espasmos y si se extendió a 45° respecto al plano corporal del animal. Se calificó con “3” puntos si la extremidad se extendió por completo hacia enfrente, pero la respuesta careció de fuerza y fluidez. Además, se observó el tiempo de respuesta (si fue mayor a 5 segundos en responder) se consideró una respuesta no instantánea. En caso de respuesta instantáneas, se otorgó “4” puntos si la extremidad se extendió hacia el tapete en un movimiento fluido y suave formando un espacio entre las extremidades al extenderse. Se observaron la respuesta de las extremidades anteriores conforme se repitió tres veces la prueba (Figura 8).

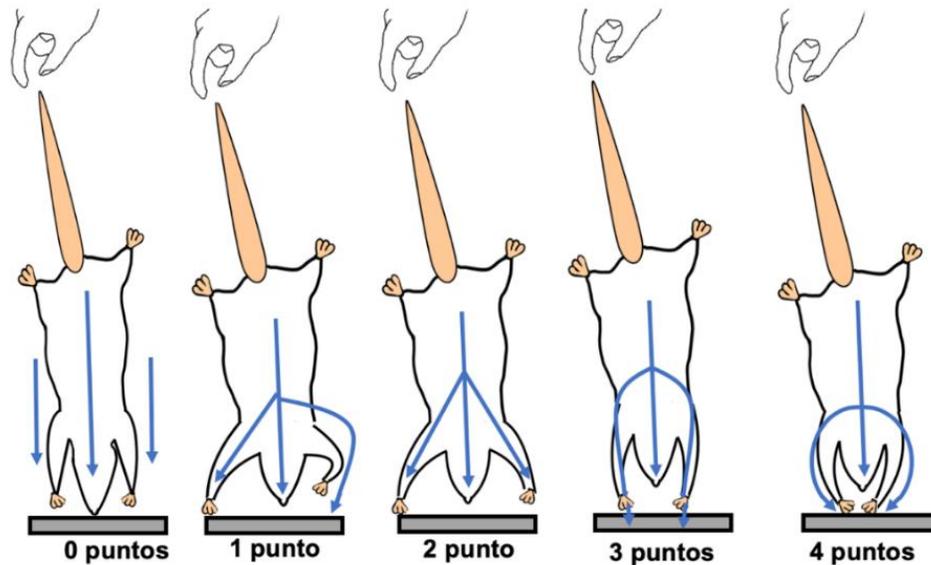


Figura 8. Prueba de contraflexión. (Figura tomada de la tesis de Segovia-Oropeza, 2018).

4.4.2. Prueba de extensión de extremidades posteriores

Los ojos del animal se taparon con una mano mientras se realiza la prueba. Se jaló al animal por la cola, en un movimiento suave y rápido hacia atrás. Se observó la extensión cuando se levantó al animal para iniciar el movimiento. Se calificó con “0” puntos si no existió respuesta y si la extremidad posterior presentó espasticidad en flexión. Se calificó con “1” punto si la extremidad se volteó hacia atrás, con la palma hacia arriba, pero no se presentó extensión. Se dio “2” puntos si la extremidad no se extendió por completo y si en su lugar se formó una curva hacia la cola. Además, si la palma permaneció hacia arriba y si el movimiento careció de fuerza. El puntaje fue de “3” si la extremidad posterior se extendió por completo en un movimiento no instantáneo (>5 segundos en responder). Además, si la palma se movió hacia arriba, pero los dedos no se separaron. Finalmente se calificó con “4” puntos si la extensión hacia atrás fue completa e instantánea, si la palma se movió hacia arriba manteniendo los dedos se separados por completo (Figura 9).

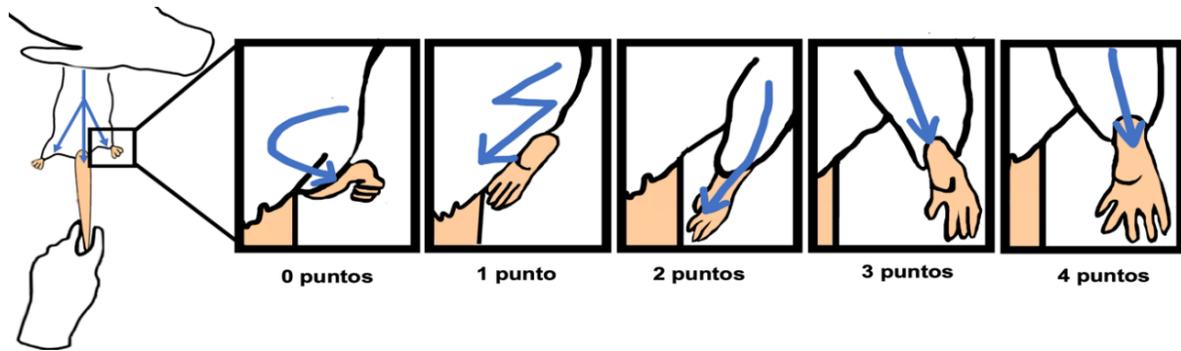


Figura 9. Prueba de extensión de extremidades posteriores. (Figura tomada de la tesis de Segovia-Oropeza, 2018).

4.4.3. Pulsión lateral

Se empujó suavemente al animal de su parte lateral a lo largo de un tapete ranurado con el fin de probar su fuerza y resistencia. El animal se colocó longitudinalmente viendo en contra al observador. Se empujó al animal hacia la izquierda primero y luego a la derecha. Después se intentó voltearlo, en los mismos sentidos. Se dio un puntaje de “0” si el animal no ofreció resistencia, se dio la vuelta y no recuperó su posición, un puntaje de “1” si el animal ofreció un mínimo de resistencia antes de rodarse o si a pesar de rodarse recuperó su posición lentamente por sí mismo. Si la rata no se dio vuelta y ofreció poca resistencia se otorgó “2” puntos. Se dio “3” puntos si ofreció resistencia, pero el observador aun así pudo empujarlo a través del tapete (no gira sobre sí mismo). Finalmente, si el animal ofreció resistencia, se agarró fuerte del tapete y movió coordinadamente sus extremidades cuando fue empujado a través del tapete, se otorgó una puntuación de “4” (Figura 10).

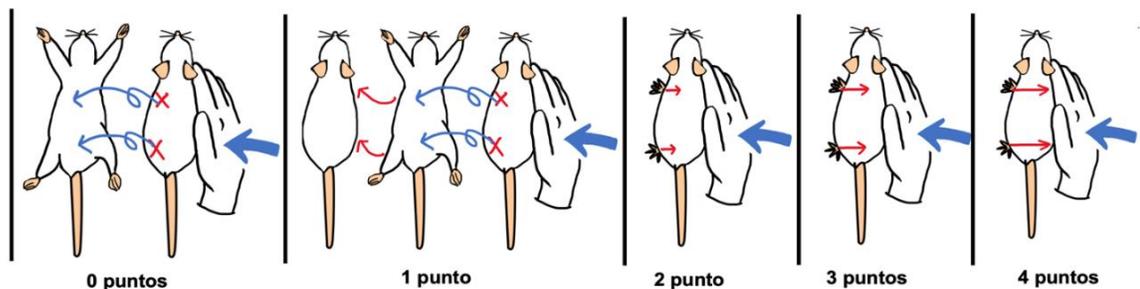


Figura 10. Pulsión Lateral (Figura tomada de la tesis de Segovia-Oropeza, 2018).

4.4.4. Plano inclinado

Se utilizó un tapete ranurado en un tablero inclinado. Para obtener la primera línea base se colocó a 40° el plano inclinado y se fue agregando 2.5° hasta que el animal ya no se logró mantener en el tablero. Se tomó el mayor grado al que el animal se sostuvo durante 5 segundos, en cada una de las posiciones (vertical, lateral izquierda y derecha). Para animales que estén lesionados se colocó a 10° menos de su línea basal. Para considerar aprobada la prueba, el animal se sostuvo quieto durante 5 segundos (sin sostenerse de la cola) en cada uno de los grados del plano. Se realizó tres intentos para cada animal en cada dirección antes de incrementar el ángulo. Se tomó únicamente el ángulo máximo obtenido. El puntaje final se otorgó por cada posición, dependiendo el grado obtenido en cada medición subsiguiente respecto al grado basal. Si el animal obtuvo el mismo grado que en su basal se dio “4” puntos, “3” si disminuyó 2.5°, “2” si disminuyó 5°, “1” si disminuyó 7.5° y “0” si su resistencia disminuyó 10° grados o más. Se presenta un ejemplo de cómo calificar esta prueba en la Figura 11.

Tabla 1. Plano inclinado

Ejemplo ilustrativo de la comparación entre el ángulo basal y las evaluaciones posteriores para el análisis de puntos de la prueba de plano inclinado.

Posición	Grado Basal	Día 2 post-TCE
Vertical	70°	67.5° (70 - 67.5 = 2.5°) = 3 puntos
Izquierda	70°	62.5° (70 - 62.5 = 7.5°) = 1 punto
Derecha	70°	60° (70 - 60 = 10°) = 0 puntos

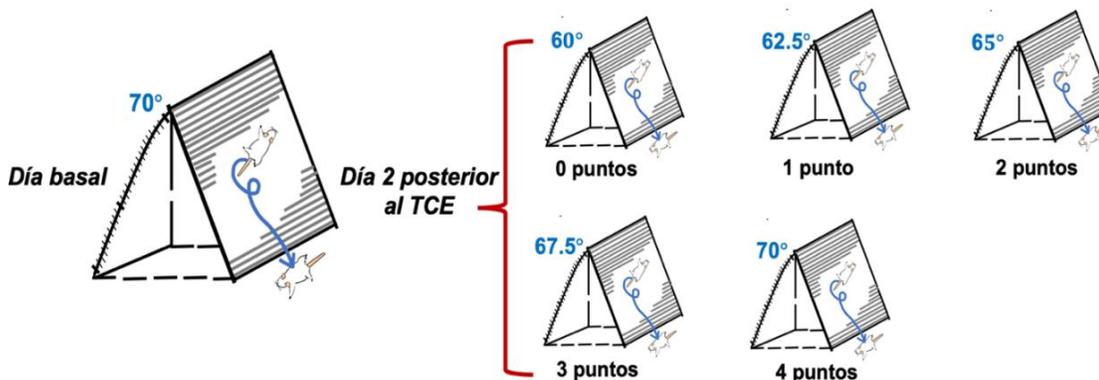


Figura 11. Evaluación de plano inclinado (Figura tomada de la tesis de Segovia-Oropeza, 2018).

4.5. Evaluación de la concentración extracelular de glutamato

4.5.1. Cirugía para implantación de cánula guía

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilacina (17 mg/kg, i.m.). Posteriormente se montaron sobre el marco estereotáxico y se procedió a realizar una incisión sagital de 1,5 cm en la línea media entre las orejas extendiéndose hacia la nariz. Con la ayuda de un hisopo de algodón se eliminó el periostio que recubre el cráneo. Se implantó una cánula guía de acero inoxidable cerca la craneotomía (ver sección 4.2.1) en las siguientes coordenadas: -0.5 mm anteroposterior; 2.2 mm lateral; 1.5 mm de altura. Adicionalmente para dar soporte a un casco fijo de acrílico dental, se implantaron cuatro tornillos de acero inoxidable en la posición anterior a bregma (izquierda y derecha), lateral y posterior a la craneotomía. En los animales del experimento 1 durante la realización de la craneotomía (ver sección 4.2.1) se realizó en el mismo procedimiento el implante de la cánula guía descrita en esta sección, la craneotomía se cubrió con espuma de silicon esteril y se retiró inmediatamente antes de la inducción del TCE. Los animales se dejaron en recuperación durante 7 días antes de cualquier manipulación adicional.

4.5.2. Microdiálisis

La técnica de microdiálisis nos permitió monitorizar el neurotransmisor glutamato en el líquido intersticial cerebral. Sin embargo, los dializados contienen todas las moléculas que puedan difundirse en la sonda de microdiálisis (Anderzhanova *et al.*, 2013; Chefer *et al.*, 2009) La sonda de microdiálisis estaba compuesta de una parte activa (membrana de

poliacrilonitrilo, poro de 40,000 Da) (Maidment *et al.* 1989). La parte activa de la sonda sobresalió 3 mm más allá del borde inferior de la cánula guía. La cánula guía se implantó como se describe en la sección previa (ver sección 4.3.1.1). El día del experimento de microdiálisis se colocó la sonda de microdiálisis con perfusión constante a un flujo de 2 μ l/min con líquido cefalorraquídeo artificial fresco y estéril (concentraciones en mM: cloruro de sodio 125, cloruro de potasio 2.5, fosfato dibásico de sodio 0.5, fosfato monobásico de sodio 5, cloruro de magnesio 1, ácido ascórbico 0.2, cloruro de calcio 1.2; pH 7.4). Posterior al implante de la sonda se dejó un tiempo de estabilización de 2 horas, pasado este tiempo se procedió de la siguiente manera, para el experimento I: se comenzó con la recuperación cada 30 min de los dializados basales (durante 2 h), se indujo un TCE severo (ver sección 4.2.2) y posteriormente se continuó con la recuperación de los dializados durante 5 h. Para el experimento II, posterior al tiempo de estabilización se recuperaron dializados cada 30 min durante 3h. En ambos experimentos, el contenido de los dializados se separó para cuantificación de glutamato por cromatografía líquida de alta resolución.

4.5.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se tomaron 15 μ l de los dializados obtenidos de la sección anterior y se diluyeron con ácido perclórico (HClO_4 , 2 N, 1:20). Luego se mezcló durante 30 s la muestra anterior con 10 μ L de o-ftalaldehído y n-acetilcisteína y se inyectó en el sistema de HPLC (Waters® modelo 474). El sistema de HPLC estuvo compuesto por un detector de fluorescencia que operó a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. El procedimiento de detección fluorométrica de HPLC para la cuantificación de glutamato requirió que los aminoácidos se separaran en una columna de fase reversa de 3.9 mm \times 150 mm (Nova Pack, 4 μ m, C18, Waters®) utilizando una solución A (acetato de sodio disuelto en agua milli-Q, pH 5,05) como disolvente acuoso, una solución B (acetonitrilo) y una solución C (agua mili-Q de agua) como un gradiente de 1 ml/min. Para la cuantificación del glutamato se utilizó como estándar L-glutamato (1 mg/ml) diluido en LCR y se realizaron diluciones (10, 100, 200, 500 ng/ml) para obtener una curva de calibración. El tiempo de retención en la columna del estándar permitió identificar el pico correspondiente a glutamato en el cromatograma. Posteriormente se realizó la integración del área bajo la curva del pico

seleccionado y los datos obtenidos se interpolaron con la curva de calibración para su cuantificación.

4.6. Evaluación de citocinas proinflamatorias

4.6.1. Obtención y preparación del tejido cerebral

Los animales se anestesiaron con pentobarbital (100 mg/kg, ip) y se sacrificaron por decapitación. Posteriormente, se realizó una craneotomía y disección de las estructuras (corteza ipsilateral y contralateral a la lesión) del tejido cerebral, los cuales se congelaron a una temperatura de -20 °C.

4.6.2. Western Blot

4.6.2.1. Extracción de proteínas totales y cuantificación

La extracción de proteínas totales se realizó mediante la homogenización en amortiguador de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, pH 7.5). y se adicionó una tableta de COMPLETE (inhibidor de proteasas). A continuación, las muestras se centrifugaron por 10 min a 14000 rpm a 4°C y se recolectó el sobrenadante, el cual se congeló en alícuotas a -70°C. Se determinó la concentración de proteínas a través del método de Bradford (1976) con albúmina sérica como estándar de calibración. Para ello se colocó cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos. En seguida, se adicionó el reactivo de Bradford (BioRad). La preparación se incubó a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 10 minutos. Finalmente, las mediciones de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 595 nm del detector de absorbancia en microplaca (Epoch™) de la marca BioTek.

4.6.2.2. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Las muestras de proteínas totales (50 ug) se desnaturalizaron en buffer de Laemmli (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, b-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.1%) a 95°C por 5 min. Las muestras ya desnaturalizadas se cargaron en un gel vertical de poliacrilamida de (8-12%) y se sometieron a una corriente de 70 V por 30 min y 110 V por 2 horas utilizando una cámara de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell (Bio-rad) en

presencia del amortiguador de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1%, con un pH de 8.3). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en condiciones húmedas, mediante el uso de un Trans-Blot en la cámara Mini-Protean Tetra Cell, durante 1:30 h con un voltaje constante de 70 V.

4.6.2.3. Inmunodetección de las proteínas de interés

Después de la transferencia, las membranas se incubaron en: 1) solución de bloqueo al 5% (BioRad) en PBS 0.1 M pH 7.2-Tween 0.1% durante 2 h a 4°C; 2) el anticuerpo primario al menos 15 h a 4°C; 3) el respectivo anticuerpo secundario anti-mouse unido a peroxidasa (HRP) por 3 h a 4°C. Todas las incubaciones se realizaron en agitación constante y entre ellas se realizaron al menos, 3 lavados en PBS 0.1 M pH 7.2-Tween 0.1% durante 5 min cada uno a 4°C. Finalmente, las membranas se expusieron a un sustrato quimioluminiscente (Clarity™ Western ECL Blotting Substrates, BioRad) que permitió revelar la expresión de las proteínas de interés en una imagen fotográfica mediante el equipo ChemiDoc™ XRS+ImagingSystem (BioRad) para el posterior análisis densitométrico de las bandas mediante el programa Image Lab 6.1.

4.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Inc. (v.6.01 EE. UU.). Los datos se expresaron con el valor de la media \pm error estándar (e.e.) de la media. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$. Para datos paramétricos:

- Para un análisis entre dos grupos: se realizará la prueba *t* de Student.
- Para más de dos grupos: Se realizará la prueba ANOVA seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnet.

Para datos no paramétricos

- Para un análisis entre dos grupos: Se utilizará la prueba estadística de U de Mann-Whitney.
- Para un análisis para más de dos grupos: Kruskal-Wallis.

5. Experimento 1:

Este experimento se diseñó para determinar la dosis óptima de CBD oral que, como pretratamiento, evite el incremento agudo en la concentración extracelular de glutamato y citocinas proinflamatorias en la corteza cerebral.

5.1. Resultados

Durante la evaluación del experimento de microdialísis se realizaron cursos temporales de las concentraciones de glutamato antes y después de la inducción de un TCE severo. Las concentraciones de glutamato para este experimento se expresaron como % de cambio con respecto a las condiciones basales obtenidas antes de la inducción del TCE o manipulación respectivamente. Debido a las fluctuaciones observadas en los cursos temporales y para observar los datos de forma integral se realizó el análisis del área bajo la curva (ABC). Este análisis se realizó usando el método trapezoidal en el software *Graphpad Prism 8.0.1*. El análisis del ABC es útil para evaluar las relaciones dosis-respuesta en cursos temporales y permite simplificar el análisis estadístico, así como aumentar la potencia de las pruebas sin sacrificar la información contenida en múltiples mediciones (Pruessner *et al.*, 2003).

5.1.1. Evaluación del efecto del CBD en la concentración de glutamato extracelular antes y después de un TCE severo

- Grupo SHAM

Durante las 7 h de los experimentos de microdialísis, el grupo SHAM presentó una concentración de glutamato extracelular de $1.5 \pm 0.16 \mu\text{M}$, ($F_{(10, 66)} = 1.306$, $p=0.2457$) (Figura 12). El ABC para este grupo experimental fue de 426 ± 56 (Figura 13).

- Grupo TCE

En los animales del grupo TCE se indujo una lesión promedio de 2.97 ± 0.11 atm. Los dializados basales (2h) presentaron una concentración de glutamato de $1.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$, los cuales no fueron diferentes a las basales obtenidas por el grupo SHAM ($p=0.948$). Los dializados obtenidos posterior a la inducción del TCE presentaron un incremento significativo en la liberación de glutamato ($738\% \pm 173\%$; $p<0.001$ vs basales) 30 min posteriores al TCE (Figura 12). En los dializados posteriores se detectaron fluctuaciones

significativas en la concentración de glutamato a las 3 y 4 h post-TCE ($514\% \pm 156\%$; $p < 0.05$ y $312\% \pm 132\%$, $p = 0.993$ vs basales, respectivamente) ($F_{(10,63)} = 4.468$, $p < 0.0001$, Figura 12). El ABC para este grupo experimental fue 1348 ± 124 el cual fue estadísticamente diferente al ABC obtenido por el grupo SHAM ($p < 0.001$, Figura 13).

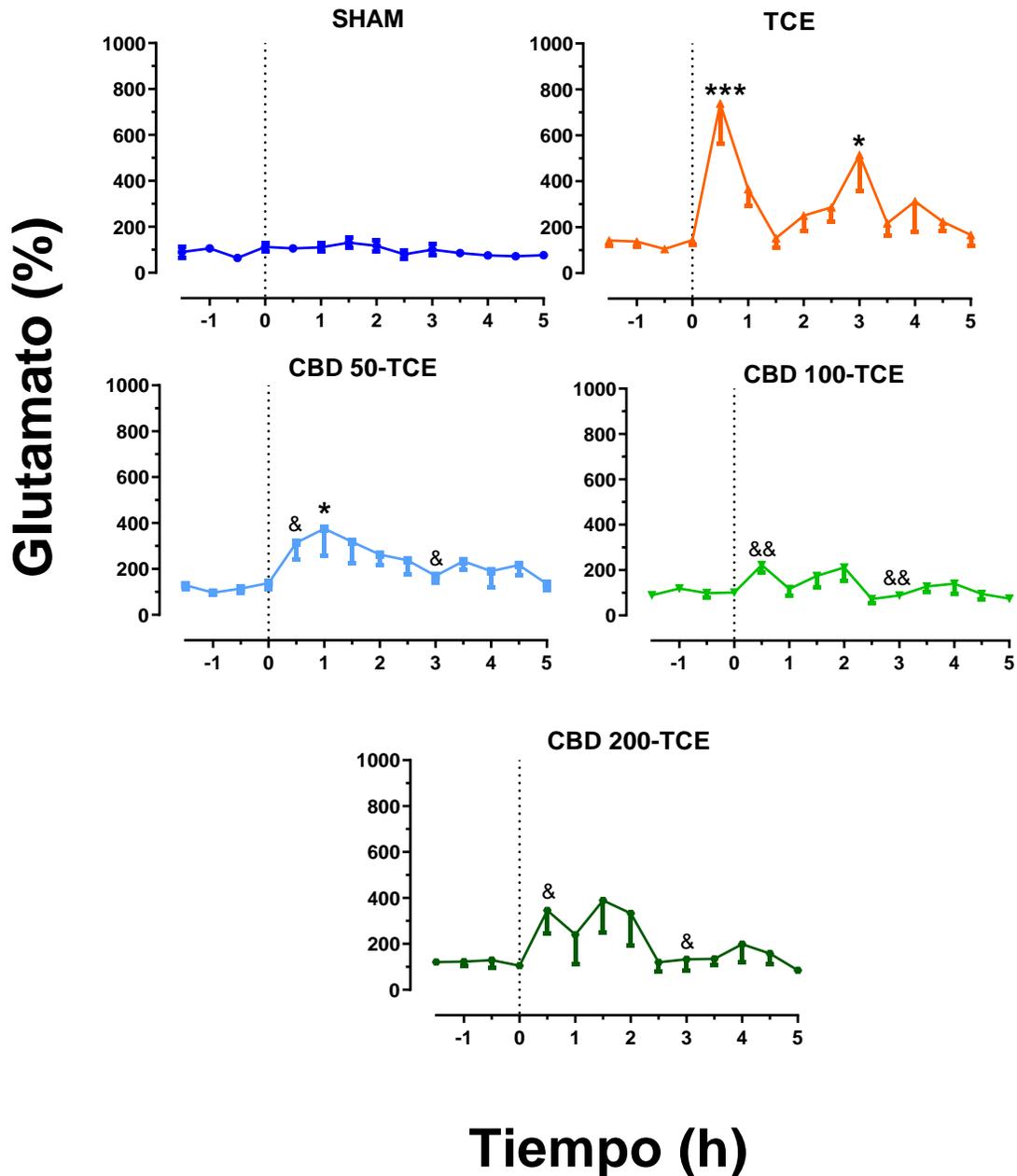


Figura 12. Efecto de la administración oral de diferentes dosis de CBD sobre la liberación de glutamato inducida por un TCE severo. El grupo SHAM mantuvo una liberación constante de glutamato durante todo el experimento de microdiálisis. El grupo TCE mostró un aumento en la

liberación de glutamato después de la inducción del TCE con fluctuaciones subsecuentes a lo largo del experimento. Los grupos pretratados con CBD mostraron una mayor liberación de glutamato post-TCE en comparación con el SHAM. Sin embargo, los cambios fueron menores en comparación con el grupo TCE. Este efecto fue más evidente en animales pretratados con 100 mg/kg v.o. de CBD. Los resultados se analizaron con análisis de efectos mixtos ($F_{(52, 385)} = 2.039$) y ANOVA de una vía. Se presentan como la media \pm e.e. del % de cambio con respecto a las condiciones basales; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs condición basal. A los 30 min después de TCE, ^y $p < 0.05$, ^{yy} $p < 0.01$ vs TCE. CBD, cannabidiol; TCE, Traumatismo Craneoencefálico.

Grupo CBD 50-TCE

En los animales del grupo CBD 50-TCE se indujo una lesión promedio de 3.01 ± 0.14 atm. Los dializados basales (2h) presentaron una concentración de glutamato de 1.4 ± 0.3 μ M, los cuales no fueron diferentes a las basales obtenidas por el grupo SHAM ($p = 0.998$). Los dializados obtenidos a los 30 min post-TCE del experimento de microdiálisis en el grupo CBD 50-TCE presentaron un incremento en la liberación de glutamato de $314\% \pm 73\%$ sin llegar a ser diferente de su basal ($p = 0.253$). Sin embargo 1 h posterior al TCE se presentó un incremento significativo en la liberación de glutamato alcanzando $375\% \pm 119\%$ ($p < 0.05$ vs basales). Posterior a esto se observaron fluctuaciones entre 318%-134.6%. El ABC del grupo CBD50-TCE fue 1072 ± 114 , el cual fue mayor al obtenido por el grupo SHAM ($p < 0.01$).

- Grupo CBD 100-TCE

En los animales del grupo CBD100-TCE se indujo una lesión promedio de 3.07 ± 0.09 atm. Los dializados basales (2h) presentaron una concentración de glutamato de 1.8 ± 0.4 μ M, los cuales no fueron diferentes a las basales obtenidas por el grupo SHAM ($p = 0.990$). Los dializados obtenidos a los 30 min post-TCE del experimento de microdiálisis en el grupo CBD 100-TCE presentaron un incremento en la liberación de glutamato de $222\% \pm 33\%$. Este incremento es significativamente menor que el obtenido por el grupo TCE en el mismo tiempo de evaluación ($p < 0.01$, Figura 12). Las fluctuaciones posteriores se mantuvieron sin diferencias significativas contra los basales, es de notar que a las 3h post-TCE no se observó un incremento significativo como el encontrado en el grupo TCE ($p < 0.01$ vs TCE). El ABC para este grupo experimental fue 574 ± 79 , el cual fue estadísticamente menor al ABC obtenido por el grupo TCE ($p < 0.001$, Figura 13).

- Grupo CBD 200-TCE

En los animales del grupo CBD200-TCE se indujo una lesión promedio de 3.0 ± 0.14 atm. Los dializados basales (2h) presentaron una concentración de glutamato de $2 \pm 0.4 \mu\text{M}$, los cuales no fueron diferentes a las basales obtenidas por el grupo SHAM ($p=0.845$). Se presentó un incremento significativo en la liberación de glutamato 30 min posteriores al TCE de $345\% \pm 98\%$ ($p<0.05$ vs basales). Posteriormente se observaron fluctuaciones entre 312%-83% durante las horas de evaluación subsecuentes (Figura 12). El ABC del grupo CBD200-TCE fue de 919 ± 181 , el cual es estadísticamente mayor que el obtenido por el grupo SHAM ($p<0.05$) y no es diferente del obtenido por el grupo TCE ($p=0.1021$, Figura 13).

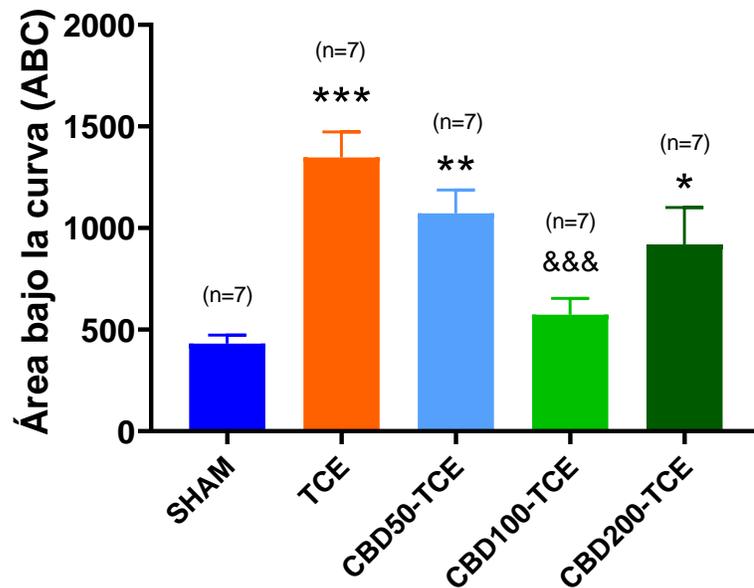


Figura 13. Área bajo la curva. Concentración extracelular de glutamato (ABC) después del TCE en animales pre-tratados con ACC y CBD respectivamente. Los valores representan la media \pm EE del área bajo la curva obtenida de los 30 a las 5 horas post-TCE. ANOVA 1V-Tukey * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs SHAM, &&& $p<0.001$ vs TCE. ACC: Aceite de coco, CBD: cannabidiol, TCE: Traumatismo craneoencefálico.

5.1.2. *Evaluación del efecto del CBD en la expresión de citocinas proinflamatorias 24 h después de un TCE severo*

Se realizó la evaluación de la expresión de 3 citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) extraídas de cerebros obtenidos de 4 ratas por cada grupo experimental. El tejido evaluado fue la corteza ipsilateral y contralateral a la lesión, obteniendo los siguientes resultados.

- Grupo SHAM

La expresión relativa de TNF- α con respecto a β -actina a las 24 horas subsecuentes al TCE fue de 0.452 ± 0.05 en la corteza ipsilateral y para el lado contralateral fue de 0.6 ± 0.10 . Con respecto a la expresión relativa de IL-1 β fue de 0.591 ± 0.05 ipsilateral y 0.644 ± 0.05 del lado contralateral. Por otra parte, la expresión de IL-6 del lado ipsilateral fue de 0.394 ± 0.02 y del lado contralateral de 0.394 ± 0.02 . El valor anterior se consideró como el 100% y se utilizó para evaluar el porcentaje de cambio en la expresión entre los diferentes grupos (Figura 14).

- Grupo TCE

En el grupo sometido a TCE presentó un incremento significativo en la expresión de las 3 citocinas: TNF- α ($53.4 \pm 3.4\%$, $p < 0.05$), IL-1 β ($59.2 \pm 7.7\%$, $p < 0.05$) e IL-6 ($49.9 \pm 4.0\%$, $p < 0.05$) en la corteza ipsilateral al trauma 24 horas post-TCE cuando se compararon contra el grupo SHAM. Por otra parte, en la corteza contralateral se observaron cambios no significativos cuando se comparó contra el SHAM como un incremento de $15.1 \pm 7.1\%$ ($p = 0.542$) para TNF- α y para IL-1 β un decremento de $-1.77 \pm 12.8\%$ ($p = 0.999$). En contraste, se presentó un incremento significativo en la expresión de la IL-6 que fue de $64.9 \pm 14.5\%$, y que es estadísticamente mayor que el obtenido por el grupo SHAM ($p < 0.05$) (Figura 14).

- Grupo CBD50-TCE

En el grupo pretratado con CBD 50 mg/kg se presentaron incrementos en la expresión de TNF- α ($24.1 \pm 16.9\%$) e IL-1 β ($32.3 \pm 11.9\%$) que no fueron estadísticamente diferentes al grupo SHAM ($p = 0.527$ y $p = 0.100$ respectivamente). En contraste la expresión de IL-6 aumentó $41.6 \pm 17\%$, siendo diferente al grupo SHAM ($p < 0.05$) en la corteza ipsilateral al trauma 24 horas post-TCE. En la corteza contralateral se observaron valores similares al SHAM para las 3 citocinas evaluadas ($p > 0.05$ vs SHAM), (Figura 14).

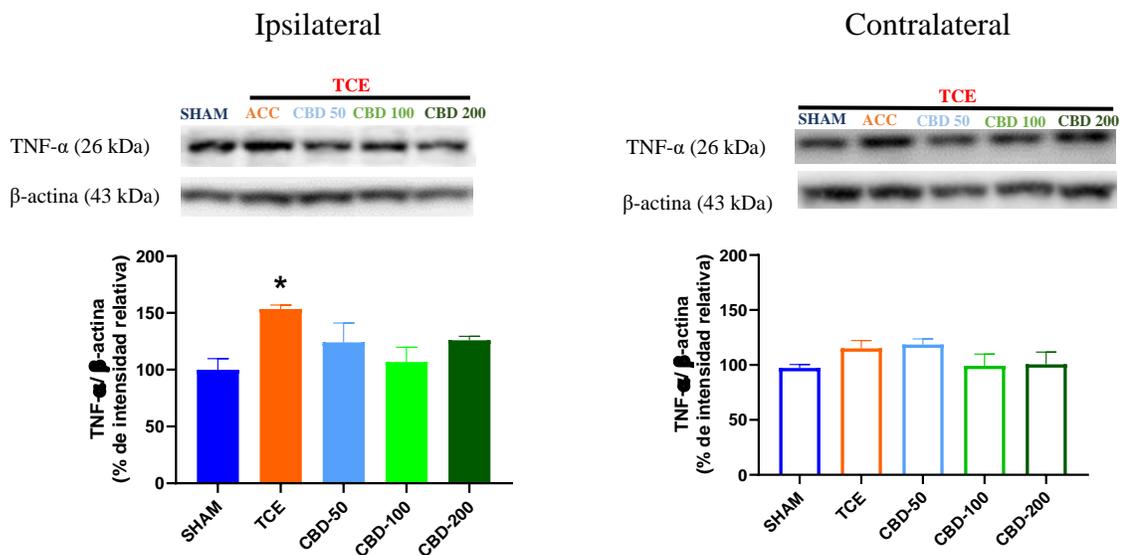
- Grupo CBD100-TCE

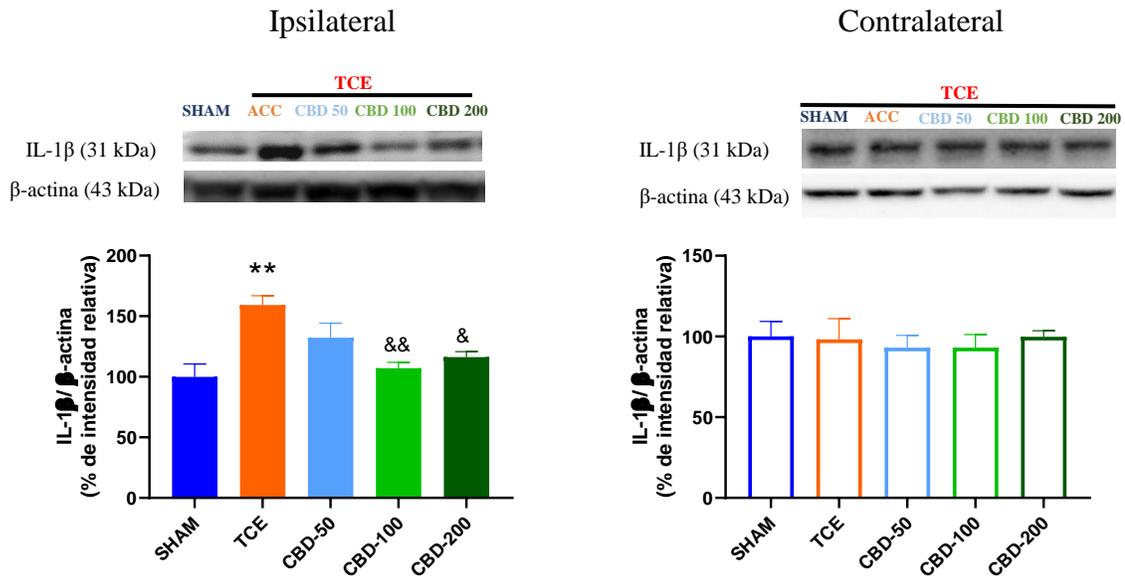
En el grupo pretratado con CBD 100 mg/kg se presentaron incrementos en la expresión de TNF- α (6.8 ± 12.9 %) e IL-1 β (7.1 ± 4.8 %) e IL-6 (21.3 ± 2.9 %) los cuales no son diferentes al grupo SHAM ($p=0.990$, $p=0.973$ y $p=0.460$ respectivamente). Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de IL-1 β ($p<0.01$) cuando se comparó contra el grupo TCE. Por otra parte, en la corteza contralateral se observaron valores similares al SHAM para las 3 citocinas evaluadas ($p>0.05$ vs SHAM) y una menor expresión en la IL-6 cuando se comparó contra el grupo TCE ($p<0.05$, Figura 14).

- Grupo CBD200-TCE

En el grupo pretratado con CBD 200 mg/kg no se presentó cambios significativos en la expresión de TNF- α (25.9 ± 3.4 %), IL-1 β (16.3 ± 4.4 %) e IL-6 (18.9 ± 4.3 %) en la corteza ipsilateral cuando se compararon contra el grupo SHAM ($p=0.459$, $p=657$ y $p=0.998$ respectivamente). Sin embargo, cuando se comparó contra el grupo TCE, se observó una menor expresión de IL-1 β ($p<0.05$). Por otra parte, la expresión de TNF- α (0.7 ± 11.1 %) e IL-1 β ($-0.22 \pm 3.7\%$) en la corteza contralateral no fue diferente de la expresión obtenida en el grupo SHAM ($p=0.7131$ y $p>0.999$ respectivamente). Sin embargo, se observó menor expresión de IL-6 (-5.66 ± 9.3 %) al compararlo contra el grupo TCE ($p<0.05$).

TNF- α



IL-1 β 

IL-6

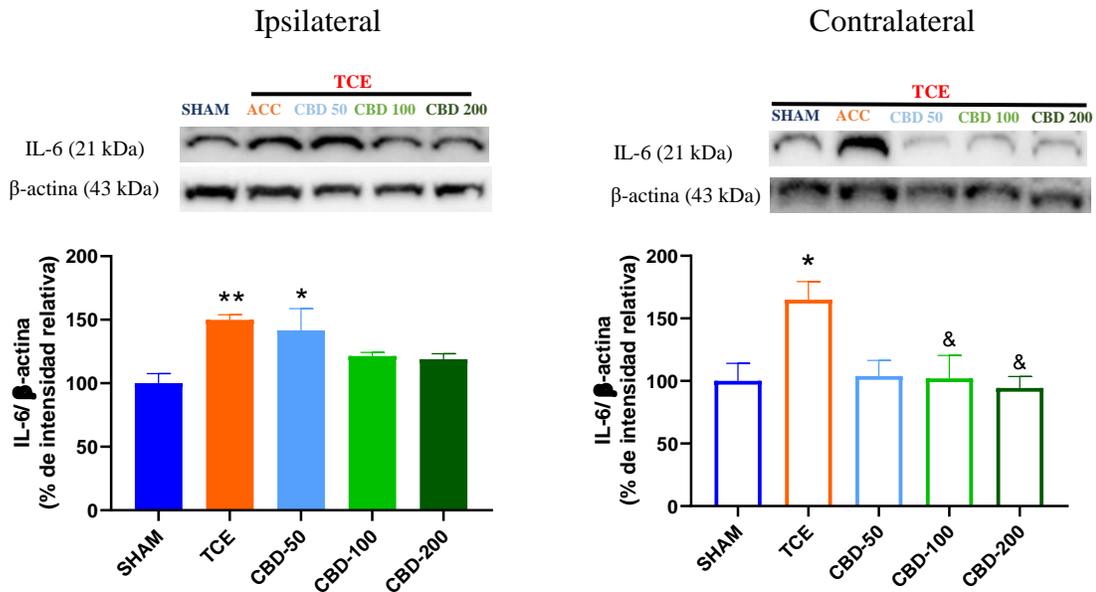


Figura 14. Expresión de citocinas proinflamatorias 24h post-TCE en corteza cerebral. Expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 después de un TCE severo en animales pretratados con ACC y CBD respectivamente. Los valores representan la media \pm EE de la expresión relativa. ANOVA 1V-Tukey * p <0.05, ** p <0.01 vs SHAM, y p <0.05 yy p <0.01 vs TCE. ACC: Aceite de coco, CBD: cannabidiol, TCE: Traumatismo craneoencefálico.

5.1.3. *Evaluación del efecto del CBD en la función sensoriomotora, peso y mortalidad*

- Grupo SHAM

Los animales del grupo SHAM al inicio del experimento presentaron un peso de 290.2 ± 2.1 g. A las 48 h posterior a la manipulación los animales ganaron en promedio 1.3% g respecto a su peso inicial. Por otra parte, la puntuación obtenida en las pruebas de NS se mantuvo en promedio en 27.0 ± 0.3 . Ningún animal murió durante la manipulación o posterior a esta (Tabla 2).

- Grupo TCE

Los animales del grupo TCE al inicio del experimento presentaron un peso de 291.9 ± 9.8 g. A las 48 h post-TCE los animales tuvieron un decremento de 9.7% en el peso corporal ($p < 0.001$ vs SHAM). Esta disminución también se observó en la capacidad sensoriomotora donde presentaron daño severo de acuerdo con la escala del NS (13.5 ± 1.6 puntos, $p < 0.001$ vs SHAM). Siete animales murieron entre la inducción del TCE y los 5 días posteriores a este, representando una mortalidad del 50% ($p < 0.001$ vs SHAM) (Tabla 2).

- Grupo CBD50-TCE

Los animales del grupo CBD50-TCE al inicio del experimento presentaron un peso de 287 ± 12 g. A las 48 h post-TCE los animales tuvieron un decremento de 6.1% en el peso corporal ($p < 0.05$ vs SHAM). Esta disminución también se observó en la capacidad sensoriomotora donde presentaron daño severo de acuerdo con la escala del NS (16.4 ± 1.4 puntos, $p < 0.01$ vs SHAM). Dos animales murieron entre la inducción del TCE y los 5 días posteriores a este, representando una mortalidad del 22.2% la cual es significativamente menor que la observada en el grupo TCE sin tratamiento ($p < 0.001$ vs TCE) (Tabla 2).

- Grupo CBD 100-TCE

Los animales del grupo CBD100-TCE al inicio del experimento presentaron un peso de 275 ± 10.3 g. A las 48 h post-TCE los animales tuvieron un decremento de 7.2 % en el peso corporal ($p < 0.01$ vs SHAM). Esta disminución también se observó en la capacidad sensoriomotora donde presentaron daño severo de acuerdo con la escala del NS (14.8 ± 2.8 puntos, $p < 0.001$ vs SHAM). Dos animales murieron entre la inducción del TCE y los 5 días

posteriores a este, representando una mortalidad del 22.2% la cual es significativamente menor que la observada en el grupo TCE sin tratamiento ($p < 0.001$ vs TCE) (Tabla 2).

- Grupo CBD200-TCE

Los animales del grupo CBD200-TCE al inicio del experimento presentaron un peso de 296.7 ± 23.4 g. A las 48 h post-TCE los animales tuvieron un decremento de 9.6 % en el peso corporal ($p < 0.001$ vs SHAM). Esta disminución también se observó en la capacidad sensoriomotora donde presentaron daño severo de acuerdo con la escala del NS (15.1 ± 2.3 puntos, $p < 0.001$ vs SHAM). Cuatro animales murieron entre la inducción del TCE y los 5 días posteriores a este, representando una mortalidad del 36.3 % la cual es significativamente menor que la observada en el grupo TCE sin tratamiento ($p < 0.05$ vs TCE) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del pretratamiento con CBD en los cambios en peso, función sensoriomotora y mortalidad inducidos a las 48 horas post-TCE

Grupos (al inicio del experimento)	Peso corporal en g (% vs basal) (n=7)	Neuroscore (n=7)	Porcentaje de mortalidad (post-TCE)
SHAM (n=7)	294 ± 6.7 (+1.3%)	27.0 ± 0.3	0%
TCE (n=14)	$263 \pm 10.5^{***}$ (-9.7%) ^{@@@}	$13.5 \pm 1.6^{###}$	50%
CBD 50-TCE (n=9)	$269 \pm 11.8^{**}$ (-6.1%) [@]	$16.4 \pm 1.4^{##}$	22.2% ^{yyy}
CBD 100-TCE (n=9)	$253 \pm 11.5^{***}$ (-7.2%) ^{@@}	$14.8 \pm 2.8^{###}$	22.2% ^{yyy}
CBD200-TCE (n=11)	$268 \pm 23.4^{***}$ (-9.6%) ^{@@@}	$15.1 \pm 2.3^{###}$	36.3% ^y

Los valores representan la media \pm error estándar. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. SHAM; @ $p < 0.5$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.001$ vs valores basales; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs SHAM; ^y $p < 0.05$, ^{yyy} $p < 0.001$ vs grupo TCE.

De acuerdo con los resultados obtenidos de este experimento, el grupo pretratado con CBD a la dosis 100 mg/kg administrado por vía oral se consideró como el tratamiento óptimo para evaluar durante el experimento a largo plazo, ya que fue el más efectivo para evitar la sobre liberación de glutamato, el incremento de citocinas proinflamatorias y disminuyó la mortalidad posterior a un TCE severo.

5.2. Discusión

En nuestro trabajo pudimos observar que el TCE indujo sobreliberación de glutamato durante las primeras horas subsecuentes al trauma. Desde 1989, en ratas sometidas a TCE y mediante la evaluación de dializados se describió que posterior a un TCE se produce un incremento en las concentraciones extracelulares del neurotransmisor excitador más importante: glutamato. Este incremento es dependiente de la gravedad de la lesión (Faden *et al.*, 1989, Palmer *et al.*, 2004). La mayor desventaja de los estudios previos de microdialisis es el tiempo de evaluación ya que solo han observado cambios inmediatos (120 min) y no periodos más prolongando. Nuestro estudio permitió observar las fluctuaciones en las concentraciones de glutamato que se dan inmediatos al TCE y por un periodo de 5 horas subsecuentes al trauma. Estas fluctuaciones se han observado también en pacientes con TCE y se estableció una correlación positiva entre la sobre liberación de glutamato con un peor pronóstico clínico, así como un aumento de la mortalidad (Kierans *et al.*, 2014; Shutter *et al.*, 2004; Timofeev *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos que fallan durante el control glutamatérgico post-TCE se encuentra la recaptura del glutamato del espacio sináptico. Esta recaptura está orquestada principalmente por los transportadores en astrocitos como GLT1 y GLAST los cuales posterior a un TCE se encuentran disminuidos (Cheng *et al.*, 2019). El resultado es que el glutamato no se puede recapturar y pasa más tiempo en el espacio extracelular facilitando procesos excitotóxicos. Adicionalmente, la principal síntesis y degradación del glutamato se encuentra a cargo de las enzimas glutaminasa (glutamina a glutamato) y glutamina sintetasa (glutamato a glutamina), respectivamente (Hertz *et al.*, 1999; Schousboe *et al.*, 2014). Esta última, se encuentra disminuida posterior a un TCE y, por tanto, no hay suficiente enzima para degradar las altas concentraciones de glutamato (Gerbatin *et al.*, 2017). La participación de esta enzima es importante en el metabolismo del glutamato, y se describió que una mayor actividad enzimática por parte de la glutamina sintetasa preserva mecanismos neuroprotectores (Zhang *et al.*, 2011). Adicionalmente, después de la inducción de un TCE en ratas existe la inactivación del complejo mitocondrial 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDHC) el cual participa en el metabolismo del glutamato y al estar inactivado favorece procesos excitotóxicos y de estrés oxidante (Mkrtychyan *et al.*, 2018). En conjunto los cambios previamente descritos acompañado de una señalización aumentada de calcio

intracelular puede facilitar el aumento progresivo y sostenido de las concentraciones de glutamato subsecuente a un TCE (Wojda *et al.*, 2008).

Por otra parte, se describió que la excitotoxicidad está fuertemente relacionada con procesos inflamatorios (Ward *et al.*, 2009). Este proceso también se da a la inversa ya que citocinas como IL-1 β y el TNF- α inhiben la recaptura de glutamato en cultivo de astrocitos a través de un mecanismo que involucra a la óxido nítrico sintasa (Hu *et al.*, 2000). Respecto a los procesos inflamatorios, la lesión primaria favorece el daño de vasos sanguíneos, neuronas y de BHE, lo que aumenta el reclutamiento de células sanguíneas, células del sistema inmune y facilita la liberación de contenidos proinflamatorios hacia el parénquima cerebral (Sulhan *et al.*, 2020).

En este estudio se encontró que el TCE indujo un aumento en la expresión de 3 citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) en corteza cerebral a las 24 horas post-TCE. El aumento de estas citocinas se describió anteriormente en modelos animales de TCE (Liu *et al.*, 2016; He *et al.*, 2004) y en pacientes (Holmin *et al.*, 2004). El incremento en las citocinas presenta patrones temporales y regionales. En la fase temprana post-TCE las regiones cercanas a la lesión presentan mayores procesos inflamatorios en comparación con áreas distales a la lesión (Holmin *et al.*, 2004). Las citocinas se inducen como respuesta del daño inicial y tienen diversas acciones como la de mediar y favorecer reparación celular, sin embargo, también pueden exacerbar la lesión si se mantienen elevadas por mucho tiempo. El papel beneficioso o perjudicial que juega en el curso temporal del TCE sigue en investigación.

El aumento en la expresión de las citocinas reportada en este estudio es más evidente del lado ipsilateral a la lesión. Sin embargo, observamos un incremento significativo de la IL-6 del lado contralateral. Respecto a esta citocina en pacientes con TCE se mantienen niveles altos estables hasta 24 horas. Hay evidencias clínicas de que la IL-6 permanece elevada hasta 24 h posteriores a un TCE. Además, la IL-6 tiene un valor predictivo mayor en comparación con otros marcadores inflamatorios, ya que su aumento se asocia a un mal pronóstico clínico y complicaciones infecciosas mayores (Woiciechowsky *et al.*, 2002). Por otra parte, en ratones con deficiencia de la IL-6 se determinó que esta citocina participa en la activación de procesos neuroprotectores post-TCE, por lo que el incremento observado en este estudio no

se descarta como un mecanismo de reparación celular (Penkowa *et al.*, 1999). Sin embargo, la lesión por LLPF induce daño tanto focal como difuso, por lo que la lesión aguda se extiende a sitios adyacentes y distales a la lesión (Thompson *et al.*, 2005). Por otra parte, existe evidencia de que la IL-6 se sobreexpresa tempranamente en corteza contralateral e hipocampo (3 a 18 horas) de ratas traumatizadas, por lo que este incremento no es inesperado (Taupin *et al.*, 1993).

Por otra parte, las consecuencias funcionales inducidas por el TCE como la pérdida de peso corporal y la disminución de la capacidad sensoriomotora detectadas 48 h post-TCE coincide con lo reportado previamente en otros estudios de TCE inducido por LLPF (Segovia-Oropeza *et al.*, 2020; Santiago-Castañeda *et al.*, 2021). En clínica, la pérdida de peso corporal en pacientes con TCE se asoció a un hipermetabolismo prolongado y significativo durante la estancia en unidades de cuidados intensivos (Krakau *et al.*, 2006). Por este motivo, la alimentación parenteral o enteral se sugiere como coadyuvante en la terapéutica actual para los pacientes críticos con TCE, ya que los pacientes que reciben soporte nutricional tienen una mejor recuperación (Perel *et al.*, 2006). Por otra parte, en el control de la actividad sensoriomotora participan diversas estructuras como, la corteza sensoriomotora, los núcleos subcorticales, el cerebelo y el tronco encefálico, los cuales forman conexiones entre sí para coordinar a las neuronas motoras de la médula espinal. Por lo tanto, el daño sensoriomotor subsecuente al TCE sugiere que alguna de estas conexiones y/o estructuras se encuentra dañada (Fujimoto *et al.*, 2004).

Actualmente no hay tratamientos neuroprotectores aprobados para las consecuencias de un TCE (Watzlawick *et al.*, 2016). El tratamiento terapéutico se administra posterior al daño inicial y más del 40% de los pacientes cursan con algún tipo de discapacidad (Capizzi *et al.*, 2020). Por lo anterior, parte de la investigación de nuevos fármacos neuroprotectores se enfoca en buscar pretratamientos. Ejemplo de ello es la curcumina, la cual administrado como pretratamiento mejoró la función neurológica y disminuyó el tamaño de la lesión post-TCE (Samini *et al.*, 2013). Sin embargo, la investigación con curcumina no ha avanzado en el campo clínico de TCE y los autores siguieren más investigación para determinar los efectos a largo plazo de este compuesto (Khayatan *et al.*, 2022). Otro fármaco evaluado como

pretratamiento en modelo de hipoxia-isquemia (Khaksar *et al.*, 2017a, b) y aprobado por la FDA para epilepsias de difícil control es el CBD (Abu-Sawwa *et al.*, 2020).

En este estudio inicialmente se realizó la evaluación del CBD en forma dosis respuesta para identificar la dosis que como pretratamiento redujera los niveles de glutamato extracelular y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias inducidas por el TCE. En estudios previos del laboratorio se identificó que el CBD administrado v.o. a 200 mg/kg redujo la gravedad de las convulsiones inducidas por el ácido 3-mercaptopropiónico (Frías-Soría *et al.*, 2021). Con base en lo anterior, en el presente estudio evaluamos las dosis de CBD de 50, 100 y 200 mg/kg. Nuestros experimentos demostraron que el pretratamiento oral con CBD en dosis de 50 a 200 mg/kg redujo la liberación de glutamato inducida por un TCE, un efecto más evidente a la dosis de 100 mg/kg. El efecto de reducción de glutamato por parte del CBD es consistente con lo reportado *in vitro* en sinaptosomas obtenidos de ratas administradas con cocaína (Gobira *et al.*, 2015).

Aunque aún no se acepta un mecanismo por el cual el CBD reduce los niveles de glutamato en diversas patologías, se han propuesto algunos mecanismos que posiblemente estén involucrados. En este sentido, la liberación de glutamato depende de la entrada de calcio a la célula (Yaguchi *et al.*, 2010). En el control de calcio intracelular participan los transportadores NCX2-3 y estos juegan un papel esencial en el intercambio calcio-sodio y en la modulación de la excitabilidad neuronal (Secondo *et al.*, 2007). Por tanto, la inhibición o disminución de la expresión de este transportador aumenta la entrada de calcio al espacio intracelular, favoreciendo la muerte neuronal y la liberación de neurotransmisores (Szydłowska *et al.*, 2010). Un estudio preclínico demostró que el pretratamiento con CBD aumentó la expresión del transportador NCX2 en la corteza cerebral y preservó la integridad de la BHE en animales sometidos a hipoxia-isquemia (Khaksar *et al.*, 2017a). Adicionalmente se demostró que la exposición con CBD en modelos *in vitro* disminuyó la liberación de calcio del retículo endoplásmico (Bano *et al.*, 2018). Las evidencias anteriores sugieren que el CBD disminuye la entrada y liberación de calcio y puede explicar por consiguiente la menor liberación de glutamato posterior a un TCE.

Con relación al sistema endocannabinoide, el CBD tiene muy baja afinidad por los receptores CB1 y CB2. Sin embargo, el CBD inhibe la degradación enzimática y la

recaptación de la anandamida (Bisogno *et al.*, 2001). Esta última, es agonista del receptor CB1, cuya activación disminuye la liberación de glutamato (DiMarzo *et al.*, 2002). Por lo anterior, es posible que parte del efecto producido por el CBD en la liberación de glutamato y en los procesos excitotóxicos, se deban a la activación indirecta del sistema endocannabinoide a través del aumento de los niveles de sus ligandos endógenos.

Por otro lado, el CBD disminuye el aumento de la concentración de glutamato inducido por periodos de hipoxia isquemia. Este efecto se pierde cuando se administra antagonistas del receptor A1, cuyo agonista endógeno es la adenosina (Castillo *et al.*, 2010). La adenosina se describió como un modulador endógeno de la excitabilidad neuronal y entre sus principales efectos se encuentra la disminución de la liberación de glutamato (Lazarevic *et al.*, 2021) y la inmunosupresión (Carrier *et al.*, 2006). Se ha descrito que el CBD inhibe al transportador de nucleósidos ENT1, el cual participa en la recaptura de adenosina en astrocitos, favoreciendo que esta permanezca más tiempo en el espacio sináptico y participe en los efectos antes descritos (Carrier *et al.*, 2006).

La disminución del glutamato por el CBD también puede asociarse a sus efectos antiinflamatorios. En este estudio observamos que la administración del pretratamiento con CBD resultó en una atenuación de la expresión de todas las citocinas evaluadas post-TCE, siendo más evidente en las dosis superiores a 50 mg/kg. Esta disminución es similar a la reportada en un modelo de TCE inducido por impacto cortical controlado. En este último, el CBD disminuyó la sobreexpresión de TNF α , NF- κ B IL-1 β , GFAP y AQP4 y preservó la integridad de la BHE (Jian *et al.*, 2021). El CBD administrado como pretratamiento en un modelo de isquemia disminuyó la expresión de TNF α y la expresión de su receptor TNFR1 (Khaksar *et al.*, 2017b). El receptor TNFR1 se expresa en diferentes tipos celulares, incluyendo las células del sistema inmune y su activación está relacionada con la señalización proinflamatoria, mecanismos proapoptóticos y la proliferación de células T CD4⁺ patológicas (Bertheloot *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2022). Se demostró que la inhibición de TNFR1 mejora la señalización prosupervivencia en un modelo de isquemia (Kumar *et al.*, 2022).

Por otra parte, se demostró que el CBD disminuye la permeabilidad de las membranas celulares alterando su biofísica. La interacción del CBD con las membranas, depende del estado inicial de fluidez, los niveles de colesterol y el empaquetamiento de la bicapa (Perez

et al., 2022). Adicionalmente, utilizando resonancia magnética nuclear se confirmó *in vitro* tras la exposición con CBD este se localizó entre las membranas celulares alterando la elasticidad y el grosor de la membrana (Ghovanloo *et al.*, 2021). En el estudio anterior, también se describió una participación del CBD sobre los canales de sodio activado por voltaje Nav 1.4. En estos canales se describió que el CBD se une selectivamente en su estado inactivo afectando su conformación y disminuyendo así su activación (Huang *et al.*, 2021). Por lo tanto, se necesitan más estudios para identificar si el CBD ayuda a atenuar el daño biomecánico inducido por el TCE en las membranas celulares, así como la excitabilidad inducida por el mismo.

Los efectos del CBD en estudios anteriores y similares a lo encontrado en este estudio parecen depender de la dosis. En diversos modelos experimentales la administración de CBD presenta efectos dosis dependiente (Guimarães *et al.*, 1990; Nedelescu *et al.*, 2022). En este estudio encontramos que a la dosis de 50 y 200 mg/kg los efectos no eran tan evidentes a los observados con la dosis de 100 mg/kg. Es esencial realizar más experimentos para investigar si estos efectos siguen siendo evidentes con dosis más altas o bajas de CBD que las probadas en este estudio. La administración de diferentes dosis de CBD produce efectos duales en pruebas de inhibición prepulso (medida antipsicótica) en un modelo de esquizofrenia en ratones (Levin *et al.*, 2014). Por lo tanto, se describió que los efectos del CBD dependen de la dosis, la vía de administración inclusive del sexo de los animales (Moore *et al.*, 2022). Además, en estudios *in vitro* se describió que, a bajas concentraciones, el CBD es un agonista de los receptores 5-HT_{1A} (Russo *et al.*, 2005), lo que facilita los efectos inhibitorios. Por el contrario, el CBD en altas concentraciones actúa como un agonista inverso de estos receptores (Martínez-Aguirre *et al.*, 2020) y puede inducir efectos excitatorios un efecto similar a lo observado en los canales TRPV1. Por lo tanto, dependiendo de la concentración de CBD es la capacidad que tendrá para activar o inhibir las vías de señalización de sus diferentes blancos terapéuticos. Estos blancos incluyen a aproximadamente 12 receptores acoplados a proteínas G, 22 canales ionotrópicos, 25 enzimas, 10 transportadores, 5 canales iónicos, 2 receptores nucleares entre otros. Por lo que aún no es claro si un blanco o múltiples blancos participan en los efectos del CBD (Mlost *et al.*, 2020).

Es importante notar que a pesar de que a las 48 h post-TCE no se observó una mejoría en la capacidad sensoriomotora y en la ganancia de peso corporal en los animales con TCE con o sin pretratamiento, la mayoría de las lesiones previas en modelos donde se inducen lesiones severas no observan mejoras hasta pasados los 7 días en adelante post-TCE (Huerta-De la Cruz *et al.*, 2022; Segovia-Oropeza *et al.*, 2020). Sin embargo, es de destacar que se presentó una disminución de la mortalidad en aquellos animales pretratados con CBD. La disminución de la mortalidad se observó en otros modelos como sepsis (Cassol *et al.*, 2010), y modelo de crisis convulsivas de epilepsia del lóbulo temporal (Jones *et al.*, 2012).

El TCE se asocia con una alta tasa de mortalidad en pacientes y puede ser consecuencia de múltiples factores como aumento de la presión intracraneal, la formación de edema, el daño de la BHE y los periodos prolongados de hipoxia/isquemia entre otros (Lusardi *et al.*, 2012). La hipoxia favorece los niveles altos de glutamato y el daño axonal difuso (Silverstein *et al.*, 2000). En tallo cerebral existe daño axonal difuso post-TCE (Smith *et al.*, 2000) y se asoció a una depresión respiratoria mayor y cambios cardiovasculares que inducen una mayor mortalidad. Uno de los factores cardiovasculares relacionados con la mortalidad en pacientes con TCE es la hipertensión arterial (Sellman *et al.*, 2012). Sobre esto, el CBD inyectado en el núcleo del lecho de la estría terminal restaura la función barorrefleja a través de su acción sobre los receptores 5HT_{1A} (Alves *et al.*, 2010). Adicionalmente, en un modelo de hipoxia-isquemia el CBD induce un efecto positivo sobre las variables hemodinámicas (Alvarez *et al.*, 2008). En conjunto podemos sugerir que los efectos del CBD podrían reducir las alteraciones cardiovasculares y por consiguiente la mortalidad post-TCE. Se necesitan más estudios que evalúen si mantener la administración de CBD o combinarlo con otros fármacos post-TCE mejoran las condiciones funcionales a corto plazo como las evaluadas en este trabajo.

6. Experimento 2:

Este experimento se diseñó para analizar el efecto a largo plazo del pre- y postratamiento oral con una dosis óptima de CBD en la concentración extracelular de glutamato, la expresión de citocinas proinflamatorias y consecuencias funcionales subsecuentes a un TCE severo.

6.1. Resultados

Con respecto al experimento II, dado a que no tenemos una evaluación basal antes de la inducción del TCE, los resultados obtenidos en este experimento se expresaron como el promedio de la concentración de glutamato extracelular (μM) obtenidos durante las 3 h del experimento de microdialísis al día 30 post-TCE.

6.1.1. Evaluación del efecto del CBD en la concentración de glutamato extracelular a los 30 días posterior a un TCE severo

Se analizaron los dializados obtenidos al día 30 post-TCE o manipulación del experimento de microdialísis de los diferentes grupos experimentales (Figura 15). Para el grupo SHAM se obtuvo una concentración extracelular de glutamato de $0.8 \pm 0.16 \mu\text{M}$. Esta concentración fue similar a la obtenida por el grupo SHAM tratado con CBD $0.77 \pm 0.15 \mu\text{M}$. En contraste, la concentración extracelular de glutamato fue mayor en el grupo TCE ($2.0 \pm 0.27 \mu\text{M}$, $p < 0.01$ vs SHAM). Los grupos pre y post tratados con CBD 100 mg/kg presentaron una concentración extracelular de glutamato de $0.73 \pm 0.19 \mu\text{M}$ y $1 \pm 0.21 \mu\text{M}$ respectivamente. Esta concentración fue menor que la obtenida por el grupo TCE ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente).

6.1.2. Evaluación del efecto del CBD en la expresión de citocinas proinflamatorias a los 31 días posterior a un TCE severo.

En el análisis de la expresión de citocinas proinflamatorias al día 31 post-TCE, el grupo TCE presentó un incremento en la expresión de TNF- α ($86 \pm 27.5 \%$, $p < 0.01$), IL-1 β ($61.2 \pm 16.1 \%$, $p < 0.01$) e IL-6 ($53 \pm 11 \%$, $p < 0.05$) en la corteza ipsilateral al trauma en comparación con el grupo SHAM. El aumento en la expresión de IL-6 se observó también en el grupo pretratado con CBD 100 mg/kg ($43.8 \pm 16.9\%$ $p < 0.05$) pero no en el grupo pre y postratado

con CBD ($p=0.454$). El grupo CBD que solo fue manipulado no presentó cambios en la expresión de ninguna de las 3 citocinas evaluadas al día 31 post-TCE al compararlo con el grupo SHAM ($p>0.05$, Figura 16).

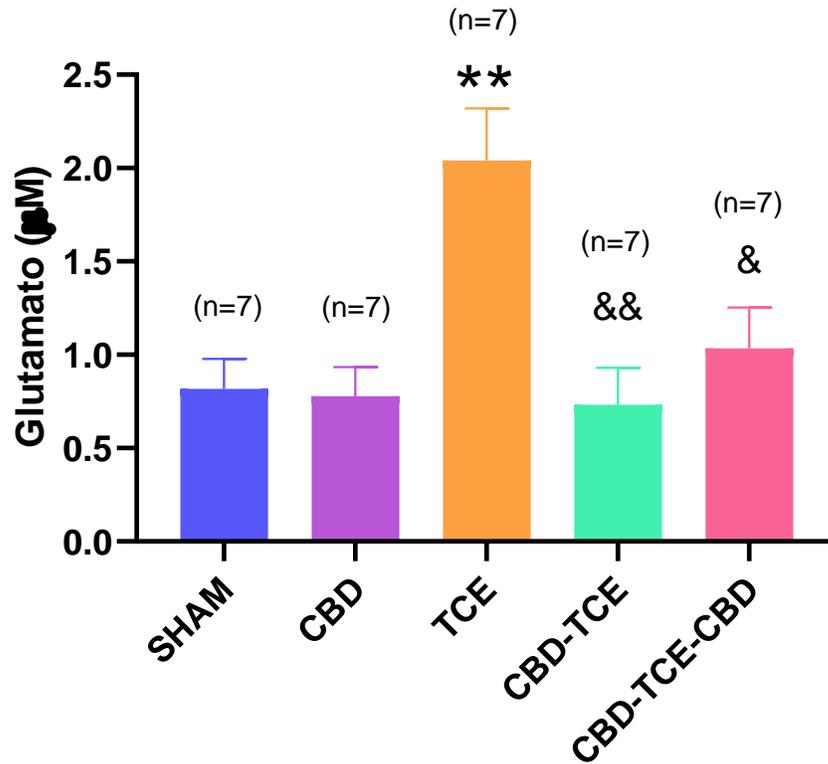


Figura 15. Concentración extracelular de glutamato al día 30 post-TCE. Análisis de la concentración (μM) extracelular de glutamato al día 30 post-TCE o manipulación. Los valores representan la media \pm EE de la concentración extracelular de glutamato (μM). ANOVA 1V-Tukey (** $p<0.01$ vs SHAM; $^{\gamma}p<0.05$, $^{\gamma\gamma}p<0.01$ vs TCE).

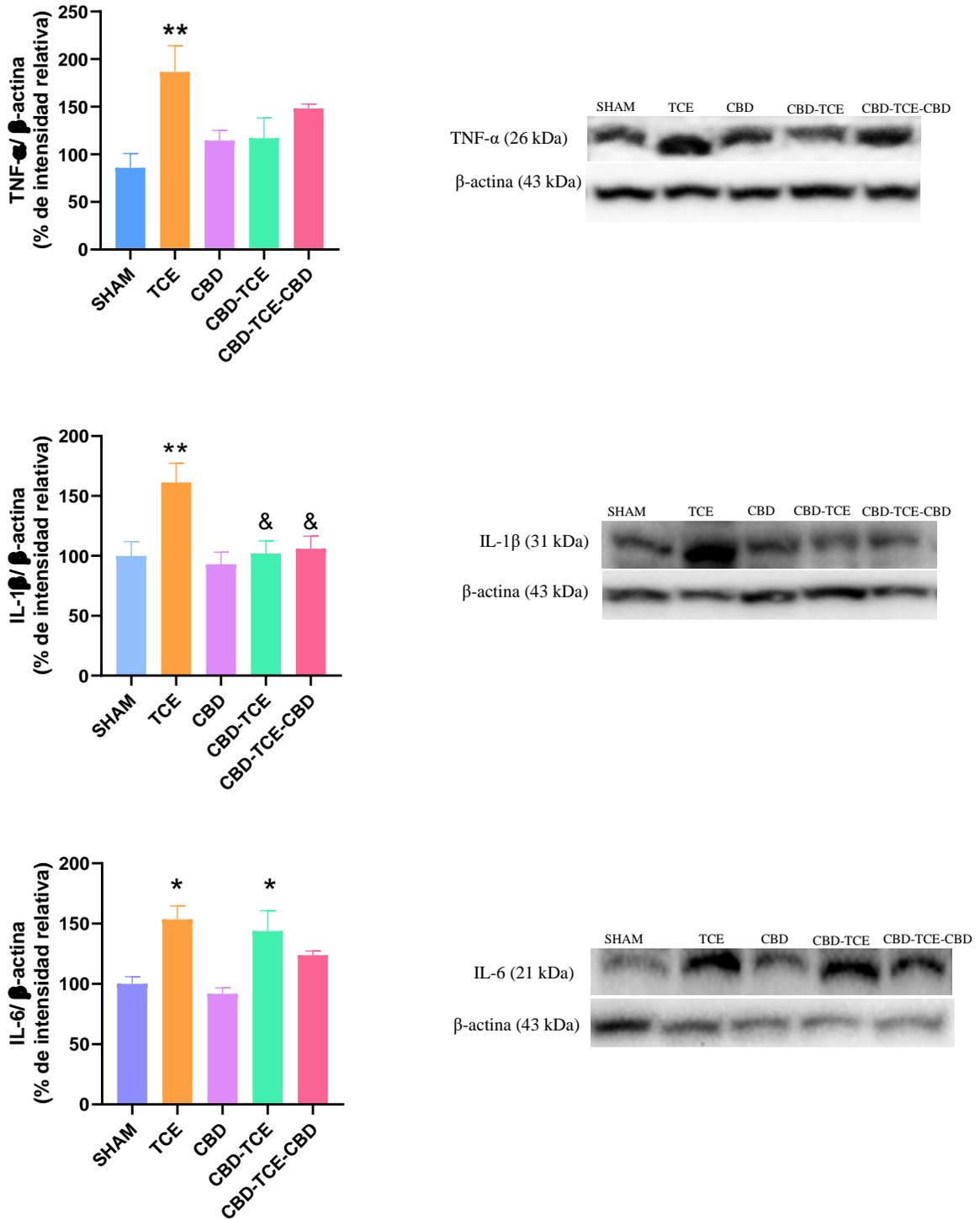


Figura 16. Expresión de citocinas proinflamatorias al día 31 post-TCE en corteza cerebral. Expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 después de un TCE severo en animales tratados con ACC y CBD respectivamente. Los valores representan la media \pm EE de la expresión relativa. ANOVA 1V-Tukey

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs SHAM, ^y $p < 0.05$ vs TCE. ACC: Aceite de coco, CBD: cannabidiol, TCE: Traumatismo craneoencefálico.

6.1.3. *Evaluación del efecto del CBD en la función sensoriomotora, peso y mortalidad al día 28 post-TCE*

Las ratas del grupo SHAM presentaron una ganancia de peso corporal de $40.98 \pm 4.3\%$ al día 28 después de la manipulación ($p < 0.001$ vs basal) y un NS de 27.3 ± 0.1 durante todo el experimento. El grupo CBD mostró un aumento de peso corporal similar al grupo SHAM ($p = 0.752$) y los valores de NS se mantuvieron en 26.7 ± 0.4 el día 28 después de la manipulación (Tabla 2).

Las ratas del grupo TCE sufrieron una disminución del peso corporal al día 2 post-TCE ($-13.74 \pm 1.9\%$, $p < 0.001$ vs. SHAM). El peso corporal aumentó progresivamente y alcanzó $21.61 \pm 3.1\%$ de ganancia sobre el peso corporal inicial, sin embargo, fue inferior al grupo SHAM ($p < 0.01$). Al día 2 post-TCE, los animales presentaron un NS de 11.29 ± 1.8 ($p < 0.001$ vs. SHAM) que aumentó gradualmente y alcanzó 17.6 ± 1.1 puntos ($p < 0.001$ vs. SHAM) al día 28 post-TCE. Este grupo experimental presentó una tasa de mortalidad del 36% posterior a la inducción del TCE (Tabla 2).

Los animales de los grupos CBD-TCE y CBD-TCE-CBD presentaron cambios en el peso corporal similares al grupo TCE. Sin embargo, el aumento de peso corporal al día 28 después del TCE fue mayor (CBD-TCE, $39.38 \pm 2.7\%$, $p < 0.01$; CBD-TCE-CBD, $27.31 \pm 2.4\%$, $p < 0.05$ vs TCE). Los animales de estos grupos experimentales presentaron una capacidad sensoriomotora menor al día 2 post-TCE (CBD-TCE, 14.1 ± 1.1 puntos, $p < 0.001$; CBD-TCE-CBD, 14.57 ± 1.4 puntos, $p < 0.001$ vs SHAM respectivamente). Estos valores de NS aumentaron gradualmente y, al día 28 post-TCE, fueron más bajos que los obtenidos por el grupo SHAM, pero más altos en comparación con el grupo TCE ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente). En contraste con el grupo TCE, las ratas que recibieron administración de CBD presentaron una tasa de mortalidad más baja en comparación con el grupo sin tratamiento (CBD-TCE, 22 %, $p < 0.01$; CBD-TCE-CBD, 30 %, $p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tratamiento con CBD sobre los cambios inducidos por un TCE severo en el peso corporal, la función sensoriomotora y la mortalidad en ratas al día 28 post-TCE

Grupos (Al inicio del experimento)	Peso en g (% vs basal) (n=7)	Neuroscore (n=7)	Porcentaje de mortalidad (post-TCE)
SHAM (n=8)	401 ± 13.5 (+40.9%) ^{@@@}	26.8 ± 0.4	0%
CBD (n=7)	409 ± 18 (+35.8%) ^{@@@}	26.7 ± 0.4	0%
TCE (n=11)	329 ± 15 ^{##} (+21.6%) ^{@@@}	17.5 ± 1.1 ^{***}	36.3%
CBD-TCE (n=9)	375 ± 15 ^{yy} (+39.3%) ^{@@@}	22.0 ± 0.6 ^{***/ª}	22.2% ^{**}
CBD+TCE+CBD (n=10)	398 ± 24 ^y (+27.3%) ^{@@@}	22.4 ± 0.7 ^{**/ª}	30%

Los valores representan la media ± el error estándar. ^{##}p<0.01 vs. SHAM, ^yp<0.05, ^{yy}p<0.01 vs. grupo TCE ($F_{(4,30)}= 6.956$, $p=0.0004$, ANOVA 1V); ^{@@@}p<0.001 vs. valores basales ($F_{(4, 30)}= 6.848$, $p=0.0005$, ANOVA 2V); ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 vs SHAM, ^ªp<0.05 vs. Grupo TCE ($F_{(4, 30)}= 28.43$, $p<0.0001$, ANOVA 1V); ^{**}p<0.01 (Prueba exacta de Fisher's).

6.2. Discusión

El grupo TCE presentó una recuperación gradual del peso corporal y de la capacidad sensoriomotora sin alcanzar valores similares al grupo control. Nuestros resultados coinciden con lo reportado previamente por Segovia-Oropeza *et al.*, 2020. Adicionalmente, observamos un incremento significativo de la concentración de glutamato a las 4 semanas post-TCE. Respecto a esto, los estudios de evaluación de glutamato por microdiálisis no son tan extensos y se remontan a las primeras horas post-TCE (Faden *et al.*, 1989; de Lima *et al.*, 2014). Sin embargo, sugieren al glutamato como un biomarcador del pronóstico clínico y de muerte cerebral (Stefani *et al.*, 2017). En aquellos sujetos con mayores concentraciones de glutamato la tasa de mortalidad fue mayor y la recuperación funcional a los 6 meses posterior a la lesión fue deficiente (Chamoun *et al.*, 2010). Las concentraciones elevadas al día 30 post-TCE son consistentes con la hipótesis de Cantu *et al.*, 2015. Los autores describieron que la disminución de los transportadores en astrocitos se regula a los 14 días post-TCE. Por consiguiente, el fallo en la recaptura posiblemente no esté implicada en el aumento del glutamato, por lo tanto, sugieren que el aumento del tono excitador se debe a una disfunción

de la red inhibición-excitación (Cantu *et al.*, 2015). Este fenómeno también es consistente con los eventos de hiperexcitabilidad hipocampal in vivo observados a las 4 semanas post-TCE (Segovia-Oropeza *et al.*, 2020). Se ha sugerido que las neuronas sobrevivientes desarrollan un fenotipo excitador como lo observado en células musgosas del hipocampo, las cuales presentan un mayor número de potenciales de acción y despolarizaciones más prolongadas (Santhakumar *et al.*, 2000). Por lo tanto, los niveles elevados de glutamato en este estudio puede ser una consecuencia de los eventos fisiopatológicos subsecuentes a la muerte neuronal aguda.

Por otra parte, la expresión de citocinas proinflamatorias sigue presente 4 semanas post-TCE. Respecto a esto, se describió una inflamación crónica patológica post-TCE. El momento exacto o los factores que implican el cambio de la inflamación reparadora a inflamación patológica aún no está claro. En ratones sometidos a un TCE por el modelo de LLPF se presentó un aumento de la reactividad de los astrocitos en el cuerpo calloso y la corteza parietal 30 días post-TCE. Este aumento se acompañó con un patrón de microglía pre-activada o “preparada” y con una mayor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II. Sugiriendo que la microglía puede ser responsable de mantener, interpretar y propagar la señal inflamatoria post-TCE (Fenn *et al.*, 2014). Adicionalmente, esta microglía “preparada” se describió que reacciona de manera exacerbada a estímulos externos. Ejemplo de ello son los retos inmunológicos con administración de lipopolisacárido, donde esta microglía induce el incremento de citocinas proinflamatorias, preservando la inflamación (Henry *et al.*, 2009). Blaylock y Maroon en el 2011 propusieron la hipótesis de “inmunoexcitotoxicidad” como la causante de la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno, la acumulación de productos de peroxidación de lípidos y la activación de prostaglandinas. En conjunto, todos los procesos antes mencionados conducen a un daño sináptico y mitocondrial que será causante del desarrollo de procesos neurodegenerativos post-TCE (Blaylock y Maroon *et al.*, 2011).

En los resultados de los animales tratados con CBD fue más evidente la recuperación gradual de la capacidad sensoriomotora y de la ganancia de peso corporal. En estos grupos, la recuperación funcional se acompañó con una menor concentración de glutamato extracelular y de citocinas proinflamatorias 4 semanas post-TCE.

Dada la vida media del CBD y a pesar del tratamiento subcrónico, descartamos un efecto *per se* del CBD en la reducción del glutamato y citocinas a las 4 semanas post-TCE. Sin embargo, podemos asociar los efectos en la reducción de glutamato y de citocinas observados en el experimento anterior como un posible efecto neuroprotector a largo plazo. En este sentido, múltiples estudios evalúan tratamientos agudos con resultados favorables a corto y largo plazo aún con la suspensión del tratamiento con CBD. En ratas neonatas (postnatal 7-10) sometidas a hipoxia-isquemia y tratadas con una dosis única de CBD 1 mg/kg sc se observó a las 36 h post-administración una concentración de CBD en el tejido cerebral de 0.6 ± 0.6 ng/g. Las evaluaciones se realizaron al día postnatal 14 y 37. Se demostró que una administración única de CBD condujo a un efecto neuroprotector sostenido con una mejora en la capacidad sensoriomotora, menor volumen de atrofia, así como niveles más bajos de glutamato y TNF- α (Pazos *et al.*, 2012). Estos efectos neuroprotectores a largo plazo pueden asociarse a la preservación de la BHE, menor muerte neuronal al reducir la expresión de proteínas proapoptóticas como BCL-2/Bax y caspasa-3 y al aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa y la catalasa (Khaksar *et al.*, 2022). El CBD también disminuye la disfunción mitocondrial asociada con la neuroinflamación (Majdi *et al.*, 2019). Tomados en conjunto con la reducción de glutamato y de citocinas proinflamatorias se podría explicar la protección a largo plazo encontrado en el presente estudio.

Nosotros esperábamos que al mantener la administración de CBD posterior a la inducción del TCE, la recuperación a largo plazo se favoreciera más que con el pretratamiento solo. Sin embargo, los resultados obtenidos para ambos esquemas son muy similares con una reducción más evidente de las concentraciones de glutamato al día 30 post-TCE en el grupo únicamente pretratado. En relación con esto, en un modelo de convulsiones inducidas con administración de ácido kaínico se encontraron efectos similares a los nuestros cuando se administró CBD como pretratamiento, pero no como pre y post tratamiento. Estos resultados sugieren que los efectos protectores del CBD no son evidentes una vez establecido el daño inicial, probablemente debido a los cambios transduccionales posteriores a la lesión (Victor *et al.*, 2022). Sin embargo, una limitación de este estudio fue no contar con un grupo solo con tratamiento de CBD. Con respecto a esto un estudio previo sugiere que el tratamiento oral con CBD comercial al 10% (dosis exacta no publicada) durante 14 días post-TCE

disminuye la alodinia táctil, las conductas tipo depresivas y restaura la coordinación motora (Belardo *et al.*, 2019). Por lo tanto, se sugiere profundizar en las ventanas de administración del CBD en los modelos de TCE.

Por otra parte, la disminución de la ganancia de peso a largo plazo post-TCE puede ser ocasionada por el daño en los centros de saciedad/hambre, como el hipotálamo ventromedial lateral, así como la expresión disminuida de orexina/hipocretina (Kousi *et al.*, 2021), una hormona que regula procesos nutricionales y la ingesta (Mediavilla *et al.*, 2020). Nuestros resultados respaldan que el tratamiento oral con CBD facilita la recuperación del aumento de peso corporal después de un TCE. En este sentido, el tratamiento crónico con CBD aumentó la ganancia de peso corporal en un modelo de depresión en ratas (Gáll *et al.*, 2020). De manera similar, en un modelo de diabetes en ratones, el CBD mejoró el aumento de peso e indujo efectos ansiolíticos. Estos efectos se acompañaron con una disminución de la hiperglucemia y con un aumento de la insulina plasmática (Chaves *et al.*, 2020). Por otro lado, observamos una recuperación de la capacidad sensoriomotora mejorada con el tratamiento de CBD. Previamente se demostró que la administración dual de CBD a través de dos vías (sitio de la lesión y sistémica) mejoró el aprendizaje, la memoria y las funciones vestibulo-motoras a largo plazo post-TCE. Estos efectos se asociaron con una disminución del volumen de la lesión y pérdida neuronal (Friedman *et al.*, 2021). Por tanto, no podemos descartar que el CBD posiblemente este mejorando la viabilidad neuronal. Una mayor preservación celular reflejaría menor atrofia cerebral y por consecuencia recuperación de las consecuencias funcionales observadas en este estudio.

Finalmente, el aceite de CBD evaluado en este trabajo contiene una baja concentración (0.65%) de Cannabidivarina (CBDV). La CBDV es un fitocannabinoide detectado en diferentes aceites de cáñamo (Citti *et al.*, 2018). La administración oral con CBDV a dosis de 400 mg/kg demostró efectos anticonvulsivos en un modelo animal de convulsiones (Amada *et al.*, 2013). Sin embargo, la CBDV presenta una baja absorción y una alta interacción con enzimas metabólicas, que resultan en una baja biodisponibilidad (Zamberletti *et al.*, 2021). De acuerdo con lo anterior, podemos descartar que los efectos observados en este estudio no son el resultado de la administración concomitante con CBDV.

7. Conclusiones

De los resultados obtenidos se desprende la siguiente conclusión:

La administración de CBD disminuye el aumento en la concentración extracelular glutamato y citocinas proinflamatorias a corto y largo plazo después de un TCE severo, efectos asociados con la mejora en la capacidad sensoriomotora y la ganancia de peso corporal, así como una menor mortalidad. Estudios futuros son esenciales para dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales el CBD ejerce estos efectos.

Nuestros resultados sugieren un efecto neuroprotector del CBD posterior al TCE. Este efecto neuroprotector puede ser una estrategia terapéutica para poblaciones de alto riesgo a TCE, como personal militar y deportes de contacto. A futuro, será interesante determinar si la neuroprotección del CBD es suficiente para prevenir el desarrollo de trastornos subsecuentes al trauma como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la epilepsia postraumática, entre otras.

8. Perspectivas

El presente trabajo demuestra que el CBD disminuye las concentraciones de glutamato y citocinas proinflamatorias a corto y largo plazo acompañado con una recuperación funcional mejorada post-TCE. En este sentido se mencionarán algunas perspectivas que derivan de esta investigación:

- Dada la relevancia de los efectos encontrados con el pretratamiento con CBD, se propone estudiar este efecto en un modelo de inducción de TCE leves de forma repetida, para brindar información más cercana sobre los efectos del CBD en estos tipos de eventos.
- Es necesario comprobar si el CBD es neuroprotector en los modelos de TCE. Por lo que estudios futuros deben investigar si el CBD mejora la viabilidad neuronal, esto se puede realizar con estudios inmunohistoquímicos de las diferentes estructuras cerebrales.
- Como se observó, la ventana terapéutica y la dosis influyeron en los efectos del CBD. Por lo anterior, se plantea determinar las concentraciones de CBD que llegan al SNC después de los diferentes esquemas de tratamiento. Esto permitirá asociar los posibles mecanismos que pueden estar regulando cada uno de los efectos y facilitará el uso de agonistas o antagonistas dependiendo de los receptores que pueden afectarse por las concentraciones específicas de CBD.
- Finalmente, aunque la literatura actual sugiere que el CBD presenta una baja toxicidad, es importante determinar los efectos adversos de la administración subcrónica o crónica con CBD, para considerarlo como tratamiento para poblaciones susceptibles a TCE.

9. Referencias

- Abbotts KSS, Ewell TR, Butterklee HM, Bomar MC, Akagi N, Dooley GP, Bell C. Cannabidiol and Cannabidiol Metabolites: Pharmacokinetics, Interaction with Food, and Influence on Liver Function. *Nutrients*. 2022 May 21;14(10):2152.
- Abu-Sawwa R, Scutt B, Park Y. Emerging Use of Epidiolex (Cannabidiol) in Epilepsy. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2020;25(6):485-499.
- Alvarez, F.J.; Lafuente, H.; Rey-Santano, M.C.; Mielgo, V.E.; Gastiasoro, E.; Rueda, M.; Martínez-Orgado, J. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr. Res*. 2008, 64, 653–658.
- Alves, F.H.; Crestani, C.C.; Gomes, F.V.; Guimarães, F.S.; Correa, F.M.; Resstel, L.B. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex activity through 5-HT1A receptors. *Pharmacol. Res*. 2010, 62, 228–236.
- Anderzhanova E, Wotjak CT. Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry. *Cell Tissue Res*. 2013 Oct;354(1):27-39.
- Armada-Moreira A, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Gonçalves-Ribeiro J, Rei N, Pinto S, Morais TP, Martins RS, Ribeiro FF, Sebastião AM, Crunelli V, Vaz SH. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*. 2020 Apr 24;14:90.
- Bano, D.; Ankarcrona, M. Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. *Neurosci. Lett*. 2018, 663, 79–85.
- Barata L, Arruza L, Rodríguez MJ, Aleo E, Vierge E, Criado E, Sobrino E, Vargas C, Ceprián M, Gutiérrez-Rodríguez A, Hind W, Martínez-Orgado J. Neuroprotection by cannabidiol and hypothermia in a piglet model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2019 Mar 1;146:1-11.
- Barnes DE, Byers AL, Gardner RC, Seal KH, Boscardin WJ, Yaffe K. Association of Mild Traumatic Brain Injury With and Without Loss of Consciousness With Dementia in US Military Veterans. *JAMA Neurol*. 2018 Sep 1;75(9):1055-1061.
- Belardo C, Iannotta M, Boccella S, Rubino RC, Ricciardi F, Infantino R, Pieretti G, Stella L, Paino S, Marabese I, Maisto R, Luongo L, Maione S, Guida F. Oral Cannabidiol Prevents Allodynia and Neurological Dysfunctions in a Mouse Model of Mild Traumatic Brain Injury. *Front Pharmacol*. 2019 Apr 16;10:352.
- Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021 May;18(5):1106-1121.
- Bisogno, T.; Hanus, L.; De Petrocellis, L.; Tchilibon, S.; Ponde, D.E.; Brandi, I.; Moriello, A.S.; Davis, J.B.; Mechoulam, R.; Di Marzo, V. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol*. 2001, 134, 845–852.
- Blaylock, R.L.; Maroon, J. Immunoexcitotoxicity as a central mechanism in chronic traumatic encephalopathy—A unifying hypothesis. *Surg. Neurol. Int*. 2011, 2, 107.
- Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, Levin H, McKee A, Ribbers GM, Yaffe K, Zetterberg H. Traumatic brain injuries. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Nov 17;2:16084.
- Blixt J, Svensson M, Gunnarson E, Wanecek M. Aquaporins and blood-brain barrier permeability in early edema development after traumatic brain injury. *Brain Res*. 2015 Jun 22;1611:18-28.

- Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA. The effect of cannabidiol on mouse hepatic microsomal cytochrome P450-dependent anandamide metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Dec 15;197(2):740-6.
- Bray CE, Witcher KG, Adekunle-Adegbite D, Ouvina M, Witzel M, Hans E, Tapp ZM, Packer J, Goodman E, Zhao F, Chunchai T, O'Neil S, Chattipakorn SC, Sheridan J, Kokiko-Cochran ON, Askwith C, Godbout JP. Chronic Cortical Inflammation, Cognitive Impairment, and Immune Reactivity Associated with Diffuse Brain Injury Are Ameliorated by Forced Turnover of Microglia. *J Neurosci.* 2022 May 18;42(20):4215-4228.
- Bye N, Habgood MD, Callaway JK, Malakooti N, Potter A, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp Neurol.* 2007 Mar;204(1):220-33.
- Byrnes KR, Faden AI. Role of cell cycle proteins in CNS injury. *Neurochem Res.* 2007 Oct;32(10):1799-807.
- Cantu, D.; Walker, K.; Andresen, L.; Taylor-Weiner, A.; Hampton, D.; Tesco, G.; Dulla, C.G. Traumatic brain injury increases cortical glutamate network activity by compromising GABAergic control. *Cereb. Cortex* 2015, 25, 2306–2320.
- Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Med Clin North Am.* 2020 Mar;104(2):213-238.
- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 16;103(20):7895-900.
- Casault C, Al Sultan AS, Banoei M, Couillard P, Kramer A, Winston BW. Cytokine Responses in Severe Traumatic Brain Injury: Where There Is Smoke, Is There Fire? *Neurocrit Care.* 2019 Feb;30(1):22-32. doi: 10.1007/s12028-018-0522-z. PMID: 29569129.
- Cassol, O.J., Jr.; Comim, C.M.; Silva, B.R.; Hermani, F.V.; Constantino, L.S.; Felisberto, F.; Petronilho, F.; Hallak, J.E.; De Martinis, B.S.; Zuardi, A.W.; *et al.* Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res.* 2010, 1348, 128–138.
- Castillo, A.; Tolón, M.R.; Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Martínez-Orgado, J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an *in vitro* model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol. Dis.* 2010, 37, 434–440.
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Injury Prevention and Control. Report to Congress on traumatic brain injury in the United States: Epidemiology and rehabilitation.pdf icon. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2015.
- Chamoun R, Suki D, Gopinath SP, Goodman JC, Robertson C. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2010 Sep;113(3):564-70.
- Chaves, Y.C.; Genaro, K.; Stern, C.A.; de Oliveira Guaita, G.; de Souza Crippa, J.A.; da Cunha, J.M.; Zanoveli, J.M. Two-weeks treatment with cannabidiol improves biophysical and behavioral deficits associated with experimental type-1 diabetes. *Neurosci. Lett.* 2020, 729, 135020.
- Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS. Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci.* 2009 Apr;Chapter 7:Unit7.1.

- Chen J, Hou C, Chen X, Wang D, Yang P, He X, Zhou J, Li H. Protective effect of cannabidiol on hydrogen peroxide-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus cells. *Mol Med Rep.* 2016 Sep;14(3):2321-7.
- Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol.* 2012 Oct;167(4):699-719.
- Cheng, X.; Wang, J.; Sun, X.; Shao, L.; Guo, Z.; Li, Y. Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury. *J. Integr. Neurosci.* 2019, 18, 203–215.
- Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res.* 2011 Dec;2(4):492-516.
- Choi DW. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res.* 1994;100:47-51.
- Citti, C.; Pacchetti, B.; Vandelli, M.A.; Forni, F.; Cannazza, G. Analysis of cannabinoids in commercial hemp seed oil and decarboxylation kinetics studies of cannabidiolic acid (CBDA). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 149, 532–540.
- Clark RS, Bayir H, Chu CT, Alber SM, Kochanek PM, Watkins SC. Autophagy is increased in mice after traumatic brain injury and is detectable in human brain after trauma and critical illness. *Autophagy.* 2008 Jan;4(1):88-90.
- Consroe, P., Kennedy, K., and Schram, K. (1991). Assay of plasma cannabidiol by capillary gas chromatography/ion trap mass spectroscopy following high-dose repeated daily oral administration in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40, 517–522.
- Cooper AJ, Jeitner TM. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules.* 2016 Mar 26;6(2):16.
- Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Mar;369(3):294-9.
- Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology.* 1980;21(3):175-85.
- Cushing, D., *et al.* Measuring the bioactivity of phytocannabinoid cannabidiol from cannabis sources, and a novel non-cannabis source. *Journal of Medical Phyto Research* ISSN, 2018, vol. 1, no 2, p. 8-23.
- Dash HH, Chavali S. Management of traumatic brain injury patients. *Korean J Anesthesiol.* 2018 Feb;71(1):12-21.
- De Filippis D, Esposito G, Cirillo C, Cipriano M, De Winter BY, Scuderi C, Sarnelli G, Cuomo R, Steardo L, De Man JG, Iuvone T. Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One.* 2011;6(12):e28159.
- de Lima Oliveira M, Kairalla AC, Fonoff ET, Martinez RC, Teixeira MJ, Bor-Seng-Shu E. Cerebral microdialysis in traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage: state of the art. *Neurocrit Care.* 2014 Aug;21(1):152-62.
- Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Ligresti, A.; Bisogno, T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 2002, 66, 377–391.

- Diaz-Arrastia R, Kochanek PM, Bergold P, Kenney K, Marx CE, Grimes CJ, Loh LT, Adam LT, Oskvig D, Curley KC, Salzer W. Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup. *J Neurotrauma*. 2014 Jan 15;31(2):135-58.
- Dopkins N, Miranda K, Wilson K, Holloman BL, Nagarkatti P, Nagarkatti M. Effects of Orally Administered Cannabidiol on Neuroinflammation and Intestinal Inflammation in the Attenuation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021 Nov 10.
- El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S, Abou-Mohamed G, Tsai NJ, Roon P, Caldwell RB, Caldwell RW, Green K, Liou GI. Neuroprotective effect of (-)Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol*. 2003 Nov;163(5):1997-2008.
- Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, Cipriano M, Carratù MR, Iuvone T, Steardo L. Cannabidiol reduces A β -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One*. 2011;6(12):e28668.
- Faden, A., Demediuk, P., Panter, S. y Vink, R. (1989). El papel de los aminoácidos excitadores y los receptores NMDA en la lesión cerebral traumática. *Science*, 244 (4906), 798–800.
- Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK. Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Mar;36(2):287-91.
- Fenn AM, Gensel JC, Huang Y, Popovich PG, Lifshitz J, Godbout JP. Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: a role for primed microglia. *Biol Psychiatry*. 2014 Oct 1;76(7):575-84.
- Ferreira RS, Teles-Souza J, Dos Santos Souza C, Pereira ÉPL, de Araújo FM, da Silva AB, Castro E Silva JH, Nonose Y, Núñez-Figueredo Y, de Assis AM, Souza DO, Costa MFD, Moreira JCF, Costa SL, da Silva VDA. Rutin improves glutamate uptake and inhibits glutamate excitotoxicity in rat brain slices. *Mol Biol Rep*. 2021 Feb;48(2):1475-1483.
- Fogaça MV, Campos AC, Coelho LD, Duman RS, Guimarães FS. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology*. 2018 Jun;135:22-33.
- Folkersma H, Brevé JJ, Tilders FJ, Cherian L, Robertson CS, Vandertop WP. Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1beta and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats. *Acta Neurochir (Wien)*. 2008 Dec;150(12):1277-84; discussion 1284.
- Folkersma H, Foster Dingley JC, van Berckel BN, Rozemuller A, Boellaard R, Huisman MC, Lammertsma AA, Vandertop WP, Molthoff CF. Increased cerebral (R)-[(11)C]PK11195 uptake and glutamate release in a rat model of traumatic brain injury: a longitudinal pilot study. *J Neuroinflammation*. 2011 Jun 14;8:67.
- Frías-Soria CL, Pérez-Pérez D, Orozco-Suárez S, Rocha L. Cannabidiol modifies the seizure expression and effects of antiseizure drugs in a rat model of recurrent severe seizures. *Seizure*. 2021 Aug; 90:67-73.
- Friedman LK, Peng H, Zeman RJ. Cannabidiol reduces lesion volume and restores vestibulomotor and cognitive function following moderately severe traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2021 Dec;346:113844.

- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004 Jul;28(4):365-78.
- Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao LR. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell Transplant.* 2017 Jul;26(7):1118-1130.
- Gáll, Z.; Farkas, S.; Albert, Á.; Ferencz, E.; Vancea, S.; Urkon, M.; Kolcsár, M. Effects of chronic cannabidiol treatment in the rat chronic unpredictable mild stress model of depression. *Biomolecules* 2020, 10, 801.
- Gallo V, Ghiani CA. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Jul;21(7):252-8.
- Gamble LJ, Boesch JM, Frye CW, Schwark WS, Mann S, Wolfe L, Brown H, Berthelsen ES, Wakshlag JJ. Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Front Vet Sci.* 2018 Jul 23;5:165.
- Gardner RC, Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci.* 2015 May;66(Pt B):75-80.
- Gerbatin RDR, Cassol G, Dobrachinski F, Ferreira APO, Quines CB, Pace IDD, Busanello GL, Gutierrez JM, Nogueira CW, Oliveira MS, Soares FA, Morsch VM, Figuera MR, Royes LFF. Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. *Mol Neurobiol.* 2017 Dec;54(10):7585-7596.
- Ghovanloo MR, Choudhury K, Bandaru TS, Fouda MA, Rayani K, Rusinova R, Phaterpekar T, Nelkenbrecher K, Watkins AR, Poburko D, Thewalt J, Andersen OS, Delemotte L, Goodchild SJ, Ruben PC. Cannabidiol inhibits the skeletal muscle Nav1.4 by blocking its pore and by altering membrane elasticity. *J Gen Physiol.* 2021 May 3;153(5):e202012701.
- Globus, M.Y.; Alonso, O.; Dietrich, W.D.; Busto, R.; Ginsberg, M.D. Glutamate release and free radical production following brain injury: Effects of posttraumatic hypothermia. *J. Neurochem.* 1995, 65, 1704–1711.
- Gobira PH, Vilela LR, Gonçalves BD, Santos RP, de Oliveira AC, Vieira LB, Aguiar DC, Crippa JA, Moreira FA. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. *Neurotoxicology.* 2015 Sep;50:116-21.
- Golarai G, Greenwood AC, Feeney DM, Connor JA. Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J Neurosci.* 2001 Nov 1;21(21):8523-37.
- Gordon EM, Scheibel RS, Zambrano-Vazquez L, Jia-Richards M, May GJ, Meyer EC, Nelson SM. High-Fidelity Measures of Whole-Brain Functional Connectivity and White Matter Integrity Mediate Relationships between Traumatic Brain Injury and Post-Traumatic Stress Disorder Symptoms. *J Neurotrauma.* 2018 Mar 1;35(5):767-779.
- Guimarães FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl).* 1990;100(4):558-9.
- Haarbauer-Krupa J, Pugh MJ, Prager EM, Harmon N, Wolfe J, Yaffe K. Epidemiology of Chronic Effects of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2021 Dec;38(23):3235-3247.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):8268-73.

- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8268-73.
- Hampton T. Traumatic brain injury a growing problem among troops serving in today's wars. *JAMA*. 2011 Aug 3;306(5):477-9.
- Hayes JP, Bigler ED, Verfaellie M. Traumatic Brain Injury as a Disorder of Brain Connectivity. *J Int Neuropsychol Soc*. 2016 Feb;22(2):120-37.
- He J, Evans CO, Hoffman SW, Oyesiku NM, Stein DG. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2004 Oct;189(2):404-12.
- Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*. 2009 Mar;23(3):309-17.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res*. 1999 Aug 15;57(4):417-28.
- Hobbs JM, Vazquez AR, Remijan ND, Trotter RE, McMillan TV, Freedman KE, Wei Y, Woelfel KA, Arnold OR, Wolfe LM, Johnson SA, Weir TL. Evaluation of pharmacokinetics and acute anti-inflammatory potential of two oral cannabidiol preparations in healthy adults. *Phytother Res*. 2020 Jul;34(7):1696-1703.
- Holmin S, Höjeberg B. In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neurosci Lett*. 2004 Oct 14;369(2):108-14.
- Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(3):153-9.
- Huang CW, Lin PC, Chen JL, Lee MJ. Cannabidiol Selectively Binds to the Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.4 in Its Slow-Inactivated State and Inhibits Sodium Current. *Biomedicines*. 2021 Sep 2;9(9):1141.
- Huerta de la Cruz S, Rocha L, Santiago-Castañeda C, Sánchez-López A, Pinedo-Rodríguez AD, Medina-Terol GJ, Centurión D. Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition. *J Neurotrauma*. 2022 Jan;39(1-2):181-195.
- Humphreys I, Wood RL, Phillips CJ, Macey S. The costs of traumatic brain injury: a literature review. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2013 Jun 26;5:281-7.
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem*. 2004 Apr;89(1):134-41.
- Jiang, H.; Li, H.; Cao, Y.; Zhang, R.; Zhou, L.; Zhou, Y.; Zeng, X.; Wu, J.; Wu, D.; Wu, D.; *et al*. Effects of cannabinoid (CBD) on blood-brain barrier permeability after brain injury in rats. *Brain Res*. 2021, 1768, 147586.
- Jolly AE, Bălăeț M, Azor A, Friedland D, Sandrone S, Graham NSN, Zimmerman K, Sharp DJ. Detecting axonal injury in individual patients after traumatic brain injury. *Brain*. 2021 Feb 12;144(1):92-113.
- Jones, N.A.; Glyn, S.E.; Akiyama, S.; Hill, T.D.; Hill, A.J.; Weston, S.E.; Burnett, M.D.; Yamasaki, Y.; Stephens, G.J.; Whalley, B.J.; *et al*. Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure* 2012, 21, 344–352.

- Jorge RE, Robinson RG, Moser D, Tateno A, Crespo-Facorro B, Arndt S. Major depression following traumatic brain injury. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Jan;61(1):42-50.
- Kabadi SV, Faden AI. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *Int J Mol Sci*. 2014 Jan 17;15(1):1216-36.
- Kaplan GB, Leite-Morris KA, Wang L, Rumbika KK, Heinrichs SC, Zeng X, Wu L, Arena DT, Teng YD. Pathophysiological Bases of Comorbidity: Traumatic Brain Injury and Post-Traumatic Stress Disorder. *J Neurotrauma*. 2018 Jan 15;35(2):210-225.
- Kelley BJ, Lifshitz J, Povlishock JT. Neuroinflammatory responses after experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 Nov;66(11):989-1001.
- Keren O, Reznik J, Groswasser Z. Combined motor disturbances following severe traumatic brain injury: an integrative long-term treatment approach. *Brain Inj*. 2001 Jul;15(7):633-8.
- Khaksar S, Bigdeli MR. Intra-cerebral cannabidiol infusion-induced neuroprotection is partly associated with the TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway in transient focal cerebral ischaemia. *Brain Inj*. 2017;31(13-14):1932-1943.
- Khaksar, S.; Bigdeli, M.; Samiee, A.; Shirazi-Zand, Z. Antioxidant and anti-apoptotic effects of cannabidiol in model of ischemic stroke in rats. *Brain Res. Bull.* 2022, 180, 118–130.
- Khaksar, S.; Bigdeli, M.R. Anti-excitotoxic effects of cannabidiol are partly mediated by enhancement of NCX2 and NCX3 expression in animal model of cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 2017a, 794, 270–279.
- Khayatan D, Razavi SM, Arab ZN, Niknejad AH, Nouri K, Momtaz S, Gumpricht E, Jamialahmadi T, Abdolghaffari AH, Barreto GE, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against traumatic brain injury. *Biomed Pharmacother.* 2022 Oct; 154:113621.
- Kierans AS, Kirov II, Gonen O, Haemer G, Nisenbaum E, Babb JS, Grossman RI, Lui YW. Myoinositol and glutamate complex neurometabolite abnormality after mild traumatic brain injury. *Neurology*. 2014 Feb 11;82(6):521-8.
- Kinnunen KM, Greenwood R, Powell JH, Leech R, Hawkins PC, Bonnelle V, Patel MC, Counsell SJ, Sharp DJ. White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain*. 2011 Feb;134(Pt 2):449-63.
- Kousi, C.; Lampri, E.; Voulgaris, S.; Vougiouklakis, T.; Galani, V.; Mitselou, A. Expression of orexin-A (hypocretin-A) in the hypothalamus after traumatic brain injury: A postmortem evaluation. *Forensic Sci. Int.* 2021, 327, 110961.
- KPMG, 2017. La industria farmacéutica mexicana, Actualidades., p.19. Available at: <http://www.consultatlcans.senado.gob.mx/docs/farmaceutica.pdf>
- Krakau K, Omne-Pontén M, Karlsson T, Borg J. Metabolism and nutrition in patients with moderate and severe traumatic brain injury: A systematic review. *Brain Inj*. 2006 Apr;20(4):345-67.
- Kreutzer JS, Seel RT, Gourley E. The prevalence and symptom rates of depression after traumatic brain injury: a comprehensive examination. *Brain Inj*. 2001 Jul;15(7):563-76.
- Kumar, V., Rosenzweig, R., Asalla, S., Nehra, S., Prabhu, S. D., y Bansal, S. S. (2022). TNF receptor 1 contributes to activation-induced cell death of pathological CD4+ T lymphocytes during ischemic heart failure. *JACC: Basic to Translational Science*.
- Lazarevic V, Yang Y, Flais I, Svenningsson P. Ketamine decreases neuronally released glutamate via retrograde stimulation of presynaptic adenosine A1 receptors. *Mol Psychiatry*. 2021 Dec;26(12):7425-7435.

- Levin, R.; Peres, F.F.; Almeida, V.; Calzavara, M.B.; Zuardi, A.W.; Hallak, J.E.; Crippa, J.A.; Abílio, V.C. Effects of cannabinoid drugs on the deficit of prepulse inhibition of startle in an animal model of schizophrenia: The SHR strain. *Front. Pharmacol.* 2014, 5, 10.
- Li, H., Kong, W., Chambers, C. R., Yu, D., Ganea, D., Tuma, R. F., y Ward, S. J. (2018). The non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol (CBD) attenuates pro-inflammatory mediators, T cell infiltration, and thermal sensitivity following spinal cord injury in mice. *Cellular immunology*, 329, 1-9.
- Liu T, Zhao DX, Cui H, Chen L, Bao YH, Wang Y, Jiang JY. Therapeutic hypothermia attenuates tissue damage and cytokine expression after traumatic brain injury by inhibiting necroptosis in the rat. *Sci Rep.* 2016 Apr 15;6:24547.
- Loane DJ, Faden AI. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci.* 2010 Dec;31(12):596-604.
- Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Oct;12(10):757-76.
- Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci.* 1992 Dec;12(12):4846-53.
- Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, de la Pena I, Tajiri N, Kaneko Y, Borlongan CV. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015 Jan 8;11:97-106.
- Lusardi, T.A.; Lytle, N.K.; Szybala, C.; Boison, D. Caffeine prevents acute mortality after TBI in rats without increased morbidity. *Exp. Neurol.* 2012, 234, 161–168.
- Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008 Aug;7(8):728-41.
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol.* 2010 Feb;159(4):950-7.
- Magid L, Heymann S, Elgali M, Avram L, Cohen Y, Liraz-Zaltsman S, Mechoulam R, Shohami E. Role of CB2 Receptor in the Recovery of Mice after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2019 Jun;36(11):1836-1846.
- Maidment NT, Brumbaugh DR, Rudolph VD, Erdelyi E, Evans CJ. Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience.* 1989;33(3):549-57.
- Majdi, F.; Taheri, F.; Salehi, P.; Motaghinejad, M.; Safari, S. Cannabinoids Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol may be effective against methamphetamine induced mitochondrial dysfunction and inflammation by modulation of Toll-like type-4(Toll-like 4) receptors and NF- κ B signaling. *Med. Hypotheses* 2019, 133, 109371.
- Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hancein-Bey L. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001 Nov-Dec;22(10):1813-24.
- Maroon J, Bost J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surg Neurol Int.* 2018 Apr 26;9:91.
- Martínez-Aguirre, C.; Carmona-Cruz, F.; Velasco, A.L.; Velasco, F.; Aguado-Carrillo, G.; Cuéllar-Herrera, M.; Rocha, L. Cannabidiol acts at 5-HT1A receptors in the human brain: Relevance for treating temporal lobe epilepsy. *Front. Behav. Neurosci.* 2020, 14, 611278.

- Masel, B. E., y DeWitt, D. S. (2010). Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of neurotrauma*, 27(8), 1529-1540.
- Massi P, Valenti M, Vaccani A, Gasperi V, Perletti G, Marras E, Fezza F, Maccarrone M, Parolaro D. 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem*. 2008 Feb;104(4):1091-100.
- McAllister TW. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(3):287-300.
- McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1987;4(2):119-34.
- Mediavilla, C. Bidirectional gut-brain communication: A role for orexin-A. *Neurochem. Int*. 2020, 141, 104882.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*. 2000 Apr;130(4S Suppl):1007S-15S.
- Millar SA, Stone NL, Yates AS, O'Sullivan SE. A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. *Front Pharmacol*. 2018 Nov 26;9:1365.
- Mkrtchyan, G.V.; Üçal, M.; Müllebner, A.; Dumitrescu, S.; Kames, M.; Moldzio, R.; Molcanyi, M.; Schaefer, S.; Weidinger, A.; Schaefer, U.; *et al*. Thiamine preserves mitochondrial function in a rat model of traumatic brain injury, preventing inactivation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 2018, 1859, 925–931.
- Mlost J, Bryk M, Starowicz K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 23;21(22):8870.
- Moore CF, Weerts EM. Cannabinoid tetrad effects of oral Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) in male and female rats: sex, dose-effects and time course evaluations. *Psychopharmacology (Berl)*. 2022 May;239(5):1397-1408.
- Morganti-Kossmann MC, Semple BD, Hellewell SC, Bye N, Ziebell JM. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol*. 2019 May;137(5):731-755.
- Mouzon BC, Bachmeier C, Ojo JO, Acker CM, Ferguson S, Paris D, Ait-Ghezala G, Crynen G, Davies P, Mullan M, Stewart W, Crawford F. Lifelong behavioral and neuropathological consequences of repetitive mild traumatic brain injury. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017 Dec 14;5(1):64-80.
- Mrak RE, Griffin WS. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001 Nov-Dec;22(6):903-8.
- Najjar S, Pearlman D, Miller DC, Devinsky O. Refractory epilepsy associated with microglial activation. *Neurologist*. 2011 Sep;17(5):249-54. doi: 10.1097/NRL.0b013e31822aad04. PMID: 21881466.
- Nedelescu H, Wagner GE, De Ness GL, Carroll A, Kerr TM, Wang J, Zhang S, Chang S, Than AH, Emerson NE, Suto N, Weiss F. Cannabidiol Produces Distinct U-Shaped Dose-Response Effects on Cocaine-Induced Conditioned Place Preference and Associated Recruitment of Prelimbic Neurons in Male Rats. *Biol Psychiatry Glob Open Sci*. 2022 Jan;2(1):70-78.
- Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front Cell Neurosci*. 2019 Nov 27;13:528.

- Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969 May 9;164(3880):719-21.
- Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery*. 2005 Jul;57(1):128-34; discussion 128-34.
- Ontiveros, Á., Preciado, A. K., Matute Villaseñor, E., López-Cruz, M., y López-Elizalde, R. (2014). Factores pronósticos de recuperación y reinserción laboral en adultos con traumatismo craneoencefálico. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 15(4), 211–217.
- O'Sullivan SE, Sun Y, Bennett AJ, Randall MD, Kendall DA. Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jun 10;612(1-3):61-8.
- Owens PW, Lynch NP, O'Leary DP, Lowery AJ, Kerin MJ. Six-year review of traumatic brain injury in a regional trauma unit: demographics, contributing factors and service provision in Ireland. *Brain Inj*. 2018;32(7):900-906.
- Palmer, A.M.; Marion, D.W.; Botscheller, M.L.; Swedlow, P.E.; Styren, S.D.; DeKosky, S.T. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J. Neurochem*. 1993, 61, 2015–2024.
- Pazos, M. R., Cinquina, V., Gómez, A., Layunta, R., Santos, M., Fernández-Ruiz, J., y Martínez-Orgado, J. (2012). Cannabidiol administration after hypoxia–ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology*, 63(5), 776-783.
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, Hidalgo J. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*. 1999 Feb 15;25(4):343-57. PMID: 10028917.
- Perel P, Yanagawa T, Bunn F, Roberts I, Wentz R, Pierro A. Nutritional support for head-injured patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Oct 18;2006(4):CD001530.
- Perez E, Ceja-Vega J, Krmic M, Gamez Hernandez A, Gudyka J, Porteus R, Lee S. Differential Interaction of Cannabidiol with Biomembranes Dependent on Cholesterol Concentration. *ACS Chem Neurosci*. 2022 Apr 6;13(7):1046-1054.
- Peskind ER, Brody D, Cernak I, McKee A, Ruff RL. Military- and sports-related mild traumatic brain injury: clinical presentation, management, and long-term consequences. *J Clin Psychiatry*. 2013 Feb;74(2):180-8; quiz 188.
- Peskind ER, Petrie EC, Cross DJ, Pagulayan K, McCraw K, Hoff D, Hart K, Yu CE, Raskind MA, Cook DG, Minoshima S. Cerebrocerebellar hypometabolism associated with repetitive blast exposure mild traumatic brain injury in 12 Iraq war Veterans with persistent post-concussive symptoms. *Neuroimage*. 2011 Jan;54 Suppl 1(Suppl 1):S76-82.
- Pinheiro, J.L., R. A. y P. J. (2018). Traumatic Brain Injury and Branched-Chain Amino Acids. *Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 2–5.
- Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, Abate M, Faggiana G, Proto MC, Fiore D, Laezza C, Bifulco M. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol Ther*. 2017 Jul;175:133-150.
- Pruessner, J. C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., y Hellhammer, D. H. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology*, 28(7), 916-931.
- Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, Gentleman S, Heckemann RA, Gunanayagam K, Gelosa G, Sharp DJ. Inflammation after

- trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 2011 Sep;70(3):374-83.
- Rao VL, Başkaya MK, Doğan A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem.* 1998 May;70(5):2020-7.
 - Rong C, Lee Y, Carmona NE, Cha DS, Ragggett RM, Rosenblat JD, Mansur RB, Ho RC, McIntyre RS. Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. *Pharmacol Res.* 2017 Jul;121:213-218.
 - Rosenthal M, Christensen BK, Ross TP. Depression following traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998 Jan;79(1):90-103.
 - Russo, E.B.; Burnett, A.; Hall, B.; Parker, K.K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem. Res.* 2005, 30, 1037–1043. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>.
 - Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 2007 Dec;152(7):1092-101. doi: 10.1038/sj.bjp.0707460. Epub 2007 Sep 17. PMID: 17876302; PMCID: PMC2095107.
 - Samini F, Samarghandian S, Borji A, Mohammadi G, bakaian M. Curcumin pretreatment attenuates brain lesion size and improves neurological function following traumatic brain injury in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013 Sep;110:238-44.
 - Santhakumar V, Bender R, Frotscher M, Ross ST, Hollrigel GS, Toth Z, Soltesz I. Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: the 'irritable mossy cell' hypothesis. *J Physiol.* 2000 Apr 1;524 Pt 1(Pt 1):117-34.
 - Santiago-Castañeda, C.; Segovia-Oropeza, M.; Concha, L.; Orozco-Suárez, S.A.; Rocha, L. Propylparaben reduces the long-term consequences in hippocampus induced by traumatic brain injury in rats: Its implications as therapeutic strategy to prevent neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 2021, 82, S215–S226.
 - Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv Neurobiol.* 2014;11:13-30.
 - Schousboe A. Metabolic signaling in the brain and the role of astrocytes in control of glutamate and GABA neurotransmission. *Neurosci Lett.* 2019 Jan 10;689:11-13.
 - Secondo, A.; Staiano, R.I.; Scorziello, A.; Sirabella, R.; Boscia, F.; Adornetto, A.; Valsecchi, V.; Molinaro, P.; Canzoniero, L.M.; Di Renzo, G.; *et al.* BHK cells transfected with NCX3 are more resistant to hypoxia followed by reoxygenation than those transfected with NCX1 and NCX2: Possible relationship with mitochondrial membrane potential. *Cell Calcium* 2007, 42, 521–535.
 - Segovia-Oropeza M, Santiago-Castañeda C, Orozco-Suárez SA, Concha L, Rocha L. Sodium Cromoglycate Decreases Sensorimotor Impairment and Hippocampal Alterations Induced by Severe Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma.* 2020 Dec 1;37(23):2595-2603.
 - Sellmann, T.; Miersch, D.; Kienbaum, P. The impact of arterial hypertension on polytrauma and traumatic brain injury. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2012, 109, 849–856.
 - Shultz SR, Cardamone L, Liu YR, Hogan RE, Maccotta L, Wright DK, Zheng P, Koe A, Gregoire MC, Williams JP, Hicks RJ, Jones NC, Myers DE, O'Brien TJ, Bouillere V. Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia.* 2013 Jul;54(7):1240-50.

- Shumskaya E, Andriessen TM, Norris DG, Vos PE. Abnormal whole-brain functional networks in homogeneous acute mild traumatic brain injury. *Neurology*. 2012 Jul 10;79(2):175-82.
- Shutter, L.; Tong, K.A.; Holshouser, B.A. Proton MRS in acute traumatic brain injury: Role for glutamate/glutamine and choline for outcome prediction. *J. Neurotrauma* 2004, 21, 1693–1705.
- Silverstein, F.S.; Naik, B.; Simpson, J. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: An in vivo microdialysis study. *Pediatr. Res.* 1991, 30, 587–590.
- Smith DH, Chen XH, Pierce JE, Wolf JA, Trojanowski JQ, Graham DI, McIntosh TK. Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *J Neurotrauma*. 1997 Oct;14(10):715-27.
- Smith DH, Nonaka M, Miller R, Leoni M, Chen XH, Alsup D, Meaney DF. Immediate coma following inertial brain injury dependent on axonal damage in the brainstem. *J Neurosurg*. 2000 Aug;93(2):315-22.
- Smith, D.H.; Nonaka, M.; Miller, R.; Leoni, M.; Chen, X.H.; Alsup, D.; Meaney, D.F. Immediate coma following inertial brain injury dependent on axonal damage in the brainstem. *J. Neurosurg*. 2011, 93, 315–322.
- Stefani MA, Modkovski R, Hansel G, Zimmer ER, Kopczynski A, Muller AP, Strogulski NR, Rodolphi MS, Carteri RK, Schmidt AP, Oses JP, Smith DH, Portela LV. Elevated glutamate and lactate predict brain death after severe head trauma. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017 May 4;4(6):392-402.
- Stern RA, Riley DO, Daneshvar DH, Nowinski CJ, Cantu RC, McKee AC. Long-term consequences of repetitive brain trauma: chronic traumatic encephalopathy. *PM R*. 2011 Oct;3(10 Suppl 2):S460-7.
- Sulhan, S.; Lyon, K.A.; Shapiro, L.A.; Huang, J.H. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *J. Neurosci. Res.* 2020, 98, 19–28.
- Szydłowska, K.; Tymianski, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010, 47, 122–129.
- Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol*. 1993 Feb;42(2):177-85.
- Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, Shoyama Y, Morimoto S. Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes. *Chem Biodivers*. 2007 Aug;4(8):1649-63.
- Taylor, L., Gidal, B., Blakey, G., Tayo, B., and Morrison, G. (2018). A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, single ascending dose, multiple dose, and food effect trial of the safety, tolerability and pharmacokinetics of highly purified cannabidiol in healthy subjects. *CNS Drugs* 32, 1053–1067.
- Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974 Jul 13;2(7872):81-4.
- Thal SC, Neuhaus W. The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment. *Arch Med Res*. 2014 Nov;45(8):698-710.

- Thapa K, Khan H, Singh TG, Kaur A. Traumatic Brain Injury: Mechanistic Insight on Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *J Mol Neurosci.* 2021 Sep;71(9):1725-1742.
- Theadom A, Mahon S, Hume P, Starkey N, Barker-Collo S, Jones K, Majdan M, Feigin VL. Incidence of Sports-Related Traumatic Brain Injury of All Severities: A Systematic Review. *Neuroepidemiology.* 2020;54(2):192-199.
- Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists *in vitro*. *Br J Pharmacol.* 2007 Mar;150(5):613-23.
- Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA, McIntosh TK. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma.* 2005 Jan;22(1):42-75.
- Timofeev I, Carpenter KL, Nortje J, Al-Rawi PG, O'Connell MT, Czosnyka M, Smielewski P, Pickard JD, Menon DK, Kirkpatrick PJ, Gupta AK, Hutchinson PJ. Cerebral extracellular chemistry and outcome following traumatic brain injury: a microdialysis study of 223 patients. *Brain.* 2011 Feb;134(Pt 2):484-94.
- Ujváry I, Hanuš L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2016 Mar 1;1(1):90-101..
- Van Landeghem FK, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2006 Oct;23(10):1518-28.
- Victor TR, Hage Z, Tsirka SE. Prophylactic Administration of Cannabidiol Reduces Microglial Inflammatory Response to Kainate-Induced Seizures and Neurogenesis. *Neuroscience.* 2022 Sep 15;500:1-11.
- Vuolo F, Abreu SC, Michels M, Xisto DG, Blanco NG, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Reis C, Bahl M, Pizzichinni E, Maurici R, Pizzichinni MMM, Rocco PRM, Dal-Pizzol F. Cannabidiol reduces airway inflammation and fibrosis in experimental allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 2019 Jan 15;843:251-259.
- Ward NS. Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Postgrad Med J.* 2005 Aug;81(958):510-4.
- Ward, R.J.; Colivicchi, M.A.; Allen, R.; Schol, F.; Lallemand, F.; de Witte, P.; Ballini, C.; Corte, L.D.; Dexter, D. Neuroinflammation induced in the hippocampus of 'binge drinking' rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *J. Neurochem.* 2009, 111, 1119–1128.
- Watzlawick R, Howells DW, Schwab JM. Neuroprotection After Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurol.* 2016 Feb;73(2):149-50.
- Webster KM, Wright DK, Sun M, Semple BD, Ozturk E, Stein DG, O'Brien TJ, Shultz SR. Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2015 Dec 18;12:238.
- Werner, C., y Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *British Journal of Anaesthesia,* 99(1), 4-9
- Wilk JE, Herrell RK, Wynn GH, Riviere LA, Hoge CW. Mild traumatic brain injury (concussion), posttraumatic stress disorder, and depression in U.S. soldiers involved in

- combat deployments: association with postdeployment symptoms. *Psychosom Med.* 2012 Apr;74(3):249-57.
- Woiciechowsky C, Schöning B, Cobanov J, Lanksch WR, Volk HD, Döcke WD. Early IL-6 plasma concentrations correlate with severity of brain injury and pneumonia in brain-injured patients. *J Trauma.* 2002 Feb;52(2):339-45.
 - Wojda, U.; Salinska, E.; Kuznicki, J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 2008, 60, 575–590.
 - Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009 Mar;14(1):67-84.
 - Yaguchi, T.; Nishizaki, T. Extracellular high K⁺ stimulates vesicular glutamate release from astrocytes by activating voltage-dependent calcium channels. *J. Cell. Physiol.* 2010, 225, 512–518.
 - Zamberletti, E.; Rubino, T.; Parolaro, D. Therapeutic potential of cannabidivarin for epilepsy and autism spectrum disorder. *Pharmacol. Ther.* 2021, 226, 107878.
 - Zhang W, Miao Y, Zhou S, Jiang J, Luo Q, Qiu Y. Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. *J Clin Neurosci.* 2011 May;18(5):685-9.
 - Zhao Z, Loane DJ, Murray MG 2nd, Stoica BA, Faden AI. Comparing the predictive value of multiple cognitive, affective, and motor tasks after rodent traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2012 Oct 10;29(15):2475-89.
 - Ziebell, J. M., y Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Involvement of pro-and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 22-30.
 - Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma.* 2000 Oct;17(10):857-69. doi: 10.1089/neu.2000.17.857. PMID: 11063053.