



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de la estimulación magnética transcraneal de  
baja frecuencia sobre la expresión de receptores de  
cannabinoides CB1 y CB2 en corteza cerebral de rata con  
traumatismo craneoencefálico**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**SANTIAGO GARCÍA RÍOS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. EN C. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ  
Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos y dedicatorias**

A mis padres, por siempre darme las herramientas para perseguir libremente cualquier sueño que he tenido en mis 26 años de vida. Son las personas más pacientes, amables y cariñosas que conozco, los amo eternamente. Son la razón principal por la cual estoy terminando mis estudios.

A mi hermana, quien estuvo casi toda mi vida escolar a mi lado. Se que nunca estaremos solos en esta vida porque siempre nos vamos a tener uno al otro. Gracias por Cami por cierto.

A Jimena, porque en esta etapa de mi vida me ha enseñado lecciones y experiencias que se van a quedar toda la vida conmigo. Resumo lo que he aprendido a tu lado en una frase de Emma Goldman: “La verdadera riqueza consiste en objetos de utilidad y belleza, en cosas que ayuden a crear cuerpos fuertes, bellos y espacios que inspiren a vivir en ellos”.

A Sam, porque literalmente sin ti nunca habría terminado esta tesis. Fuiste mi compañera de laboratorio favorita de toda la carrera.

A todas las personas del Laboratorio de Bioelectromagnetismo y el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Medicina. TODOS siempre fueron amables, dispuestos a ayudar, enseñar y convivir. Un agradecimiento especial a las Dras. Leticia Verdugo, Marina y Luz Navarro, quienes además de ser excelentes científicas que producen conocimiento que busca mejorar la salud de humanos con diversos padecimientos, son las doctoras más amables con las que he tenido el placer de trabajar. Siempre me guiaron con sus opiniones y las considero ejemplos a seguir en la ciencia y en la vida.

Agradezco a todos los miembros del jurado por tomarse el tiempo de leer la tesis y darme la retroalimentación necesaria para que este fuera un mejor trabajo.

Gracias a todos los trabajadores y estudiantes de la UNAM, ustedes son los que mantienen en alto a esta universidad.

Por último, un agradecimiento y reconocimiento a aquellas personas que han luchado por hacer el conocimiento científico libre y accesible para todos: Aaron Swartz, Alexandra Elbakyan, Jon Tennant, Paul Ginsparg, Greg Maxwell y a todos esos usuarios anónimos del ciberespacio que luchan por el derecho a intercambiar información sin barreras ni censura.

## **Agradecimientos académicos**

La tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Bioelectromagnetismo de la Facultad de Medicina, UNAM en conjunto con el laboratorio de neuroendocrinología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Esta investigación se llevó a cabo gracias al financiamiento otorgado por el proyecto PAPIIT, UNAM: IN-214017 a L.V-D y IN-223417 a L. N-A.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

García

Ríos

Santiago

55 81 07 99 11

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312105406

### 2. Datos del tutor

Dra en C

Verdugo

Díaz

Sylvia Leticia

### 3. Datos del sinodal 1

Dr

Martínez

Canabal

Alonso

### 4. Datos del sinodal 2

Dra

Marina

Martínez

Vargas

### 5. Datos del sinodal 3

Dra en C

Verdugo

Díaz

Sylvia Leticia

### 6. Datos del sinodal 4

M en C

Méndez

Pérez

Juana Patricia

### 7. Datos del sinodal 5

QFB

Gil

Lievana

Elvi

### 3. Datos del trabajo escrito

Efecto de la estimulación magnética transcraneal de baja frecuencia sobre la expresión de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en corteza cerebral de rata con traumatismo craneoencefálico

58 p.

2021

# Contenido

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Agradecimientos y dedicatorias</b> .....                         | <b>2</b>  |
| <b>Agradecimientos académicos</b> .....                             | <b>2</b>  |
| <b>1 Resumen</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>2 Introducción</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>2.1 Traumatismo craneoencefálico</b> .....                       | <b>9</b>  |
| <b>2.1.1 Clasificación</b> .....                                    | <b>9</b>  |
| <b>2.1.2 Epidemiología</b> .....                                    | <b>10</b> |
| <b>2.1.3 Fisiopatología del TCE</b> .....                           | <b>10</b> |
| 2.1.3.1 Daño primario .....   | 10        |
| 2.1.3.2 Daño secundario .....                                       | 10        |
| 2.1.3.3 Mecanismos celulares involucrados en el daño cerebral ..... | 11        |
| <b>2.1.4 Tratamiento</b> .....                                      | <b>12</b> |
| <b>2.1.5 Neuroprotección en trauma cerebral</b> .....               | <b>13</b> |
| <b>2.2 Sistema endocannabinoide</b> .....                           | <b>14</b> |
| <b>2.2.1 Resumen histórico del estudio de cannabinoides</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>2.2.2 Composición del Sistema Endocannabinoide</b> .....         | <b>15</b> |
| <b>2.2.3 Receptores a Cannabinoides</b> .....                       | <b>15</b> |
| 2.2.3.1 Receptor CB1.....   | 15        |
| 2.2.3.2 Receptor CB2.....   | 16        |
| <b>2.2.4 Endocannabinoides</b> .....                                | <b>16</b> |
| <b>2.2.5 Funciones del sistema endocannabinoide</b> .....           | <b>18</b> |

|              |   |                  |
|--------------|---|------------------|
| <b>2.2.6</b> | <b><u>Evolución del sistema endocannabinoide .....</u></b>  | <b><u>20</u></b> |
| <b>2.3</b>   | <b><u>Estimulación Magnética Transcraneal.....</u></b>      | <b><u>21</u></b> |
| <b>2.3.1</b> | <b><u>Resumen Histórico del estudio de la EMT .....</u></b> | <b><u>21</u></b> |
| <b>2.3.2</b> | <b><u>Fundamento de la técnica .....</u></b>                | <b><u>21</u></b> |
| <b>2.3.3</b> | <b><u>Mecanismo de acción.....</u></b>                      | <b><u>22</u></b> |
| <b>2.3.4</b> | <b><u>Aplicaciones de la EMTr.....</u></b>                  | <b><u>23</u></b> |
| <b>3</b>     | <b><u>Objetivos.....</u></b>                                | <b><u>24</u></b> |
| <b>3.1</b>   | <b><u>Objetivo General .....</u></b>                        | <b><u>24</u></b> |
| <b>3.2</b>   | <b><u>Objetivos particulares.....</u></b>                   | <b><u>24</u></b> |
| <b>4</b>     | <b><u>Justificación.....</u></b>                            | <b><u>24</u></b> |
| <b>5</b>     | <b><u>Hipótesis .....</u></b>                               | <b><u>26</u></b> |
| <b>6</b>     | <b><u>Método .....</u></b>                                  | <b><u>26</u></b> |
| <b>6.1</b>   | <b><u>Restricción de movimiento .....</u></b>               | <b><u>27</u></b> |
| <b>6.2</b>   | <b><u>Conducta NSS-r.....</u></b>                           | <b><u>28</u></b> |
| <b>6.3</b>   | <b><u>TCE.....</u></b>                                      | <b><u>28</u></b> |
| <b>6.4</b>   | <b><u>EMTr de baja frecuencia.....</u></b>                  | <b><u>29</u></b> |
| <b>6.5</b>   | <b><u>Extracción de estructuras.....</u></b>                | <b><u>30</u></b> |
| <b>6.6</b>   | <b><u>Cuantificación de receptores CB1 yCB2 .....</u></b>   | <b><u>30</u></b> |
| <b>6.6.1</b> | <b><u>Ensayo de Western Blot .....</u></b>                  | <b><u>30</u></b> |
| <b>6.6.2</b> | <b><u>Ensayo de RT-PCR.....</u></b>                         | <b><u>31</u></b> |
| <b>6.7</b>   | <b><u>Análisis estadístico .....</u></b>                    | <b><u>32</u></b> |

|               |                                   |           |
|---------------|-----------------------------------|-----------|
| <b>7</b>      | <b>Resultados y discusión</b>     | <b>33</b> |
| <b>7.1</b>    | <b>Peso de los animales</b>       | <b>33</b> |
| <b>7.2</b>    | <b>Consumo de alimento</b>        | <b>34</b> |
| <b>7.3</b>    | <b>Consumo de Agua</b>            | <b>35</b> |
| <b>7.4</b>    | <b>Western Blot</b>               | <b>36</b> |
| <b>7.5</b>    | <b>RT-PCR</b>                     | <b>41</b> |
| <b>7.5.2.</b> | <b>RT-PCR de CB2</b>              | <b>42</b> |
| <b>7.6</b>    | <b>Escala NSS-r</b>               | <b>43</b> |
| <b>7.7</b>    | <b>DISCUSIÓN GENERAL</b>          | <b>44</b> |
| <b>7.7.2</b>  | <b>Papel de la EMTr en el TCE</b> | <b>46</b> |
| <b>7.7.3</b>  | <b>Final</b>                      | <b>49</b> |
| <b>8</b>      | <b>Conclusiones</b>               | <b>49</b> |
| <b>9</b>      | <b>Abreviaturas y Glosario</b>    | <b>50</b> |
| <b>10</b>     | <b>Referencias</b>                | <b>52</b> |

# 1 Resumen

La Estimulación Magnética Transcraneal (EMT) es una técnica no invasiva para la estimulación eléctrica del tejido neuronal (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003). La EMT produce un campo magnético generado por una bobina y de llevar una amplitud de corriente, duración y dirección adecuada, se induce en el cerebro una corriente eléctrica que puede despolarizar o hiperpolarizar axones (Rossini y Rossi, 2007). La EMT repetitiva (EMTr) de baja frecuencia (1 Hz) tiene el efecto de reducir la excitabilidad cortical, incluso después de que los pulsos de la bobina de la EMT han terminado (O' Shea y Walsh, 2007). Esta característica de modificar las propiedades eléctricas del tejido neuronal resulta útil en el tratamiento contra un Traumatismo Craneoencefálico (TCE), una enfermedad que, entre otras cosas, desregula la excitabilidad del cerebro, provocando daño neuronal.

El TCE es una lesión cerebral causada por una fuerza física externa (Jain, 2008). El TCE es una de las causas de muerte y discapacidad más importantes a nivel mundial, principalmente en gente joven (Ghajar, 2000). El TCE puede causar varios tipos de daño dependiendo de los mecanismos y fuerzas involucradas (Parikh *et al.*, 2007). En modo general, se pueden destacar dos tipos básicos de alteraciones: daño primario (lesión inmediata) y secundario (respuesta al daño primario) (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006). Ante un TCE, el cerebro activa endógenamente medidas neuroprotectoras, como liberación de citocinas antiinflamatorias, antioxidantes y activación de sistemas GABAérgico y cannabinérgico (Estrada Rojo *et al.*, 2012). Éste último sistema, llamado el sistema endocannabinoide tiene como principal función en el cerebro la regulación de transmisión sináptica (Baker *et al.*, 2003; Svíženská *et al.*, 2008). El nivel de expresión de los receptores a cannabinoides cambian durante estímulos patológicos y en situaciones de estrés crónico, excitotoxicidad neuronal, daño o neuroinflamación (patologías presentes en un TCE), ejerciendo una función de protección contra insultos endógenos y ambientales (Lu y MacKie, 2016; Moreno, 2011).

Muchos de los tratamientos actuales para un TCE son de baja eficacia. Se ha visto en modelos animales y en humanos que las aplicaciones de la EMT en este padecimiento podrían ser benéficas para combatir los efectos adversos del TCE; sin embargo, los mecanismos por los cuales se reduce el daño asociado al TCE todavía no están claros (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019). Además, en modelos animales se ha visto que la EMTr induce efectos en el sistema endocannabinoide (Fang y Wang, 2018; Ljubisavljevic *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014b; Xue *et al.*, 2019). Utilizando un modelo animal podemos estudiar la relación entre el Sistema Endocannabinoide, el TCE y la EMTr de 1 Hz, algo que hasta la fecha, según nuestros conocimientos, no se ha realizado.

En este trabajo evaluamos el efecto de la EMTr de 1 Hz en la corteza motora de ratas con TCE y observamos la expresión de receptores a cannabinoides. Para esto se utilizaron ratas macho (estirpe Wistar). El traumatismo en la corteza motora se produjo con un modelo de caída de peso. Para evaluar el daño producido por el TCE se evaluaron a las ratas por medio de la escala de severidad neuroconductual revisada (NSS-r) (Yarnell *et al.*, 2016). Posterior al día del trauma, se estimuló el cerebro de las ratas con EMTr de 1 Hz durante 7 días por 10 minutos diarios. Finalmente, se obtuvieron



las cortezas de las ratas y se analizaron por medio de Western Blot y RT-PCR para evaluar la expresión de receptores a endocannabinoides (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>).

Encontramos que la EMTr de 1 Hz aumenta la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en ratas con y sin TCE, pero no pudimos observar un aumento para el receptor de CB<sub>2</sub>. En el análisis de PCR no se observaron diferencias entre los grupos en la expresión de receptores. En cuanto a la escala NSS-r observamos que las ratas con TCE tenían un mayor daño motor en comparación con las ratas controles. La EMTr de 1 Hz fue capaz de inducir un efecto protector en las ratas con TCE, observándose como una mejora significativa en esta escala.

Este estudio concuerda con los resultados de otras investigaciones (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019) donde se ha encontrado que la EMTr puede servir como un tratamiento auxiliar en la reducción de daños asociados al TCE. Nuestro trabajo es uno de los pocos que exploran el tratamiento del TCE con una estimulación de baja frecuencia, encontrándose efectos positivos de esta frecuencia en la recuperación motora posterior a un TCE. A nuestro conocimiento, es el único estudio que explora la relación entre EMTr de 1 Hz, el TCE y la expresión de receptores a cannabinoides. Pudimos observar que la EMTr indujo un aumento en la expresión del receptor CB<sub>1</sub>. Esto probablemente esté relacionado a la mejora motora observada en la escala NSS-r, concordando con el efecto neuroprotector del receptor CB<sub>1</sub> después de un trauma, pero, deben de hacerse más estudios que exploren esta relación, para conocer cómo la EMT aumenta la expresión de este receptor e induce sus efectos neuroprotectores observados.

## 2 Introducción

### 2.1 Traumatismo craneoencefálico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) se define como una patología caracterizada por una alteración cerebral secundaria a una lesión traumática en la cabeza con la presencia de al menos uno de los siguientes elementos: alteración de la consciencia y/o amnesia; cambios neurológicos o neurofisiológicos y fractura de cráneo o lesiones intracraneales debidas al trauma, producto de una fuerza externa (Charry *et al.*, 2019).

#### 2.1.1 Clasificación

Se puede dividir al TCE en dos tipos de lesiones: lesiones abiertas y cerradas. Las lesiones abiertas involucran penetración del cráneo (y frecuentemente de meninges), como sucede en lesiones con armas de fuego u objetos punzocortantes. Una lesión cerrada típicamente ocurre cuando la cabeza sufre de un golpe con algún objeto contundente, por una onda expansiva o cuando sufre de un proceso de aceleración y desaceleración violentamente (Parikh *et al.*, 2007).

También se puede dividir el TCE de acuerdo con su severidad, evaluada a través de la Escala de Coma de Glasgow (GCS) (Tabla 1.1). La GCS permite conocer el nivel de consciencia del paciente y da una idea de la posible recuperación a futuro. Evalúa apertura ocular (4 niveles), respuesta motora (6 niveles) y respuesta verbal (5 niveles) (Ontiveros *et al.*, 2014). Una puntuación igual o superior a 13 se considera como una lesión leve, una puntuación de entre 9 y 12 como moderada y grave con puntuación de menos de 8 (Mehta y Chinthapalli, 2019). Los pacientes con puntuaciones de 3 a 5 tienen un índice de mortalidad de 68.4%; puntuaciones entre 6 y 8 tienen una mortalidad de 40.6% (Ontiveros *et al.*, 2014).

| Apertura Ocular  | Respuesta Verbal | Respuesta Motora            |
|------------------|------------------|-----------------------------|
| 4. Espontánea    | 5. Orientada     | 6. Obedece órdenes          |
| 3. Al habla      | 4. Oraciones     | 5. Localiza el dolor        |
| 2. Al dolor      | 3. Palabras      | 4. Flexión al dolor         |
| 1. Sin respuesta | 2. Sonidos       | 3. Flexión anormal al dolor |
|                  | 1. Sin Respuesta | 2. Extensión al dolor       |
|                  |                  | 1. Sin respuesta            |

**Tabla 1.1. Escala de Coma de Glasgow. Adaptada de Mehta y Chinthapalli, 2019.**

## 2.1.2 Epidemiología

Se estima que a nivel mundial ocurren cada año aproximadamente 69 millones de casos nuevos de TCE (Pink *et al.*, 2019), donde 1.2 millones de personas mueren como consecuencia del TCE (Ontiveros *et al.*, 2014). El TCE se observa más frecuentemente en el rango de edad de 15 a 24 años (Cabrera Rayo *et al.*, 2009) y afecta más a los hombres en una relación 2:3 (Charry *et al.*, 2019). En México el TCE tiene un índice de mortalidad de 38.8 por cada 100 mil habitantes con mayor incidencia en hombres de 15 a 45 años (Ontiveros *et al.*, 2014). La causa más frecuente del TCE son los accidentes de tráfico; del total de las muertes por accidente de tránsito, el 60% es causado principalmente por TCE (Charry *et al.*, 2019).

## 2.1.3 Fisiopatología del TCE

El TCE es una patología heterogénea donde, aunque se presenten lesiones similares se puede presentar una sintomatología distinta dependiendo de los mecanismos de daño involucrados (Parikh *et al.*, 2007; Pink *et al.*, 2019). En modo general, se pueden destacar dos tipos básicos de alteraciones: daño primario y daño secundario (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006).

### 2.1.3.1 Daño primario

El daño primario es irreversible y se refiere a la lesión causada inmediatamente después del impacto, siendo el resultado directo del trauma sobre la cabeza o por movimientos de aceleración y desaceleración (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006; Estrada Rojo *et al.*, 2012). Como consecuencia del daño primario se pueden presentar: ruptura de cráneo, daño a los vasos sanguíneos, hematomas epidurales y subdurales, hematomas intraparenquimatosos, hemorragia intracerebral, contusiones y daño axonal difuso (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006).

### 2.1.3.2 Daño secundario

Este daño ocurre como respuesta al daño primario y a eventos sistémicos; es la causa principal de muertes en hospitales posterior a un TCE (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006; Ghajar, 2000). Involucra cambios funcionales, estructurales, celulares y moleculares que provocan daño neuronal como liberación de neurotransmisores, generación de radicales libres, daño mediado por calcio, activación de genes, disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria. Con terapia adecuada, este tipo de daño puede ser reversible (Estrada Rojo *et al.*, 2012).

Hay dos tipos de mecanismos principales en la lesión secundaria: 1) locales, donde intervienen eventos neuroquímicos que al juntarse provocan daño neuronal, como la producción de radicales libres de oxígeno, citocinas proinflamatorias, aminoácidos neuroexcitadores y apoptosis y 2) sistémicos, que son cambios que alteran la hemodinamia cerebral, modificando el flujo sanguíneo cerebral, la presión intracraneal (PIC) y la presión de perfusión cerebral (Cabrera Rayo *et al.*, 2009). El daño secundario por causas sistémicas tiene como principal variable la hipotensión arterial, la cual actuando incluso por periodos breves aumenta la tasa de mortalidad del TCE graves del 27% al 50% (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006). Para prevenir el daño secundario, se debe buscar detener hemorragias, revertir la hipotensión y aportar oxígeno al paciente (Charry *et al.*, 2019).

### 2.1.3.3 **Mecanismos celulares involucrados en el daño cerebral**

Posterior a un TCE se han identificado varios mecanismos celulares que se generan en diferente grado dependiendo de la severidad del daño (McGinn y Povlishock, 2016). Estos mecanismos son comunes en neuronas y glía y corresponden a procesos patológicos tales como la inflamación, apoptosis y excitotoxicidad (Rovegno *et al.*, 2012).

Debido al daño celular directo, a la modificación de la perfusión cerebral y el flujo sanguíneo cerebral, se produce una falla energética, alteraciones de los gradientes iónicos transmembranales y una caída en el flujo sanguíneo, generando una condición similar a la isquemia (Rovegno *et al.*, 2012). Cuando ocurre un proceso de isquemia, hay un descenso de la concentración de glucosa y de oxígeno, lo cual provoca la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Como consecuencia, hay una reducción de ATP por el fallo metabólico de la mitocondria, provocando despolarización de la membrana plasmática de la neurona al no poder regular el gradiente de concentración de potasio y sodio. El fallo energético también altera a la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (la cual no puede mantener las concentraciones bajas de calcio, normalmente presentes dentro de la célula) induciendo la activación de proteasas, lipasas y DNAasas dependientes de calcio, lo cual provoca la muerte celular por un aumento en su catabolismo (Doyle *et al.*, 2008; McGinn y Povlishock, 2016; Rovegno *et al.*, 2012).

Unos minutos después de un TCE se observa una elevación aguda de los niveles extracelulares de neurotransmisores (de particular importancia el glutamato) como consecuencia de la despolarización masiva inducida por el TCE y la falla energética asociada (Rovegno *et al.*, 2012). Cuando existe glutamato en exceso, este activan receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) (McGinn y Povlishock, 2016) —receptores ionotrópicos que regulan la neurotransmisión de glutamato y cuya activación facilita la entrada de iones a la neurona como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y salida de  $\text{K}^+$  (Flores-Soto *et al.*, 2012) —. Los receptores NMDA son permeables a calcio y abrir estos canales genera más eventos de despolarización y un mayor influjo de calcio (Doyle *et al.*, 2008). Esta entrada y acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  facilitada por los receptores de glutamato provocan la muerte neuronal a las pocas horas (Cardonne *et al.*, 2014). Además, este flujo iónico (resultado de las elevadas concentraciones de glutamato) induce un estado de crisis metabólica que provoca un fallo energético a medida que el cerebro incrementa el uso de glucosa cerebral para promover el restablecimiento de la homeostasis iónica por medio de bombas iónicas dependientes de ATP (McGinn y Povlishock, 2016).

A esta cadena de eventos patológicos inducidos por glutamato se le conoce como **excitotoxicidad** y se produce inicialmente en neuronas, donde los astrocitos representan la principal defensa al recapturar el glutamato. Sin embargo, si persisten las concentraciones elevadas de glutamato extracelular, los astrocitos potencian la excitotoxicidad al invertir el transporte, favoreciendo la salida de glutamato del propio astrocito (Rovegno *et al.*, 2012).

Por otro lado, los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y ADP intracelular causan que la mitocondria produzca altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las neuronas son muy vulnerables a las ERO debido a que tienen pocos antioxidantes endógenos. Los radicales libres en abundancia causan la destrucción de macromoléculas y participan en mecanismos de señalización que resultan en muerte celular. Como son especies de vida corta, el daño se concentra más en el foco isquémico, pero al haber revascularización este daño se potencia (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006); al haber reperusión, algunos radicales activan procesos que llevan a la disrupción de la integridad de la pared vascular e incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) (Doyle *et al.*, 2008). En caso de haber lisis de eritrocitos, habrá una concentración de hemoglobina alta y el hierro también puede provocar ERO (Xi *et al.*, 2006).

Otro mecanismo celular que provoca el deterioro del tejido nervioso como consecuencia del insulto mecánico es la activación de la respuesta inflamatoria a través de la liberación de contenido intracelular y de productos sanguíneos extravasados (McGinn y Povlishock, 2016). La inflamación es mediada por células inmunes periféricas infiltradas por la BHE alterada, tales como los leucocitos. También es mediada por células inmunes residentes conocida como microglía (macrófagos residentes del SNC) y astrocitos (McGinn y Povlishock, 2016; Rovegno *et al.*, 2012). Ambos tipos celulares median la respuesta inflamatoria produciendo citocinas inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión, ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN), entre otros. Esta respuesta inflamatoria favorece la formación de edema cerebral y la subsecuente inflamación del cerebro y la presión intracraneal, lo cual genera un peor pronóstico en el TCE (McGinn y Povlishock, 2016). Los astrocitos pueden sufrir un cambio fenotípico conocido como astrocitosis reactiva como consecuencia de la respuesta inflamatoria. En un trauma moderado, la astrocitosis contiene el área dañada y favorece la remodelación neuroplástica, pero en TCE más severos esta astrocitosis puede resultar en una cicatriz glial que posteriormente dificulta la recuperación (Rovegno *et al.*, 2012). La microglía puede mantener el perfil proinflamatorio por semanas o meses, potenciando la degeneración del tejido neuronal (McGinn y Povlishock, 2016). Esta respuesta neuroinflamatoria puede tener efectos neuroprotectores o neurotóxicos dependiendo del tipo y magnitud del daño inicial y del contexto en que ocurre la respuesta inflamatoria (Rovegno *et al.*, 2012).

#### **2.1.4 Tratamiento**

El tratamiento inicial consiste en mantener una ventilación y presión sanguínea adecuadas. Frecuentemente es requerida una cirugía para remover hematomas intracraneales y crear más espacio para que el cerebro se inflame. En los primeros días después de la lesión, se hacen esfuerzos para mantener la perfusión cerebral y la oxigenación (Parikh *et al.*, 2007).

El daño primario no puede ser tratado, así que el objetivo de los tratamientos es minimizar el daño secundario (Bárcena-Orbe *et al.*, 2006) con terapias que prevengan o reviertan los mecanismos de daño neuronal causados por la lesión traumática (medidas neuroprotectoras).

## 2.1.5 Neuroprotección en trauma cerebral

La neuroprotección se refiere al empleo de cualquier terapia que previene, retarda o revierte la muerte celular resultado de una lesión neuronal (también se incluyen respuestas endógenas) (Tabla 1.2). Entre las respuestas endógenas se encuentran la liberación de citocinas antiinflamatorias, antioxidantes y activación de sistemas GABAérgico y cannabinérgico (Estrada Rojo *et al.*, 2012). El Sistema endocannabinoide juega un papel neuroprotector en varias formas de lesiones neuronales: TCE, infarto cerebral, esclerosis múltiple, Parkinson, Huntington, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (Pacher y Haskó, 2008). También se pueden utilizar terapias neuroprotectoras exógenas como la estimulación magnética transcraneal (EMT), la cual es una técnica no invasiva que estimula el cerebro con pulsos electromagnéticos que puede influenciar en la plasticidad neuronal al alterar la excitabilidad neuronal. Hay evidencia de que esta técnica puede resultar benéfica en el tratamiento contra TCE (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019).

| Tratamiento                       | Mecanismo de acción  |
|-----------------------------------|--|
| Antiexcitotóxicos                 | Fármacos que reducen la excitotoxicidad de aminoácidos excitatorios.   |
| Bloqueadores de canales iónicos   | Fármacos que bloquean canales iónicos, en especial los de calcio, sodio y potasio.   |
| Neuroesteroides                   | Los neuroesteroides endógenos, en especial la progesterona, pueden funcionar como posible terapia debido a su efecto de proteger o regenerar la barrera hematoencefálica, reducir el edema cerebral, regular la cascada inflamatoria, disminuir la apoptosis, mitigar la excitotoxicidad del glutamato y potenciar los efectos del GABA. |
| Inactivadores de radicales libres | Reducen estrés oxidativo disminuyendo concentración de especies reactivas de oxígeno y/o de nitrógeno.   |
| Sustancias antiinflamatorias      | Previenen la respuesta inflamatoria asociada a la extensión del daño cerebral.   |
| Hipotermia                        | Resulta benéfica y está asociada a reducir efectos secundarios por la reducción del metabolismo cerebral, de la PIC y bloquear mecanismos de excitotoxicidad. Reduce mortalidad.   |
| Cannabinoides                     | Se ha demostrado que tienen papel neuroprotector. La activación de sistema endocannabinoide disminuye la liberación de glutamato.  |

**Tabla 1.2. Estrategias neuroprotectoras ante un TCE. Tomada de Estrada Rojo *et al.*, 2012.**

## 2.2 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SE) es un sistema modulador que se encuentra en varios tejidos del cuerpo (Lu y MacKie, 2016). Tiene apenas unos 30 años desde que se empezó a caracterizar este sistema y su interacción con la planta del género *Cannabis*, ayudó a su descubrimiento (de ahí que éste sistema se le conozca como sistema endocannabinoide) (Pain, 2015). El descubrimiento del tetrahidrocannabinol (THC) por Gaoni y Mechoulam en 1964 fue el primer paso en una serie de descubrimientos que llevarían a caracterizar el SE (Zhou *et al.*, 2019).

### 2.2.1 Resumen histórico del estudio de cannabinoides

En estudios arqueológicos se demostró que el ser humano ha estado en contacto desde hace 10,000-12,000 años con la planta del género *Cannabis* (Pain, 2015), la cual produce ciertos metabolitos secundarios que interaccionan con el sistema endocannabinoide (Laursen, 2015). Las plantas de *Cannabis* producen una familia única de compuestos llamados cannabinoides, de los cuales se han identificado hasta 104 en este género (Gould, 2015), aunque los más producidos y los más estudiados son el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC o simplemente abreviado THC) y el cannabidiol (abreviado CBD). El THC ha tenido una relevancia importante por su interacción con el sistema endocannabinoide, siendo fundamental en el descubrimiento de este sistema (Zhou *et al.*, 2019). Gracias al descubrimiento del THC se empezaron a sintetizar compuestos con propiedades similares a este (cannabinoides sintéticos) que llevaron al descubrimiento de un receptor endógeno con el cual interaccionaban estos compuestos (receptor CB<sub>1</sub>) (Zou y Kumar, 2018).

Antes del descubrimiento del sistema endocannabinoide, los humanos habían aprovechado este sistema y su interacción con la planta de *Cannabis* para diversos fines (Clarke y Merlin, 2013). El primer uso medicinal es atribuido al emperador chino Shen Nung, que se cree vivió en el 2700 a.C, aunque la primera evidencia del uso medicinal viene de una cueva a 30 km de Jerusalén que data del año 390, donde arqueólogos encontraron un esqueleto de una niña de 14 años que había utilizado *Cannabis* durante el parto (Pain, 2015).

Fue hasta 1899 que químicos británicos aislaron por primera vez un cannabinoide: el cannabinol. Años después, en 1946, el químico Israelí Raphael Mechoulam aisló el THC, siendo un punto de partida para la investigación de los cannabinoides. En 1988 se descubrió un nuevo receptor en el cerebro, llamado CB<sub>1</sub> por el cual el THC ejerce sus efectos psicoactivos. Gracias a este descubrimiento, se empezaron a buscar sustancias endógenas que pudieran activar a este receptor. La primera de estas sustancias, las cuales son llamadas endocannabinoides, fue la anandamida, descubierta en 1992. Un año después se descubrió un segundo receptor, denominado CB<sub>2</sub> (Pain, 2015).

## 2.2.2 Composición del Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide está compuesto de receptores (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>), genes que codifican para estos receptores (CNR1 y CNR2), ligandos endógenos (llamados endocannabinoides) y enzimas de degradación y de síntesis (N-*acil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D*, *fosfolipasa C*, *diacilglicerol lipasa*, *monoacilglicerol lipasa* y *amida hidrolasa de ácidos grasos*) (Gertsch *et al.*, 2010; Joshi y Onaivi, 2019; Svízenská *et al.*, 2008).

## 2.2.3 Receptores a Cannabinoides

Se reconocen al menos dos receptores del sistema endocannabinoide, el receptor CB<sub>1</sub> y el receptor CB<sub>2</sub>. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (también conocidos como GPCR). Ambos están asociados a proteínas Gi/o, que disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa, disminuyendo los niveles de AMP cíclico (AMPC) intracelular (como consecuencia, se ve afectada la capacidad de fosforilación de proteínas cinasas dependientes de este nucleótido) y estimulan la ruta de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Baker *et al.*, 2003). Adicionalmente se sugiere la existencia de receptores a cannabinoides adicionales por estudios en ratones *knockout* para los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Moreno, 2011).

Los receptores a endocannabinoides localizados en la membrana plasmática son los que más han sido descritos. Actualmente, se sabe que pueden localizarse también en compartimentos intracelulares, tales como en el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y mitocondria (Joshi y Onaivi, 2019).

Ambos receptores regulan el desarrollo neuronal, procesos embrionarios, transmisión sináptica, neuroprotección, inflamación, nocicepción, control motor, memoria y aprendizaje; miedo y ansiedad; apetito, funciones cardiovasculares y respiratorias; liberación y acción hormonal; formación ósea y metabolismo energético. Y funciones celulares, tales como la arquitectura celular, proliferación, motilidad, adhesión y apoptosis (Joshi y Onaivi, 2019; Moreno, 2011).

### 2.2.3.1 Receptor CB<sub>1</sub>

El receptor CB<sub>1</sub> está codificado por el gen *Cnr1* y consiste de 462 aminoácidos en humanos (473 aa en rata y ratón) (Zou y Kumar, 2018). En humanos, el transcrito de CNR1 produce al menos 5 isoformas por *splicing* alternativo (Joshi y Onaivi, 2019).

El receptor CB<sub>1</sub> se localiza principalmente en el SNC. Es el receptor acoplado a proteínas G (GPCR) más abundante del cerebro de mamíferos (Joshi y Onaivi, 2019; Moreno, 2011; Zou y Kumar, 2018). El receptor se localiza principalmente en terminales presinápticas, pero también se han encontrado en neuronas postsinápticas, astrocitos, oligodendrocitos y microgía (Lu y MacKie, 2016; Svízenská *et al.*, 2008; Zou y Kumar, 2018).



Aunque este receptor se localiza principalmente en la membrana celular, también existe CB<sub>1</sub> intracelular: estos CB<sub>1</sub> intracelulares están presentes en endosomas, lisosomas y mitocondrias. También puede haber presencia de CB<sub>1</sub> intracelular por un proceso de internalización (inducida por agonista) de CB<sub>1</sub> desde la membrana plasmática (Zou y Kumar, 2018).

Existe una alta densidad de este receptor en neuronas, hipocampo, bulbo olfatorio, ganglios basales y cerebelo. Se encuentra en densidad moderada en corteza cerebral, amígdala e hipotálamo y en bajos niveles en tálamo y tallo cerebral (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019; Svíčenská *et al.*, 2008; Zou y Kumar, 2018).

El receptor CB<sub>1</sub> también se localiza en tejidos periféricos, como bazo, amígdalas, páncreas, hígado, corazón, próstata, útero, ovario, músculo esquelético, hueso, piel, sistema reproductor, varios tipos de células cancerígenas, tejido adiposo y tracto gastrointestinal (tanto en el sistema nervioso entérico como en células no neuronales de la mucosa intestinal) (Moreno, 2011; Zou y Kumar, 2018).

La activación de receptores CB<sub>1</sub> normalmente regula acontecimientos intracelulares como la inhibición de canales de calcio dependientes de voltaje (incluidos tipos P/Q, N y L) y el aumento de la conductancia de potasio. En neuronas, estos eventos ayudan a la reducción de excitabilidad y suprimir liberación de neurotransmisores, como GABA, glutamato y otros neuropéptidos (Moreno, 2011; Svíčenská *et al.*, 2008).

### **2.2.3.2 Receptor CB<sub>2</sub>**

Este receptor está codificado por el gen CNR2. Este receptor está formado de 360 aa en humanos. Se han identificado al menos 2 isoformas de este receptor en humanos, mientras que en ratas se han descubierto al menos 4 isoformas y 2 isoformas en ratón (Zou y Kumar, 2018).

CB<sub>2</sub> se localiza en bazo, amígdalas, células del sistema inmune (linfocitos B, monocitos y linfocitos T), sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, hígado, tejido adiposo, hueso y sistema reproductor (Zou y Kumar, 2018). También se expresa en tejido nervioso (principalmente en microglía, aunque también está presente en neuronas), en particular tras sufrir una lesión (Moreno, 2011; Svíčenská *et al.*, 2008). Este receptor se expresa en niveles mucho menores en el sistema nervioso central comparado con CB<sub>1</sub> (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019; Lu y MacKie, 2016). Se sugiere una localización postsináptica de CB<sub>2</sub> (Svíčenská *et al.*, 2008).

## **2.2.4 Endocannabinoides**

Se reconocen al menos 6 endocannabinoides (agonistas endógenos del SE): anandamida (N-araquidonoiletanolamida), 2-AG (2-araquidonilglicerol), noladin éter (2-araquidonilglicerol éter), virodamina (O-araquidonoiletanolamina), NADA (N-arachidonildopamina) y oleamida (Ruiz-Contreras y Prospero-García, 2014; Svíčenská *et al.*, 2008). Una característica de los endocannabinoides es que estos se liberan a demanda (no son almacenados en vesículas sinápticas) (Lu y MacKie, 2016).

La anandamida se une tanto a receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, aunque presenta mayor afinidad por CB<sub>1</sub>. Es un agonista de baja eficacia para ambos receptores (considerado como un agonista parcial). Este ligando se encuentra en sus más altos niveles en las regiones con mayor densidad de receptores a cannabinoides (hipocampo, estriado, cerebelo y corteza). Hay otras regiones que presentan alto nivel de anandamida, pero poca expresión de receptores, como tálamo y tronco encefálico. Se sintetiza por neuronas postsinápticas y actúa de manera retrógrada para modular la liberación de neurotransmisores en terminales presinápticas que expresan CB<sub>1</sub> (Figura 1.1) (Moreno, 2011).

Esta molécula tiene una vida media muy corta, ya que es recapturada por un transportador de alta afinidad denominado AMT (del inglés *Anandamide membrane transporter*) que no se ha caracterizado molecularmente, pero está presente en neuronas y células gliales (Moreno, 2011). La mayoría de la anandamida se produce a partir del N-araquidonil fosfatidil etanol (NAPE). Es probable que la síntesis de anandamida ocurra por diferentes vías dependiendo de la región del cerebro (se han propuesto hasta 4 rutas de síntesis de anandamida) (Lu y MacKie, 2016).

El 2-AG es ligando de receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Svíženská *et al.*, 2008). Se encuentra en mayores niveles que la anandamida y es considerado como un agonista completo de ambos receptores. Tras su liberación, puede ser recapturado por el transportador de anandamida (Moreno, 2011). La mayoría del 2-AG se produce por la hidrólisis del araquidonil que contiene fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP<sub>2</sub>) por acción de la fosfolipasa C beta (PLCβ) (hidroliza fosfolípidos), seguido de una hidrólisis del resultante diacilglicerol por la diacilglicerol lipasa (DAGL) (Lu y MacKie, 2016).

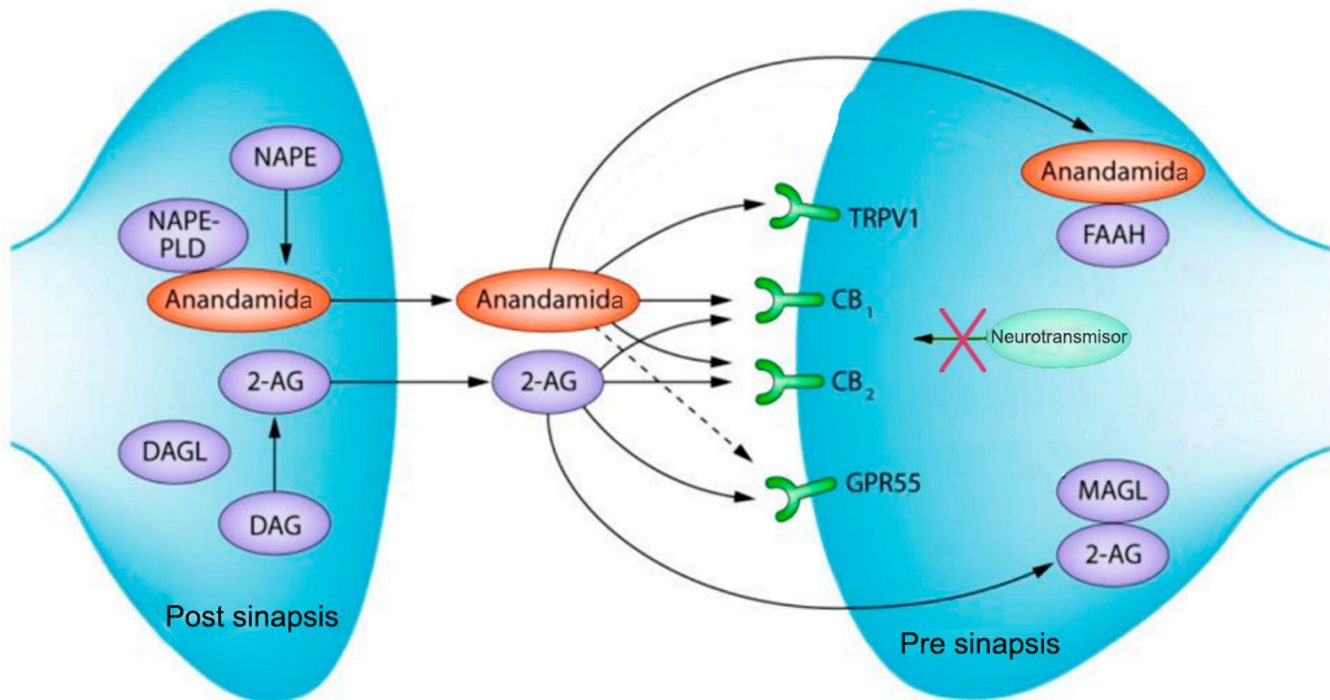
La anandamida y el 2-AG son los endocannabinoides más estudiados. Comparten la característica de que sus precursores están presentes en la membrana celular (Lu y MacKie, 2016). Ambos endocannabinoides se inactivan por hidrólisis enzimática de sus amidas y de sus uniones éster. Las enzimas responsables de esto son la FAAH (amida hidrolasa de ácidos grasos, del inglés *fatty acid amide hydrolase*) para la anandamida, dando lugar a dos compuestos, el ácido araquidónico y la etanolamina. Para el caso del 2-AG, la MAGL (monoacilglicerol lipasa) convierte al 2-AG en ácidos grasos libres: ácido araquidónico y glicerol (Moreno, 2011).

El noladin éter (NADA) tiene más afinidad por CB<sub>1</sub> que por CB<sub>2</sub>. Se encuentra en mayor cantidad en tálamo e hipocampo y es degradado por acilación (Baker *et al.*, 2003; Svíženská *et al.*, 2008).

Las propiedades farmacológicas de la virodamina han sido poco estudiadas, pero se ha observado en ratas que está presente en cerebro y tejidos periféricos que expresan receptores a cannabinoides. La virodamina es un agonista parcial de CB<sub>1</sub> y puede funcionar en ciertas condiciones como un antagonista de este receptor. Funciona como un agonista completo de CB<sub>2</sub>, por lo que se sugiere que juega un papel importante en tejidos periféricos por medio de CB<sub>2</sub> (Porter *et al.*, 2002).

La oleamida se une al receptor CB<sub>1</sub> y es degradada por la FAAH. En modelos animales se sabe que ayuda a inducir el sueño (al igual que la anandamida), disminuye la actividad motora, baja la temperatura y reduce la percepción del dolor (Herrera-Solís *et al.*, 2010). También se sabe que modula procesos de memoria, reduce la producción de AMPc, interacciona con receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>) y con el sistema inmune (Prospéro-García *et al.*, 2000).

Ciertos ligandos tienen la capacidad de activar otros receptores además de los receptores a cannabinoides. La anandamida y NADA pueden activar el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) (algunos sugieren llamarlo CB<sub>3</sub>), que es activado también por calor nocivo, pH bajo y capsaicina (Joshi y Onaivi, 2019; Moreno, 2011).

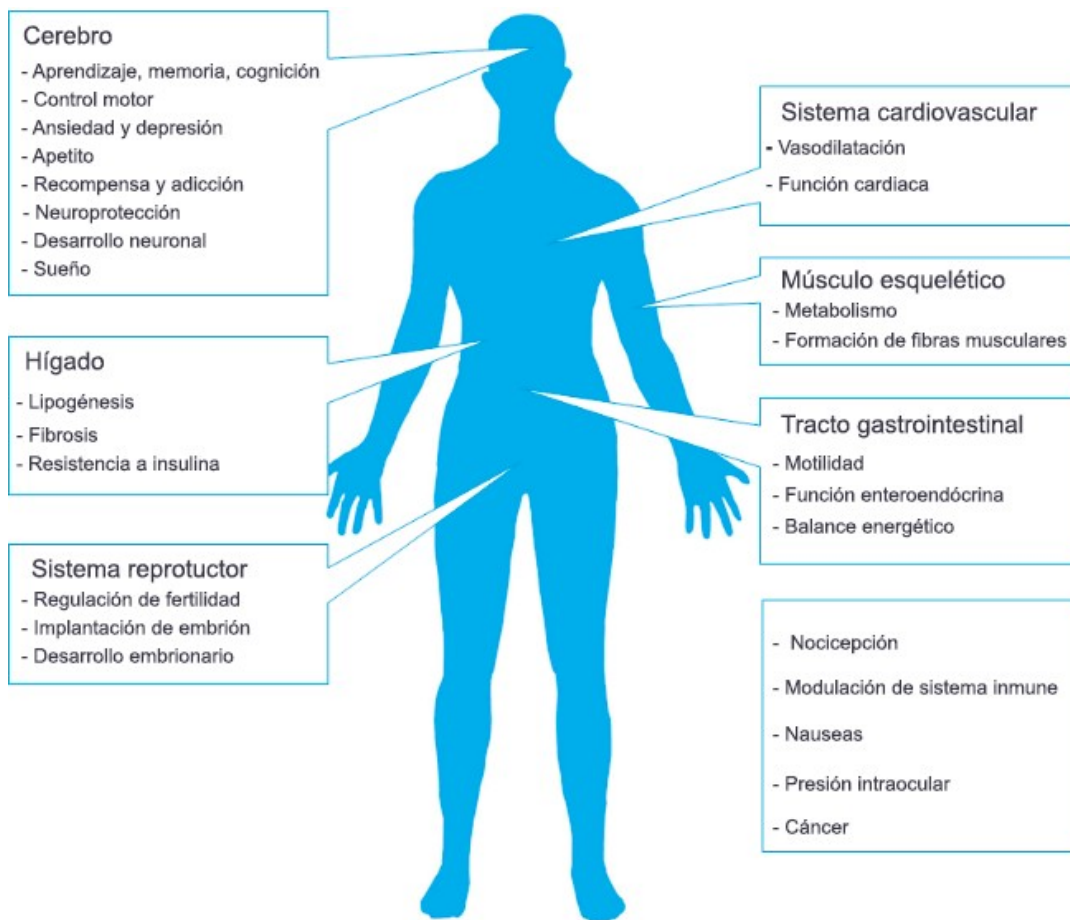


**Figura 1.1: Señalización retrógrada del Sistema Endocannabinoide.** Este mecanismo inicia con la producción bajo demanda de un endocannabinoide (como anandamida o 2-AG) en la postsinapsis en respuesta a un incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . El endocannabinoide se libera al medio extracelular por un mecanismo todavía no bien descrito y llega a la terminal presináptica donde se puede unir a distintos tipos de receptores ( $CB_1$ ,  $CB_2$  o receptores no clásicos del SE como TRPV1 y GPCR5). El caso más estudiado es la activación del receptor  $CB_1$ , donde este receptor suprime la liberación de neurotransmisores al inhibir los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje reduciendo el influjo de  $Ca^{2+}$  en la presinapsis. Se requiere de la degradación del endocannabinoide por una enzima (FAAH o MAGL) para que el mecanismo de señalización termine (Zou y Kumar, 2018). Imagen modificada de Zhou et al., 2019.

## 2.2.5 Funciones del sistema endocannabinoide

La principal función del sistema endocannabinoide en el SNC es regular la neurotransmisión sináptica (tanto en circuitos excitatorios como inhibitorios). La respuesta específica ejercida por el SE depende de la localización del receptor en el circuito neuronal (Baker *et al.*, 2003). En general, el sistema endocannabinoide lleva a cabo una regulación homeostática en el cerebro, la piel, el tracto digestivo, el hígado, el sistema cardiovascular, la función genitourinaria e incluso en hueso (figura 1.2) (Russo, 2016).

El nivel de expresión de los receptores de cannabinoides y las concentraciones de los endocannabinoides cambian durante estímulos fisiológicos y patológicos. Esto se observa claramente en el sistema nervioso central, donde este sistema actúa en respuestas adaptativas y homeostáticas en situaciones de estrés crónico, excitotoxicidad neuronal, daño o neuroinflamación. En estos casos, el sistema endocannabinoide puede ejercer una función de protección contra insultos endógenos y ambientales (Lu y MacKie, 2016; Moreno, 2011).



**Figura 1.2: Diferentes funciones reguladas por el SE en el cuerpo humano. Modificado de Zou y Kumar, 2018.**

## 2.2.6 Evolución del sistema endocannabinoide

El SE es filogenéticamente antiguo y sus componentes evolucionaron en diferentes épocas, involucrando eventos de convergencia, divergencia y de evolución paralela (McPartland, 2004; McPartland *et al.*, 2007).

La habilidad de las células para sintetizar ligandos (tipo endocannabinoides) es un fenómeno evolutivo más antiguo que la presencia de receptores (tipo CB) en las células (Elphick y Egertová, 2005). Ya en las bacterias se expresa el precursor de endocannabinoides en su membrana citoplasmática (fosfatidiletanolamina) (McPartland, 2004). Sin embargo, la habilidad de las células de producir estas moléculas no necesariamente implica que funcionen como moléculas de señalización (Elphick y Egertová, 2005). El uso de endocannabinoides para la señalización intracelular pudo ocurrir independientemente en diferentes linajes durante la evolución de eucariontes y la señalización/función de estos ligandos podría estar no relacionada a receptores endocannabinoides (como en mamíferos, donde es mediada por CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) (Elphick y Egertová, 2005; McPartland, 2004). Además, existen organismos (como *Cannabis* sp.) que no tiene receptores tipo CB, pero producen compuestos parecidos a endocannabinoides que son capaces de activar receptores CB; este es un caso de homoplasia (evolución convergente) (McPartland, 2004).

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> se originaron por un evento de duplicación genética (son parálogos\*) que ocurrió en un ancestro extinto en común de cordados (Elphick, 2012; McPartland *et al.*, 2007). *Ciona intestinalis* tiene receptores tipo CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en axones, sugiriendo un papel ancestral en la regulación neuronal (Elphick, 2012). Los eventos de duplicación genética que dieron lugar a CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> provocaron nuevas interacciones de receptores CB y ligandos que produjeron nuevas funciones fisiológicas de los endocannabinoides (McPartland *et al.*, 2007).

Los receptores a endocannabinoides inicialmente coevolucionaron con un ligando parecido a 2-AG y la afinidad a un ligando tipo anandamida evolucionó posteriormente (McPartland *et al.*, 2007). La historia evolutiva de receptores CB, en especial CB<sub>1</sub>, se correlaciona más con la historia evolutiva de la DAGL (enzima que sintetiza 2-AG) (McPartland *et al.*, 2007). Por lo tanto, es fácil especular que el receptor CB primordial era activado por 2-AG y no por anandamida, además de que 2-AG continúa exhibiendo más eficacia que anandamida en CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (McPartland, 2004). El mecanismo de señalización retrógrado de CB<sub>1</sub> ya se encuentra presente en vertebrados (Elphick, 2012).

\*= Los genes parálogos son aquellos genes homólogos encontrados en un organismo dado, derivado de un evento de duplicación genética. No confundir con genes ortólogos, los cuales son genes homólogos encontrados en diferentes organismos derivados de un descendiente en común (McPartland, 2004).

## 2.3 Estimulación Magnética Transcraneal

La Estimulación Magnética Transcraneal (EMT) es una técnica no invasiva para la estimulación eléctrica de tejido neuronal, incluyendo corteza cerebral, raíces espinales y nervios periféricos, así como nervios craneales (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003). La EMT genera un campo magnético intenso y de corta duración, creado por una corriente eléctrica fuerte circulando a través de una bobina colocada en el cuero cabelludo, penetrando hasta el tejido neuronal sin producir dolor. Si la amplitud de la corriente, duración y dirección son adecuadas, se induce en el cerebro (o raíces espinales o nervios) una corriente eléctrica que puede despolarizar o hiperpolarizar neuronas o sus axones (Rossini y Rossi, 2007).

### 2.3.1 Resumen Histórico del estudio de la EMT

Desde el siglo XX, se sabe por estudios realizados en animales no humanos, que aplicar pulsos eléctricos en tejido nervioso genera un cambio en la excitabilidad neuronal. Estos primeros experimentos no se realizaban en humanos debido a que para estimular el tejido nervioso era necesario remover el cráneo y dejar expuesto el cerebro (Klomjai *et al.*, 2015). Un gran avance hacia el desarrollo de la EMT ocurrió cuando Merton y Morton encontraron que un pulso con un voltaje eléctrico alto, aplicado sobre el cuero cabelludo, podía penetrar suficientemente la resistencia del cráneo y excitar la corteza motora. Esto abrió paso a la experimentación en sujetos normales y en pacientes. Sin embargo, este tipo de estimulación, aunque era segura, también era un poco dolorosa, sintiéndose como un golpe en la cabeza. El dolor era causado por la activación de fibras de dolor en el cuero cabelludo (Hallett, 2000). Esta técnica era conocida como Estimulación Eléctrica Transcraneal (EET). El pulso eléctrico era dado por dos electrodos colocados sobre el cuero cabelludo, conectados a un condensador cargado a 2000 V. La EET producía un espasmo en el músculo del brazo contralateral. Con esta técnica, sólo una porción de la corriente pasaba a través del cuero cabelludo y llegaba hasta la corteza (Klomjai *et al.*, 2015).

Fue en 1985 cuando la Estimulación Magnética Transcraneal (EMT) fue introducida por Anthony Barker y asociados. Esta técnica ya no causaba molestias significativas en los pacientes, aumentando las aplicaciones en la investigación. Desde la primera demostración del uso de la EMT en 1985, se ha utilizado esta técnica ampliamente para estimular nervios periféricos y tejido nervioso en estudios que investigan el control motor, desordenes de movimiento, visión, atención, memoria, lenguaje, epilepsia, depresión, infarto cerebral, dolor, plasticidad, traumatismo craneoencefálico, entre otras aplicaciones (O' Shea y Walsh, 2007). En 2008 la EMT fue aprobada para el tratamiento de depresión por la FDA. La mayoría de sus otros usos potenciales sigue en fases experimentales (López-Ibor *et al.*, 2008).

### 2.3.2 Fundamento de la técnica

La EMT se basa en el principio de inducción electromagnética. Michael Faraday demostró que cuando una corriente eléctrica pasa por un cable conductor, se genera un campo magnético variante en el tiempo (de forma perpendicular al campo eléctrico). Si un segundo cable es puesto en las cercanías, el campo magnético induce un flujo de corriente eléctrica en el segundo cable. En la EMT, el "primer cable" es la bobina estimuladora, mientras que el "segundo cable" es la región blanco del cerebro (O' Shea y Walsh, 2007).

En la EMT, un pulso de corriente eléctrica es producido en una bobina de alambre, llamada bobina magnética, la cual es colocada sobre el cuero cabelludo. La bobina genera un campo magnético que pasa perpendicularmente al plano de la bobina. El campo magnético induce a su vez un campo eléctrico perpendicular. La bobina más comúnmente utilizada en la EMT tiene una figura de 8. Las bobinas en forma de 8 son más focales, produciendo una corriente máxima en la intersección de los dos componentes redondos (Hallett, 2000). En resumen, la bobina se coloca sobre el cuero cabelludo y el campo magnético resultante pasa a través del cráneo e induce un campo eléctrico en la corteza cerebral. El efecto deseado es estimular la actividad neuronal y cambiar la excitabilidad y organización de la comunicación neuronal en la región estimulada (O'Shea y Walsh, 2007).

Los pulsos generados por la bobina en la EMT pueden ser aplicados en diferentes intensidades y frecuencias (Hz), así como en forma de pulsos únicos o a manera de pulsos repetitivos (llamada EMT repetitiva). Dependiendo de los parámetros de estimulación se determina si los efectos en la corteza son excitatorios o inhibitorios. La EMT repetitiva (EMTr) de baja frecuencia (1 Hz) tiene el efecto de reducir la excitabilidad cortical, incluso después de que los pulsos de la bobina de la EMT han terminado, mientras que la estimulación de alta frecuencia (> 5 Hz) incrementa la excitabilidad neuronal (también por periodos posteriores a la estimulación). Existe otro tipo de EMT que ha surgido recientemente, llamada estimulación de ráfaga theta, que aplica trenes de 50 Hz en ráfagas cada 200 milisegundos. Este tipo de estimulación tiene el efecto de reducir la actividad cortical por un periodo posterior a la estimulación (O'Shea y Walsh, 2007). En general la EMT de pulsos únicos es utilizada para explorar la función cerebral, mientras que la EMTr se usa para inducir cambios en la actividad cerebral que puedan durar tiempo después de la estimulación (Klomjai *et al.*, 2015).

### **2.3.3 Mecanismo de acción**

Los mecanismos exactos por los cuales la estimulación de alta y baja frecuencia trabajan son desconocidos, pero aparentemente funcionan por mecanismos parecidos a la potenciación a largo plazo (PLP) y la depresión a largo plazo (DLP) (Hallett, 2000). La PLP es definida como un incremento en la fuerza sináptica, mientras que la DLP refleja un decremento en la fuerza sináptica. Los mecanismos de la DLP son inducidos por estimulaciones de baja frecuencia en un tiempo prolongado (60 – 600 pulsos), mientras que la PLP ocurre en trenes de estimulación en altas frecuencias (Klomjai *et al.*, 2015). La DLP también se puede inducir en una situación donde la estimulación de una neurona postsináptica es seguida de la estimulación de una neurona presináptica dentro de 10 milisegundos, mientras que la PLP se puede inducir en la situación donde la estimulación de una neurona presináptica es seguida por una estimulación de una neurona postsináptica en menos de 10 milisegundos (Chervyakov *et al.*, 2015). Adicionalmente, estudios en animales tratados con EMT sugieren una modulación de neurotransmisores e inducción genética que puedan contribuir a los mecanismos de PLP y DLP (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003).

La vía y fuerza del campo eléctrico generado en el cerebro por la EMT depende de factores físicos y biológicos, como la forma y la orientación de la bobina; intensidad, frecuencia y patrón de estimulación; excitabilidad de elementos neuronales (Klomjai *et al.*, 2015). La extensión precisa de la activación neuronal es desconocida, pero se sabe que varía con la intensidad de la estimulación (Hallett, 2000).

### **2.3.4 Aplicaciones de la EMTr**

En varios estudios se ha mostrado el uso potencial de la EMTr en el tratamiento de distintas patologías. El tratamiento más estudiado de la EMTr (de alta y baja frecuencia) es su aplicación contra la depresión, observándose beneficios en hasta un 40% de los pacientes con depresión resistente a tratamientos (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003).

Las aplicaciones de la EMT en el TCE podrían ser benéficas: en el TCE hay, entre otras cosas, un desbalance en la excitabilidad neuronal provocada por la liberación de glutamato que provoca excitotoxicidad. Siendo la EMT de baja frecuencia una técnica que reduce la excitabilidad neuronal, esta podría usarse para disminuir los daños asociados al TCE. Muchos de los actuales tratamientos para el TCE son de escasa eficacia, recalcando la importancia de que surjan tratamientos adicionales para combatir los efectos adversos del TCE. La EMTr podría ser una herramienta extra para minimizar el daño secundario en un evento de TCE. Una de las mayores ventajas de la EMTr es su seguridad, la facilidad de administración y la ausencia de efectos adversos mayores. Los mayores efectos adversos reportados con la EMTr son dolores de cabeza e irritación del cuero cabelludo (Dhaliwal *et al.*, 2015).

Hay que destacar que no todos los estudios utilizan a la EMT para tratar enfermedades, sino que también tratan de buscarle más aplicaciones, como mejorar los tiempos de reacción de una persona, mejorar la memoria, aumentar la resistencia a la privación de sueño, mejorar el aprendizaje y aumentar las habilidades artísticas (Rossini y Rossi, 2007).



## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

Evaluar los cambios en la expresión de los receptores a endocannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en corteza cerebral de ratas con traumatismo craneoencefálico tratadas durante 7 días con estimulación magnética transcraneal repetitiva de 1 Hz.

### 3.2 Objetivos particulares

- Examinar los cambios en los niveles de expresión de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en corteza cerebral de ratas sin TCE inducidos por la EMTr de 1 Hz.
- Medir los niveles de receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en corteza cerebral de rata por medio de análisis de Western blot y RT-PCR.
- Inducir un traumatismo craneoencefálico en la corteza motora de ratas utilizando un modelo de caída de peso y estimar los cambios que la lesión produce en la rata, tanto a nivel físico (midiendo su peso y consumo de alimento y agua) como en su función motora (estimado por la escala NSS-r).
- Evaluar el efecto que tiene la EMTr de 1 Hz en los cambios físicos y la función motora de ratas con lesión traumática.

## 4 Justificación

El TCE es un padecimiento que afecta mundialmente a unas 69 millones de personas y es la principal causa de morbi-mortalidad en menores de 45 años (Pink *et al.*, 2019; Rovegno *et al.*, 2012). Gracias al desarrollo de nuevos tratamientos contra el TCE, se ha logrado que el índice de mortalidad disminuya de un 50% a un 20-30% en las últimas 3 décadas después de un TCE severo en países desarrollados (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019), por lo que investigar e implementar nuevas estrategias neuroprotectoras, como la EMTr y activadores del SE podrían seguir mejorando los pronósticos de los pacientes con TCE. Actualmente no existen tratamientos específicos efectivos que eliminen el daño secundario del TCE (Rovegno *et al.*, 2012).

El SE se activa en el SNC ante un TCE ejerciendo efectos neuroprotectores (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019; Magid *et al.*, 2019; Schurman y Lichtman, 2017). Ante este tipo de lesión el SE ayuda a la recuperación por distintas vías: regula respuestas inmunológicas, de inflamación y oxidación; controla la actividad de la glía; reduce cascadas de neurotoxicidad; reduce apoptosis, neurodegeneración y volumen del área lesionada; protegen contra cambios estructurales; ayuda a regular el flujo sanguíneo cerebral; auxilia contra déficits motores; induce hipotermia (baja ritmo metabólico y demanda de

oxígeno), sugiriendo que este sistema endógeno sea un blanco terapéutico para tratar daños asociados al TCE (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019; Kano *et al.*, 2009; Magid *et al.*, 2019; Pacher y Haskó, 2008; Schurman y Lichtman, 2017).

Por otro lado, la EMTr produce cambios en el cerebro que ayudan a la recuperación después de un TCE, tales como reducir la excitabilidad neuronal; modular la plasticidad sináptica (a través de mecanismos similares a la PLP y la DLP); controlar la actividad metabólica de neuronas; mejorar la función motora; reducir la inflamación y muerte neuronal; aumentar factores neuroprotectores como BDNF; aumentar la expresión de genes relacionados a neuroprotección (Ljubisavljevic *et al.*, 2015; Nardone *et al.*, 2020).

En humanos se ha confirmado que la EMTr ayuda en la mejoría de síntomas producidos por el TCE, tales como: pérdida de conciencia, deterioros cognitivos, depresión, disfunción auditiva y visual, mareos crónicos, disfunción motora, dolor de cabeza, afasias, atención visual-espacial y mejora la calidad de vida (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019), por lo que es prometedor para retrasar o revertir mecanismos de daño neuronal que surgen por el TCE. Una de las mayores ventajas de la EMTr es su seguridad, la facilidad de administración y la ausencia de efectos adversos mayores (Dhaliwal *et al.*, 2015).

Pocos estudios (y con muestras pequeñas) han utilizado la EMTr de 1 Hz para tratar el TCE, pero existe evidencia de que esta frecuencia es benéfica en el tratamiento de esta enfermedad, observándose mejoras en conducta, depresión, audición y visión (asociadas a TCE) (Chantsoulis *et al.*, 2017; Hara *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2018; Kreuzer *et al.*, 2013; Lee y Kim, 2018; Nielson *et al.*, 2015; Pachalska *et al.*, 2011). Además, se sabe que la EMTr de 1 Hz suprime el flujo sanguíneo y el metabolismo del área estimulada en la corteza motora (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003). Este último mecanismo se asemeja al efecto de la hipotermia, que es un mecanismo probado de neuroprotección ante un TCE (Estrada Rojo *et al.*, 2012). Además, se propone que la EMTr de baja frecuencia es más segura que la de alta para tratar TCE por su menor probabilidad de inducir un episodio epiléptico (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019).

Por último, se ha encontrado en modelos murinos que la EMTr ejerce al menos algunos de sus efectos por medio del SE, aumentando la expresión de CB<sub>1</sub> (Wang *et al.*, 2014a); elevando niveles de 2-AG (Fang y Wang, 2018); modificando niveles de enzimas del SE, como la DAGL, MAGL, NAPE y FAAH (Xue *et al.*, 2019); y regulando a la alta la expresión de genes relacionados al SE (Ljubisavljevic *et al.*, 2015). Estos estudios se han realizado en otras regiones del cerebro (no en corteza cerebral), con otros parámetros de estimulación y para el tratamiento de otras enfermedades (como depresión). Siendo este el primer estudio a nuestro conocimiento que relacione la EMTr (1 Hz) con el papel del SE en un modelo animal de TCE, esperamos obtener los primeros resultados que indiquen si esta frecuencia se puede utilizar para el tratamiento de TCE y el papel que juega el SE en este modelo.

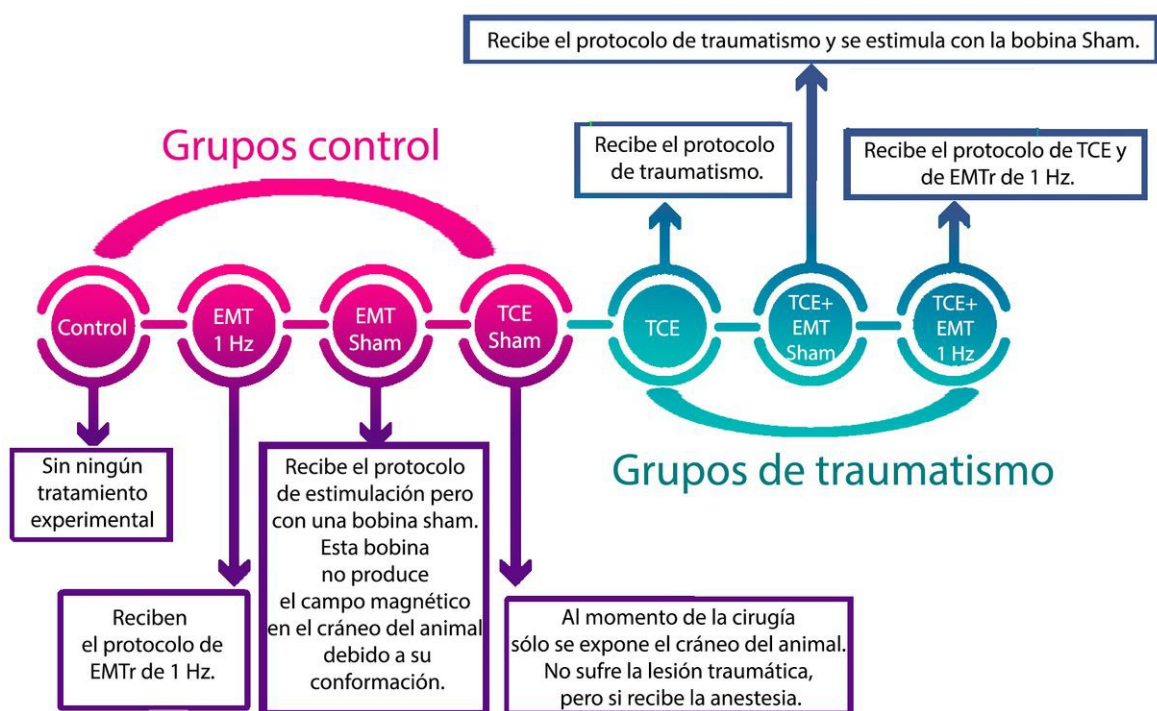
*Pregunta de investigación:* ¿Qué cambios existen en la expresión de los receptores a endocannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en corteza de cerebros de rata con traumatismo craneoencefálico tratadas con estimulación magnética transcraneal repetitiva de 1 Hz?

## 5 Hipótesis

Si se aplica una estimulación magnética transcranial de 1 Hz en la corteza de cerebros de ratas con traumatismo craneoencefálico se observará un aumento en la expresión de receptores a cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> debido al cambio de excitabilidad neuronal inducido por la EMT.

## 6 Método

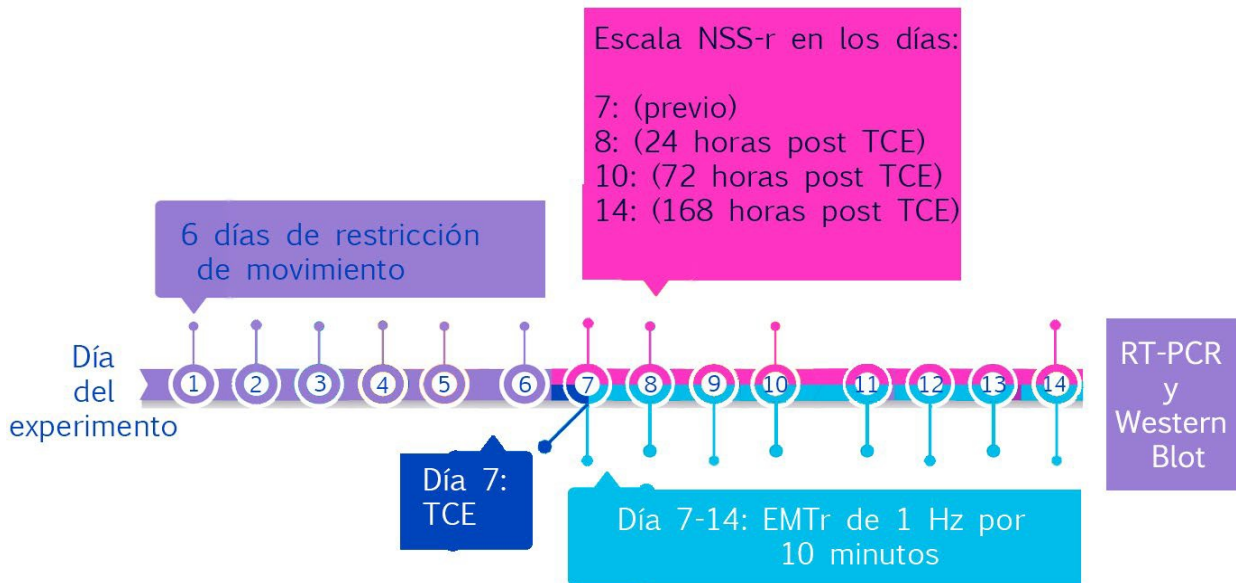
Se utilizaron 63 ratas (*Rattus norvegicus*) machos de la estirpe Wistar con un peso de aproximado de 200g. Estas ratas tenían agua de filtro y alimento *ad libitum*. Se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad (8 AM a 8 PM). Los animales se distribuyeron en 7 condiciones experimentales. Estas 7 condiciones estaban subdivididas en 2 grupos, 1) control y 2) traumatismo (Figura 6.1). La línea del tiempo del experimento se puede observar en la figura 6.2.



**Figura 6.1: Grupos y condiciones de ratas del protocolo experimental.**

Cada condición constaba de 9 ratas, de las cuales 3 se utilizaron para análisis por PCR y 6 para análisis de Western blot (mínimo número de casos para tener obtener resultados significativos y así reducir el uso de animales). Este cálculo se obtuvo mediante el software G\*Power (versión 3.1.9.2). Los cálculos se hicieron con los siguientes valores: error tipo I o error  $\alpha < 0.05$ , error tipo II o error  $\beta = 0.08$ , tamaño de efecto  $d=1$ ; arrojando la cantidad de sujetos necesarios por grupo (6 para Western blot y 3 para RT-PCR).

Los animales se obtuvieron de la unidad de bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas se alojaron en jaulas individuales de acrílico transparente con medidas de 34 cm x 24 cm x 16 cm, con camas de viruta de madera de pino blanco y tapadas con una rejilla de acero inoxidable. Recibían alimento en forma de pellets (Rodent Laboratory Chow 5001). Las condiciones del bioterio, la manipulación de animales y la metodología estaban aprobadas y seguían los lineamientos de la Comisión de Ética y Responsabilidad Científica de la Facultad de Ciencias (CEARC) y la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).



**Figura 6.2: Línea del tiempo del protocolo experimental.**

## 6.1 Restricción de movimiento

Durante 7 días previos a la EMT se restringió el movimiento de las ratas utilizando tubos de acrílico de 30 cm de largo con un diámetro de 7 cm (figura 6.3), durante 15 minutos con el objetivo de disminuir el estrés al momento de la estimulación con la bobina. Para la EMT se colocó a la rata en las mismas cajas de restricción de movimiento colocadas bajo una bobina de estimulación magnética transcraneal.



**Figura 6.3: Tubo de restricción de movimiento.** Los tubos se colocaron de esta misma manera para aplicar la EMTr.

## 6.2 Conducta NSS-r

Se evaluaron a las ratas por medio de la escala de severidad neuroconductual revisada (NSS-r) (Yarnell *et al.*, 2016), tomando en cuenta solo las 5 pruebas motoras de esta escala debido a que nuestro modelo de TCE solo se enfocó en el aspecto motor. Esta escala consistió en 5 pruebas: balance general, prueba de aterrizaje, prueba de levantamiento por la cola, prueba de arrastre y reflejos correctos. En cada prueba se puede obtener los siguientes resultados: 0 cuando se realiza la prueba de manera normal; 1 cuando se realiza la prueba parcialmente correcta; 2 para cuando se realiza la prueba de manera comprometida (sin respuesta). La escala se aplicó en los siguientes tiempos (11:00 AM): previo al TCE, 24 horas posterior al TCE, 72 horas posterior al TCE y 168 horas posterior al TCE.

## 6.3 TCE

Se produjo la lesión del TCE al día 7 del experimento a las 13:00 horas. Para el TCE se utilizó un modelo de TCE cerrado tipo "closed head injury", particularmente del tipo "weight drop model" o por caída de peso que permite tener un control fino sobre el tamaño y la profundidad de la lesión y que se circunscribe a un área cerebral reducida. Se realizó empleando un dispositivo que consta de un pistón metálico conectado a un compresor de aire con presión regulable que está adaptado a un sistema de coordenadas esterotáxicas (figura 6.4), permitiendo realizar una lesión traumática por impacto directo sobre el cráneo del animal previamente anestesiado. Para este estudio se utilizó una presión de 40 psi, a una profundidad de 6 mm; usando las coordenadas estereotáxicas anteroposterior: 2mm, lateral: -1.4mm con relación a bregma correspondiente a la corteza motora. Este procedimiento se realizó bajo anestesia (isofluorano, vía de administración por inhalación: Inducción 5% CAM, mantenimiento 2% y O2 corriente 400 a 600 ml).

Un día previo al día del TCE y un día posterior al TCE se midió el peso de los animales, así como el consumo de alimento y agua de todos los grupos de ratas.



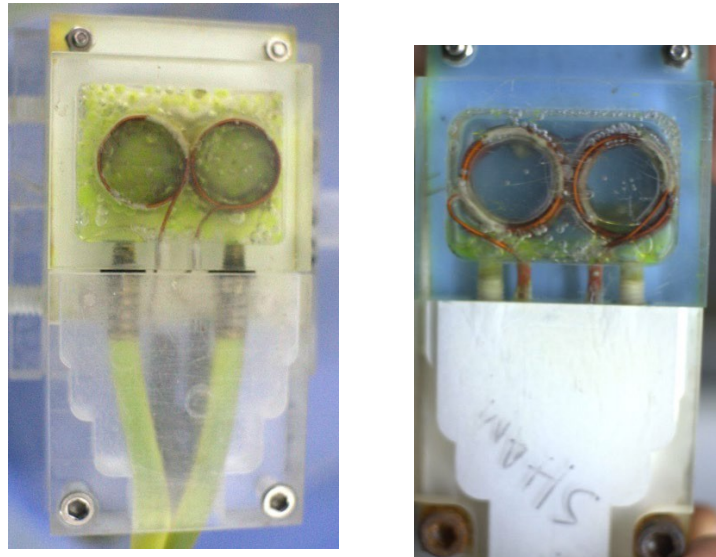
*Figura 6.4: Dispositivo con el que se realizó el TCE*

## **6.4 EMTr de baja frecuencia**

Del día 7 al día 14 del experimento se estimularon a las ratas con una frecuencia de 1 Hz y potencia del 70% del estimulador durante 10 minutos, una vez al día a las 2 PM. Para esta estimulación se utilizó un sistema electrónico (EMAGPRO 12) diseñado y desarrollado por ingenieros del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (figura 6.5). El sistema consiste en una bobina en forma de 8 (figura 6.6). Durante la estimulación las ratas permanecían en las cajas de restricción.



*Figura 6.5: Estimulador EMAGPRO 12.*



**Figura 6.6: Bobina de estimulación.** Del lado izquierdo se observa la bobina de estimulación y del lado derecho la bobina Sham, donde la disposición del cableado está arreglada de tal manera que no se genera un campo magnético

## 6.5 Extracción de estructuras

Al día 14 del experimento se sacrificaron las ratas (anestesiándolas con 150-200 mg/kg de pentobarbital sódico) y se obtuvo la corteza cerebral ipsilateral y contralateral (en relación con el TCE) para su posterior cuantificación por medio de Western blot y RT-PCR para evaluar la expresión de los receptores a endocannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Para el caso del Western blot, las estructuras cerebrales se homogenizaron inmediatamente después de ser extraídas con buffer de fosfato salino (PBS) e inhibidores de proteasas. Para el PCR las muestras de corteza se homogenizaron con TRIzol.

## 6.6 Cuantificación de receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>

### 6.6.1 Ensayo de Western Blot

Para determinar la expresión de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, se sacrificó al animal y se disecó el tejido (corteza motora), se congeló a -70°C, se homogenizó en un buffer de Tris-HCl, con inhibidores de proteasas (aprotinina 3mg/ml, DTT 1M y PMSF 13.9 mg/ml) se centrifugó a 600 g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 39,000 g por 15 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante del precipitado y se tomaron 5 µl y 2 µl respectivamente para llevar a cabo la cuantificación proteica por medio del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).



Se tomaron 60 µg de proteína del tejido y se mezcló 1:1 con buffer de cargado, se calentó la muestra a 95° C durante 5 minutos en un horno Thermolyne antes de cargar las muestras en geles de poliacrilamida adicionado con SDS (SDS-PAGE) al 7.5%.

Se llevó a cabo la electroforesis de los geles a 150 V hasta que el frente de corrida llegó a 2 mm del extremo inferior del gel (aproximadamente dos horas). Los geles resultantes fueron transferidos a una membrana de PVDF (Membrana Immobilon-P de 0.45 micras) a 150 mA, durante 1 hora a 4° C. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau S para verificar la transferencia.

La membrana pasó por 3 lavados con PBS 1X-Tween20 al 0.3%, antes de ser incubada con PBS 1X-Tween 20 al 0.3%, leche baja en grasa al 20% y suero normal de cabra al 8%, para su bloqueo, por 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó una noche a 4° C en esta solución de bloqueo y el anticuerpo anti CB<sub>1</sub> (1:500, Gene Tex) o anti CB<sub>2</sub> (1:500, Gene Tex). Pasado esto, la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS 1X-Tween 20 al 0.3% y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con PBS 1X-Tween20 al 0.3% y anticuerpo secundario (IgG anti-conejo hecho en cabra, peroxidado, Biocare) 1:2000. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.3%, por 5 minutos cada uno y un lavado con PBS 1X durante 5 minutos. La membrana se reveló con diaminobencidina (DAB) 50 mg/ml en PBS 1X + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La señal óptica generada por este ensayo se analizó por medio del programa ImageJ 1.52n, se normalizó utilizando una banda de proteína de la membrana de nitrocelulosa de la tinción de rojo de Ponceau S; el peso molecular de la banda del rojo de Ponceau S era el mismo para todos los geles, pero cada muestra era normalizada con su propio control del rojo de PonceauS.

## 6.6.2 Ensayo de RT-PCR

Este ensayo sirve para analizar la concentración de ARN, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR). Para llevar a cabo la extracción del ARN, se homogenizaron 100 mg de tejido en 1 ml de TRIzol, se le añadió 100 µl de cloroformo y se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió 250 µl de alcohol isopropílico, se centrifugó a 12,000 g durante 10 minutos y se lavó con 500 µl de etanol al 75% y se obtuvo el RNAt al centrifugarlo a 7500 g por 5 min. La integridad del RNA se confirmó en un gel de agarosa al 1%. El ARN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Para el RT-PCR se usó el kit de la compañía Accesolab (SS ONE STEP RT-PCR WITH PLATINIUM TAQ). Se tomaron 2 µg de RNAt, se aforó a 5 µl con agua estéril y se realizó el RT-PCR agregando a cada tubo con el RNA: 5 µl de agua, 12.5 µl de buffer 2x, 1 µl de sulfato de Mg 5X, 0.5 µl del oligo antisentido CB<sub>1</sub> (5'-ATGCTGTTGTCTAGAGGCTG-3'), 0.5 µl de la mezcla de oligos CB<sub>1</sub> (sentido: 5'CATCATCATCCACACGCTCAG-3' y antisentido) y 0.5 µl de RT/TAQ. Y para medir el CB<sub>2</sub> se utilizaron los oligos antisentido (5'AGAACAGGGACTAGGACAAC-3') y oligo sentido (5'-GGAGTACATGATCTTGAGTGAT-3').

Como control interno para asegurar la calidad del ARN, también amplificamos ciclofilina, utilizando los oligonucleótidos sentido 5'-AGACGCCGCTGTCTCTTTTCG-3' y antisentido 5'-CCACAC AGT CGGAGATGGTGATC-3' (Sigma-Aldrich Química). La señal óptica generada por este ensayo (análisis densitométrico) se realizó por medio del programa ImageJ 1.52n. La señal óptica se normalizo utilizando la señal generada por cada muestra en la amplificación de ciclofilina.

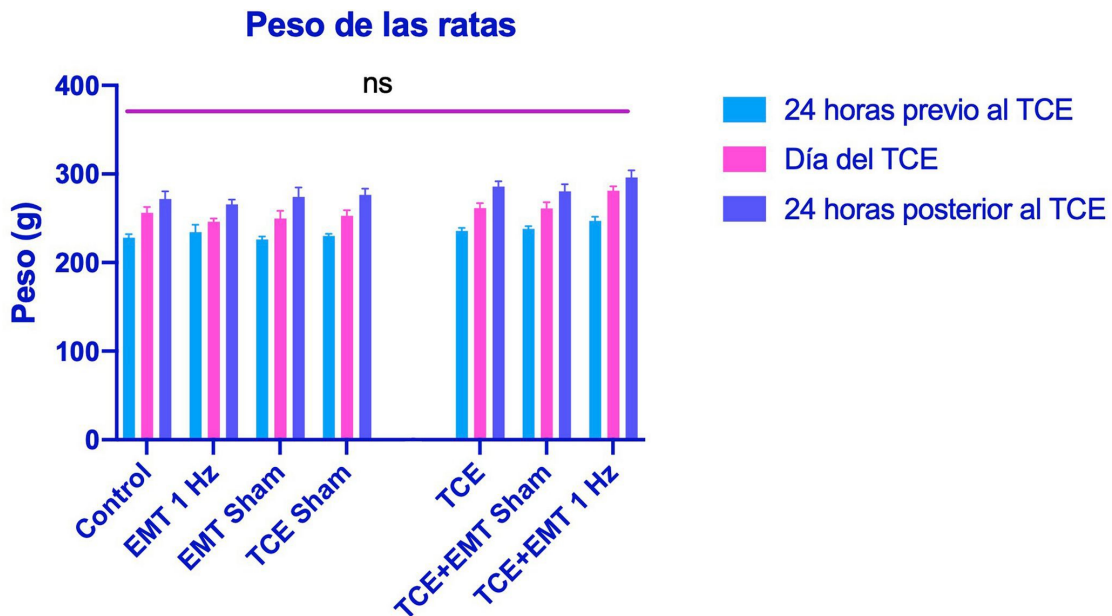


## 6.7 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para probar la distribución normal de los datos obtenidos para peso, consumo de alimento, consumo de agua, Western blot, PCR y escala NSS-r. Los resultados se reportaron como promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Las diferencias significativas fueron determinadas usando ANOVA de 2 vías de medidas repetidas y una prueba post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni-Dunn. Los valores de  $p$  menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GrahPad Prism8.4.3.

## 7 Resultados y discusión

### 7.1 Peso de los animales



**Figura 7.1. Peso de las ratas 24 horas previo al día del TCE, el día del TCE y 24 horas posterior al día del TCE. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media.**

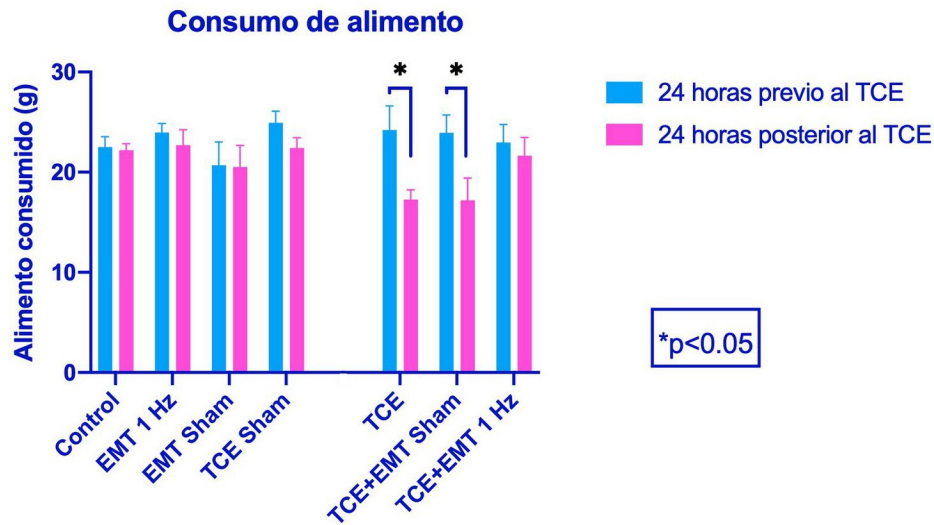
$n=9$

*ns* = no significativo.

Con el fin de comparar el efecto de la condición experimental en el peso de los animales (24 horas antes del día del trauma, en el día del trauma y 24 horas posteriores al día del trauma), se realizó una ANOVA de medidas repetidas de dos vías, No se encontró diferencia significativa en ninguno de los días a un nivel de  $p < .05$  [ $F_{(12,112)}=0.6695$ ,  $p=0.7773$ ].

El peso en todos los animales con TCE aumentó a las 24 horas posteriores al TCE. Esto no era lo esperado ya que en otros estudios de nuestro laboratorio (Estrada-Rojo *et al.*, 2018; Martínez-Vargas *et al.*, 2012; Verdugo-Díaz *et al.*, 2017) -con protocolos de TCE similares- han observado que 24 horas posterior al TCE ya se puede observar una diferencia significativa de pérdida de peso en comparación a las ratas sin TCE. Además, solamente se registró el peso de las ratas durante el día posterior a TCE. Para protocolos futuros sería interesante darle un mayor número de días al seguimiento del peso de las ratas.

## 7.2 Consumo de alimento



**Figura 7.2. Alimento consumido 24 horas previo al día del TCE y 24 horas posterior al día del TCE.**  
Promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n = 9$

Con el fin de comparar el efecto de la condición experimental en el consumo de alimento (24 horas antes del día del trauma y 24 horas posteriores al día del trauma) de las ratas, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías. Se encontraron diferencias significativas dependientes del tiempo en el consumo de alimento de las ratas [ $F_{(1,56)}=9.148$ ,  $p=0.0038$ ]. Un análisis de comparación múltiple utilizando la prueba de Bonferroni-Dunn mostró una diferencia significativa entre el consumo previo y el posterior en las condiciones de TCE ( $p=0.0400$ ) y TCE+EMT Sham ( $p=0.0484$ ).

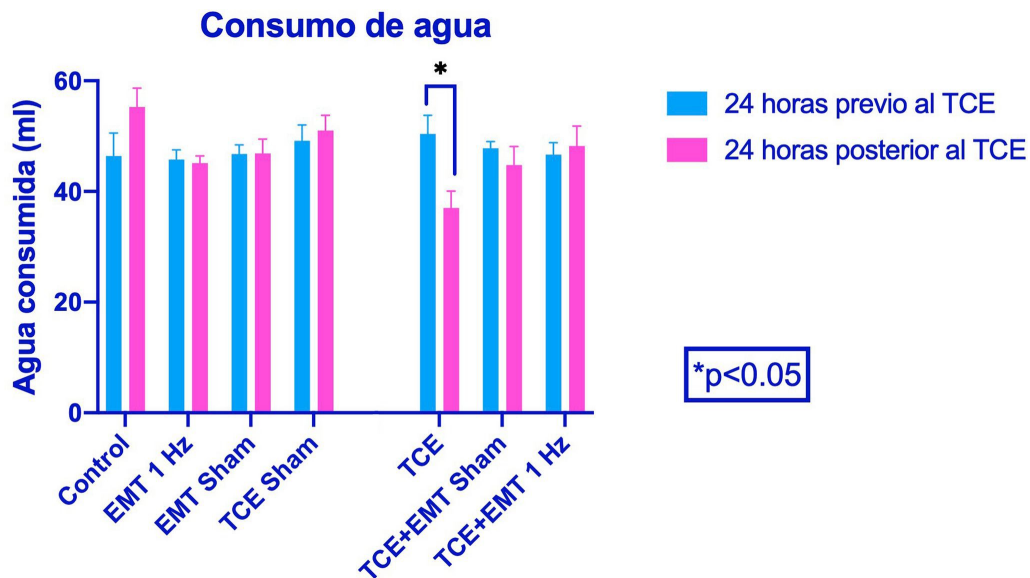
Los animales del grupo control (condiciones: control, EMT 1 Hz, EMT Sham y TCE Sham) no mostraron cambios significativos en el consumo de alimento previo y posterior al día del TCE. En cambio, los animales de los grupos de TCE (condiciones: TCE y TCE+EMT Sham) sí mostraron una diferencia significativa entre el consumo previo y posterior, observándose un consumo menor el día posterior al TCE. La condición TCE+EMT 1 Hz no muestra esta disminución de consumo de alimento, teniendo un comportamiento similar a los grupos control.

Se ha observado en un protocolo de TCE similar en nuestro laboratorio que después de un TCE existe un decremento significativo en el consumo de comida (anorexia) desde las 24 horas posterior al trauma (Martinez-Vargas *et al.*, 2012). Aunque en nuestro protocolo solamente se midió el consumo 24 horas posterior al trauma, se ha visto en otros protocolos de nuestro laboratorio que este decremento en el consumo de alimento posterior a un TCE en ratas se mantiene por días posterior al evento traumático (Martinez-Vargas *et al.*, 2012; Verdugo-Diaz *et al.*, 2017), por lo que también se debe de estudiar el consumo de alimento por más días en futuros experimentos.

Con estos resultados estamos observando un efecto positivo de la EMT de 1 Hz en el TCE: se observa que estas ratas no disminuyen su consumo de alimento de manera significativa entre su consumo previo y posterior al TCE, en comparación con las ratas de las condiciones de TCE y TCE+EMT Sham. Sería interesante registrar el consumo por más días después de la lesión traumática y ver si estos efectos se

mantiene ya que este resultado solo se registró con solo un día de estimulación de 1 Hz. Sin embargo, se ha registrado en humanos que la EMT de 1 Hz tiene efectos inmediatos en diversos protocolos de estimulación de la corteza prefrontal donde se observa el cambio del flujo sanguíneo en la región estimulada y otras regiones conectadas a esta corteza (incluyendo regiones subcorticales) con solo un tren de estimulación de unos cuantos minutos (de 6 a 30 minutos) (Kimbrell *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2003).

### 7.3 Consumo de Agua



**Figura 7.3: Agua consumida 24 horas previo al día del TCE y 24 posterior al día del TCE. Promedio  $\pm$  error estándar de la media.  $n=9$ .**

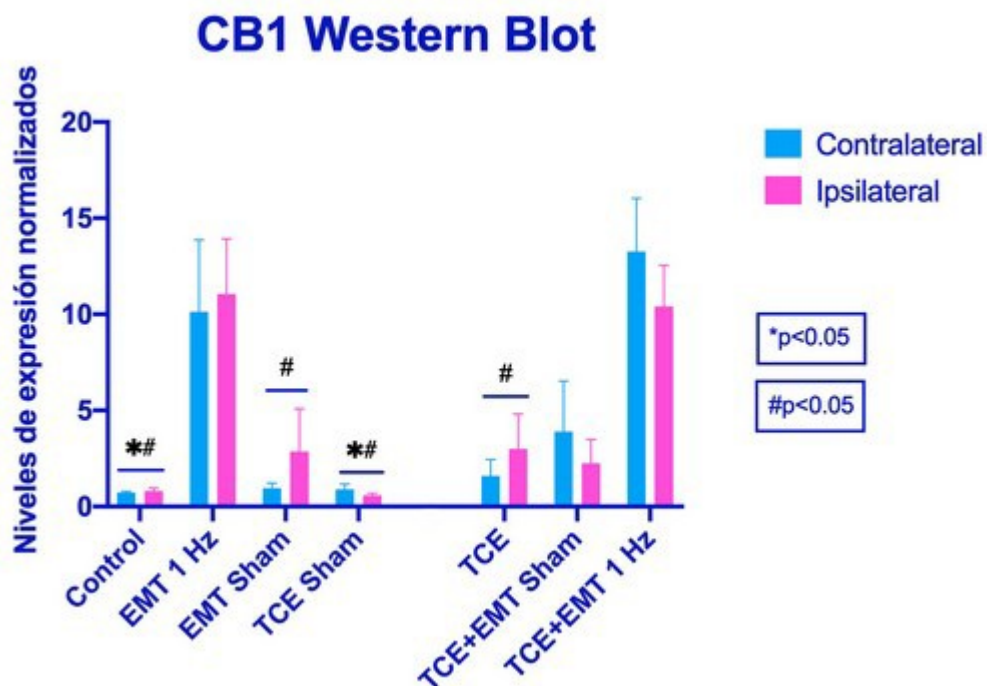
Con el fin de comparar el efecto de la condición experimental en el consumo de agua (24 horas antes del día del trauma y 24 horas posteriores al día del trauma) de las ratas, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías. Se encontraron diferencias significativas del tiempo de agua consumida de las ratas [ $F_{(1,56)}=1.608$ ,  $p=0.0043$ ]. Un análisis de comparación múltiple utilizando la prueba de Bonferroni-Dunn mostró una diferencia significativa entre el consumo previo y posterior en la condición de TCE ( $p=0.0026$ ).

En otro protocolo de TCE similar de nuestro laboratorio (Martinez-Vargas *et al.*, 2012) se ha reportado que a las 24 horas del TCE existe un decremento significativo en el consumo de agua en ratas con lesión traumática. En forma similar en nuestro experimento las ratas de la condición de TCE se observa un claro decremento en el consumo de agua. Por otro lado, se esperaba que las ratas de la condición TCE+EMT Sham también mostrarán un decremento en el consumo de agua, así como lo hicieron en el consumo de alimento. Las ratas del grupo TCE+EMT 1 Hz no mostraron diferencia significativa en su consumo de agua previo en comparación con el consumo posterior. Esto también nos indica un efecto protector de la EMT de 1 Hz a las 24 horas del TCE con un solo tren de estimulación de 10 minutos.

Como se discutió en el resultado anterior (consumo de alimento), se ha demostrado que la EMT de 1 Hz produce efectos inmediatos con solo unos minutos de estimulación (Kimbrell *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2003)

## 7.4 Western Blot

### 7.4.1 CB<sub>1</sub>



**Figura 7.4: Niveles normalizados de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en corteza de ratas en análisis de Western blot.** Promedio  $\pm$  error estándar de la media. Se muestran los datos cuantificados para la corteza contralateral (barras azules) e ipsilateral (barras rosas). Los datos con \* mostraron diferencias significativas en comparación con la condición de EMT 1 Hz. Los datos con # mostraron diferencias significativas en comparación con la condición de TCE+EMT 1 Hz. n=4

Con el fin de comparar el efecto de la condición experimental en el nivel normalizado de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en las cortezas cerebral contralateral e ipsilateral, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías. Se encontraron diferencias significativas dependientes de la condición experimental [ $F_{(6,42)}=11.88$ ,  $p<0.0001$ ]. Un análisis de comparación múltiple utilizando la prueba de Bonferroni-Dunn mostró diferencias significativas entre las siguientes condiciones:

**EMT 1 Hz** vs. control ( $p=0.0207$ ) y vs. TCE Sham ( $p=0.0202$ );

**TCE+EMT 1 Hz** vs. control ( $p=0.0065$ ); vs. TCE Sham ( $p=0.0063$ ); vs. EMT Sham ( $p=0.0189$ ) y vs. TCE ( $p=0.0269$ ).

Podemos observar que la EMT de 1 Hz produce un aumento en la expresión de los receptores CB<sub>1</sub> en ambos hemisferios de la corteza cerebral, tanto en ratas controles como en ratas con TCE. CB<sub>1</sub> está asociado a protección en demanda contra la excitotoxicidad en el SNC después de una lesión cerebral (Magid *et al.*, 2019), por lo que este aumento en la expresión en nuestro modelo en principio es algo favorable.

Pocos estudios han explorado la relación entre el receptor CB<sub>1</sub> y la EMTr, pero existe evidencia de que este receptor puede mediar al menos en parte algunos de los efectos de la EMTr. Se ha encontrado en modelos de depresión en rata que la EMTr de alta frecuencia aumenta los niveles de CB<sub>1</sub> en hipocampo (Fang y Wang, 2018; Wang *et al.*, 2014a; Xue *et al.*, 2019). Uno de los pocos estudios que utilizan EMTr de 1 Hz para observar sus efectos sobre CB<sub>1</sub> es el de Xue *et al.*, (2019), que encontró en un modelo de depresión en rata que la EMTr de 1 Hz aumenta los niveles de proteína CB<sub>1</sub> en hipocampo, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo como si lo fue con la estimulación de 5 Hz. El estudio de Xue concluye que las diferencias observadas en la expresión de CB<sub>1</sub> se deben, además de la frecuencia utilizada, a la intensidad del campo generada por la bobina (0.84 T o 1.26T), por lo que para futuras investigaciones de nuestro laboratorio se podrían explorar los efectos de la EMTr a diferentes intensidades utilizando la misma frecuencia de estimulación.

En cuanto a ratas de la condición TCE, no encontramos que la lesión produjera un aumento significativo en la expresión del receptor en comparación con la condición control. Esperábamos observar un aumento en el nivel de CB<sub>1</sub> ya que en un protocolo de nuestro laboratorio de TCE en rata se reportó un incremento en la expresión de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en el hemisferio contralateral a la lesión, 24 horas después del TCE (Martinez-Vargas *et al.*, 2013). Sin embargo, en otro modelo de TCE por caída de peso en ratón (lesión moderada) (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2015) se observó que de 24 a 72 horas posteriores al TCE hay una disminución en la corteza cerebral del receptor CB<sub>1</sub>, probablemente debido a la pérdida neuronal causada por la lesión. La regulación de CB<sub>1</sub> en el TCE todavía no es clara (Zhou *et al.*, 2019). Esta depende tanto de la naturaleza de la lesión como del tiempo al que se cuantifica el receptor; por ejemplo, este receptor puede aumentar a las 24 horas de la lesión, pero después de este tiempo puede llegar a niveles basales (Martinez-Vargas *et al.*, 2013). Por esta razón se debe medir la expresión de CB<sub>1</sub> a distintos tiempos del día del TCE, no solo a los 7 días como en nuestro protocolo.

En estudios posteriores valdría la pena estudiar qué función está jugando el SE que es regulado a la alta por la EMTr de 1 Hz en el TCE. Por ejemplo, falta por estudiar si estos receptores se están activando. Se sabe que la activación de CB<sub>1</sub> sería benéfico en un modelo de TCE al aumentar la expresión de BDNF (Wang *et al.*, 2014a), regular la respuesta inmune y mejorar la supervivencia temprana asociada al TCE (esto último en modelo clínico) (Amouzeishi y Pourbagher-Shahri, 2019). Por otro lado, usar antagonistas de CB<sub>1</sub> o usar ratones KO para este receptor genera peores secuelas después de un TCE (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2013). Además, la activación de vías de señalización relacionadas a CB<sub>1</sub> disminuyen la excitabilidad del SNC y bajan la muerte celular por medio del control de la homeostasis de glutamato, reduciendo su toxicidad (Zhou *et al.*, 2019).

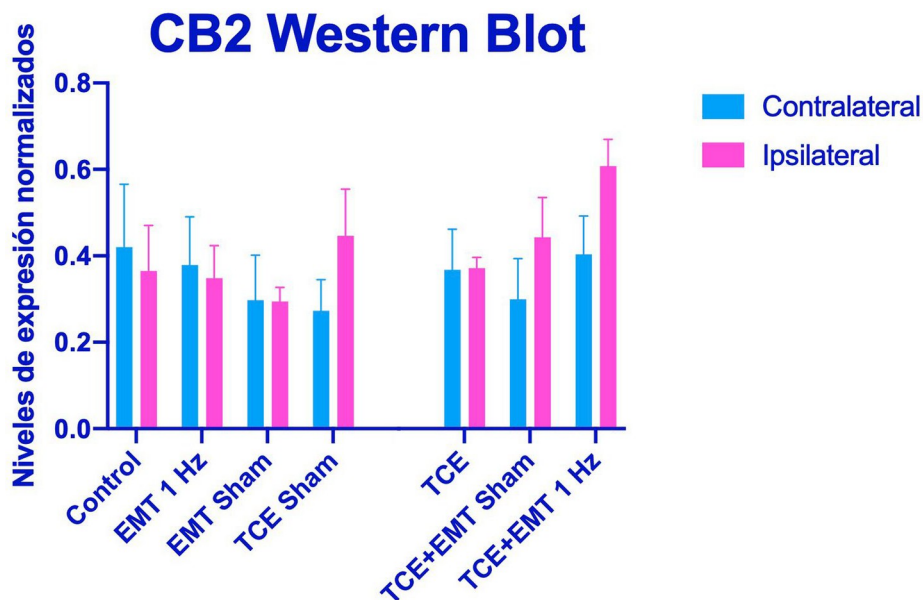
También sería interesante estudiar como la EMTr modifica otros componentes del SE además de sus receptores. Se sabe que la EMTr de alta frecuencia aumenta niveles de 2-AG y reduce niveles de MAGL en hipocampo de rata (Fang y Wang, 2018). Xue *et al* (2019) reportaron que la EMTr de 1 Hz aumenta

niveles de DAGL, NAPE (precursores de endocannabinoides) y reduce niveles de MAGL y FAAH (enzimas de degradación de endocannabinoides) en hipocampo en un modelo de depresión en rata (aunque estos efectos no son tan marcados como con la EMTr de 5 Hz). También existen otros protocolos de estimulación que generan cambios en el SE. Por ejemplo, Ljubisavljevic *et al.*, (2015) encontraron que un protocolo de iTBS (EMTr intermedia de pulsos theta – cuatro bloques de 10 pulsos a 50 Hz, repetido 20 veces en intervalos de 5 Hz-) regula a la alta genes del SE, tales como DAGLA(que codifica para la enzima de DAGL que participa en la síntesis de endocannabinoides), FAAH (que codifica para la enzima que cataliza la degradación de endocannabinoides) y CNR1 (que codifica para el receptor CB<sub>1</sub>).

En esta tesis se analizó la expresión del receptor CB<sub>1</sub> de manera general en la corteza, pero conocer más sobre la naturaleza de estos receptores que están siendo regulados por la EMT sería muy interesante, ya que el resultado y efecto de la señalización en el SE depende del tipo celular y la localización de las células blanco (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019; Schurman y Lichtman, 2017). CB<sub>1</sub> no solo se expresa en neuronas, sino que también en astrocitos, oligodendrocitos, microglía y compartimentos intracelulares como mitocondrias (Zou y Kumar, 2018). El CB<sub>1</sub> mitocondrial está asociado a neuroprotección en un modelo de rata de isquemia/reperfusión (Ma *et al.*, 2015), por lo que estudiar esta subpoblación de este receptor muestra un potencial terapéutico.

Nuestros resultados de WB deben de ser tomados con un poco de precaución, ya que anticuerpos confiables para receptores de cannabinoides han sido difíciles de construir (Ashton, 2012). Por ejemplo, Grimsey *et al.*, (2008) probaron varias marcas de anticuerpos anti CB<sub>1</sub> comerciales y observaron poca especificidad para el receptor y detección de proteínas no específicas de pesos moleculares similares al CB<sub>1</sub>. Grimsey no solo observó que las diferentes marcas de anticuerpos produjeron diferentes resultados para CB<sub>1</sub>, sino que hay resultados distintos para anticuerpos de la misma marca. En nuestro protocolo no tuvimos problemas mayores con el anticuerpo de la marca gene Tex de CB<sub>1</sub>, pero si con los anticuerpos para CB<sub>2</sub> (ver más adelante).

## 7.4.2 CB<sub>2</sub>



**Figura 7.5: Niveles normalizados de la expresión del receptor CB<sub>2</sub> en análisis de Western blot en los distintos grupos experimentales. Promedio  $\pm$  error estándar de la media. Se muestran los datos cuantificados para la corteza contralateral e ipsilateral.  $n = 4$**

Con el fin de comparar el efecto de la condición experimental en el nivel normalizado de la expresión del receptor CB<sub>2</sub> en las cortezas cerebral contralateral e ipsilateral, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías. No se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales y la expresión de receptor [ $F_{(6,21)}=1.571$ ,  $p=0.2048$ ].

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> entre los grupos en el análisis de Western blot. utilizando la marca de anticuerpos anti CB<sub>2</sub> gene Tex. La Dra. Yuying Huang de la Universidad de Texas (MD Anderson Cancer Center) en su laboratorio lleva tiempo sin encontrar anticuerpos para los receptores a cannabinoides que funcionen correctamente (comunicación personal). Otros investigadores del evento: Society for Neuroscience 2019 (Chicago) han tenido problemas al realizar Western blots de receptores a endocannabinoides (comunicación personal). Debido a esto, concluimos que los resultados de WB para CB<sub>2</sub> no son confiables.

CB<sub>2</sub> muestra un problema similar al de CB<sub>1</sub>, donde producir anticuerpos confiables para este receptor es una tarea difícil (Ashton, 2012). Además, CB<sub>2</sub> está mucho menos estudiado que CB<sub>1</sub> (Joshi y Onaivi, 2019). Es probable que en condiciones experimentales este receptor sufra de modificaciones e interactúe con otras proteínas. Así puede encontrarse que el epítipo esté cubierto y eso no permita que los anticuerpos puedan unirse en ciertas conformaciones específicas del receptor (por ejemplo, cuando se activa o se oligomeriza) (Grimsey *et al.*, 2008). En otros modelos experimentales se ha observado que los anticuerpos para CB<sub>2</sub> pueden marcar otro tipo de proteínas con peso molecular similar (Marchalant *et al.*, 2014). Es importante estudiar más este receptor para realizar anticuerpos



más adecuados a las condiciones experimentales, ya que es poco probable que un solo anticuerpo detecte todas las especies de este receptor (modificaciones post-traduccionales, variantes de splicing, oligómeros y productos de degradación) (Grimsey *et al.*, 2008). Por esta razón es importante que al realizar un Western blot para CB<sub>2</sub> en condiciones novedosas, hay que buscar si este receptor se encuentra en otras bandas del Western blot debido a la expresión de isoformas del receptor (Marchalant *et al.*, 2014).

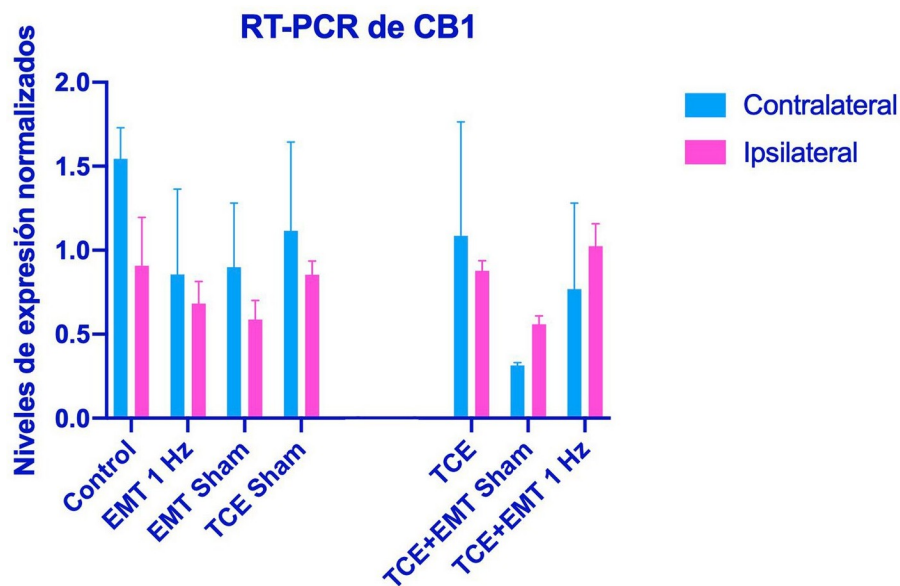
Atwood y MacKie (2010) proponen que para obtener mejores resultados en el estudio de receptores CB<sub>2</sub> se deben incorporar técnicas farmacológicas (que dependen de la especificidad de las drogas usadas), bioquímicas (Western blot y PCR, donde se deben mostrar tejidos de controles positivos como bazo y preferentemente utilizar 2 o más anticuerpos contra distintos epítomos), anatómicas (hibridación *in situ* para informar qué células expresan CB<sub>2</sub>) e inmunohistoquímica (para identificar localización precisa de CB<sub>2</sub>).

Sin embargo, se esperaba que los niveles de CB<sub>2</sub> aumentaran con el TCE ya que este receptor se expresa en mayores niveles después de algún estímulo patológico, como neuroinflamación (Lopez-Rodriguez *et al.*, 2013, 2015). En un modelo de TCE (moderado) en rata de nuestro laboratorio (Martinez-Vargas *et al.*, 2013) se encontró un aumento de CB<sub>2</sub> en la corteza cerebral 24 horas posterior a la lesión. De manera similar, Lopez-Rodriguez, Acáz-Fonseca, *et al.*, (2015) reportan un aumento de CB<sub>2</sub> en corteza cerebral 24 horas post TCE (moderado) por caída de peso, en ratón. Estos autores encontraron en su modelo experimental un aumento en CB<sub>2</sub>, pero un decremento en CB<sub>1</sub> en la corteza cerebral. Esto se podría explicar porque CB<sub>1</sub> se expresa principalmente en neuronas y después de un TCE hay una pérdida de estas células; mientras que la mayor expresión de CB<sub>2</sub> después del TCE podría explicarse por la activación y proliferación de la microglía.

CB<sub>2</sub> regula muchos procesos patológicos causados por el TCE, por lo que se considera un blanco terapéutico. Este receptor funciona como mediador de mecanismos endógenos neuroprotectores que se expresan posterior a un TCE: tiene un papel importante en la regulación de la inflamación, reduce apoptosis, disminuye disrupción de la BHE, reduce edema cerebral y activación de microglía/macrófagos (Amenta *et al.*, 2012; Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019; Magid *et al.*, 2019; Schurman y Lichtman, 2017; Zhou *et al.*, 2019).

## 7.5 RT-PCR

### 7.5.1. RT-PCR de CB<sub>1</sub>



**Figura 7.6: Niveles normalizados de la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en análisis de RT-PCR en los distintos grupos experimentales.** Promedio  $\pm$  error estándar de la media. Se muestran los datos cuantificados para la corteza contralateral e ipsilateral.  $n = 3$

Con el fin de comparar el efecto de la condición experimental en el nivel normalizado de la expresión del mRNA del receptor CB<sub>1</sub> en las cortezas cerebral contralateral e ipsilateral, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías. No se observaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales y la expresión del mensajero del receptor [ $F_{(6,28)}=0.4416$ ,  $p=0.8446$ ].

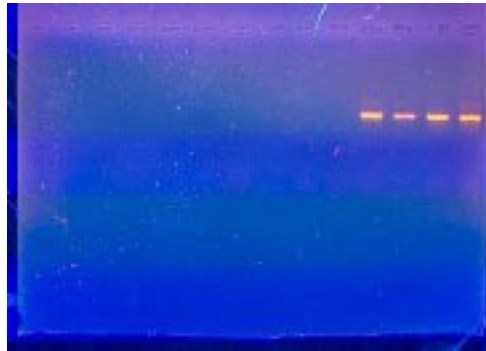
En este análisis no se encontraron resultados consistentes. Creemos que probablemente los niveles de RNA se normalizaron a los 7 días del TCE, que fue cuando extrajimos la corteza para el PCR. Sería conveniente volver a analizar estos resultados, pero extrayendo la corteza a diferentes tiempos; inmediatamente después del TCE y a diferentes días posteriores al TCE. Por ejemplo, López-Rodríguez y Acaz-Fonseca (2015) encontraron que posterior a un TCE los niveles de mRNA de CB<sub>1</sub> disminuyen significativamente a comparación de ratas control en cerebro de rata a las 24 y 72 horas de la lesión, pero a las 2 semanas esta diferencia ya no era significativa. La disminución en el mRNA de CB<sub>1</sub> se podría explicar por la pérdida de neuronas que causa el TCE. Por otro lado, el mismo estudio observó que los niveles de mRNA de CB<sub>2</sub> aumentan después de un TCE. Este aumento se observa paulatinamente desde las 24 horas hasta las 2 semanas (máximo de expresión).

Por otro lado, es posible que la EMTr regule niveles de expresión de RNA de CB<sub>1</sub>. Xue *et al.*, (2019) observaron que un tren de EMTr de 5 Hz aumenta la expresión de mRNA de CB<sub>1</sub> en neuronas y astrocitos derivados de hipocampo de ratas. Es probable que la EMTr modifique la expresión de RNA de CB<sub>1</sub>, en

especial porque hay evidencia que puede aumentar la expresión de proteína de CB<sub>1</sub> en modelos animales (ver discusión de Western blot CB<sub>1</sub>), pero hay poca investigación en esta área.

### 7.5.2. RT-PCR de CB<sub>2</sub>

El PCR de CB<sub>2</sub> no se pudo realizar ya que los oligonucleótidos no funcionaron. Sabemos que no fue problema de las muestras ya que el control positivo de esta prueba (ciclofilina) si mostró amplificación, mientras que CB<sub>2</sub> no mostró ninguna amplificación (figura 7.7).

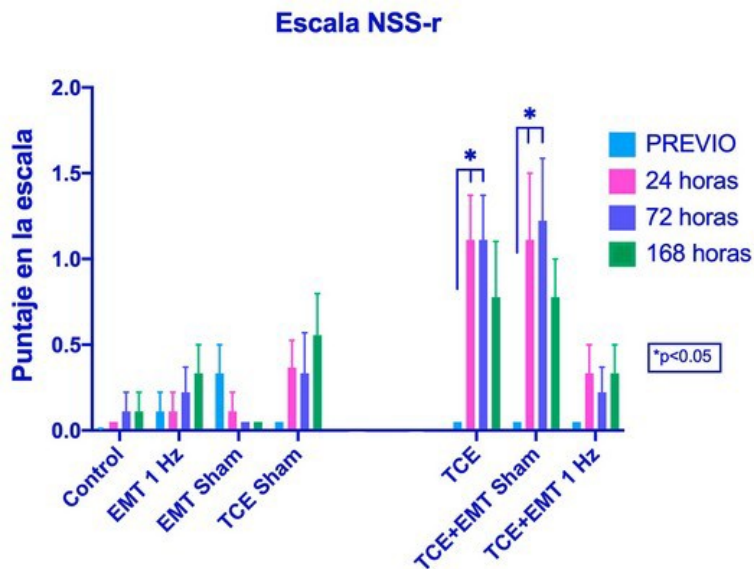


**Figura 7.7: PCR de CB<sub>2</sub>.** Del lado derecho se observa la amplificación de ciclofilina (control positivo). Del lado izquierdo del gel se encontraban las muestras amplificadas para CB<sub>2</sub>, pero no pudimos obtener señal alguna.

Atwood y Mackie (2010) hacen énfasis en la dificultad histórica de detectar CB<sub>2</sub> en SNC: en un inicio se pensaba que CB<sub>2</sub> era un receptor que no se expresaba en tejido nervioso debido a que muchos experimentos fallaban en detectar niveles de mRNA en varias regiones del cerebro, tanto de ratas como en humanos.

De nuevo, CB<sub>2</sub> está mucho menos estudiado que CB<sub>1</sub> y se desconoce mucho de la estructura genética de CNR2 y de su regulación (Joshi y Onaivi, 2019). Las discrepancias de tamaños de mRNA de CB<sub>2</sub> en la literatura indican una estructura genética incompleta de CNR2 en diferentes especies o polimorfismos en la misma especie (Liu *et al.*, 2009).

## 7.6 Escala NSS-r



**Figura 7.8: Puntaje en la escala NSS-r.** Un puntaje más alto significa una peor condición de la rata. Promedio  $\pm$  error estándar de la media. Las barras muestran el puntaje obtenido en cada condición en los 4 tiempos en que se midió la escala: previo (antes del TCE), 24 horas (24 horas posterior al TCE), 72 horas (72 horas posterior al TCE) y 168 horas (168 horas posterior al TCE).  $n=9$

Se realizó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías para comparar el efecto de la condición de las ratas en el puntaje obtenido en la escala NSS-r en los tiempos: previo (día del traumatismo), 24 horas (24 horas después del día del TCE), 72 horas (72 horas después del día del TCE) y 168 horas (168 horas después del día del TCE). Se encontraron diferencias significativas en la interacción de las condiciones y el puntaje en la escala en los distintos tiempos a un nivel de  $p < .05$  [ $F_{(18,168)}=3.073$ ,  $p < 0.0001$ ]. Un análisis de comparación múltiple utilizando la prueba de Bonferroni-Dunn mostró diferencias significativas entre las siguientes condiciones: **TCE:** Previo vs. 24 horas ( $p < 0.0151$ ) y previo vs. 72 horas ( $p < 0.0151$ ) y **TCE+EMT Sham:** Previo vs. 24 horas ( $p < 0.0489$ ) y previo vs. 72 horas ( $p < 0.0451$ ).

En otros protocolos de TCE de nuestro laboratorio (Estrada-Rojo *et al.*, 2018; Martínez-Vargas *et al.*, 2012; Verdugo-Díaz *et al.*, 2017) hemos comprobado que nuestro modelo de TCE causa deterioros (neurológicos y motores) utilizando la escala neuroconductual de Hunter (Hunter *et al.*, 2000). En este experimento, al utilizar la escala NSS-r (Yarnell *et al.*, 2016) (la cual busca ser un método estandarizado para evaluar las consecuencias funcionales posterior a un TCE en roedores) observamos una relación entre la condición física de la rata y su capacidad de llevar a cabo las tareas de la escala. Las ratas de las condiciones de TCE y TCE+EMT Sham mostraron (a las 24 y 72 horas) un deterioro significativo en sus habilidades motoras (observándose como un puntaje más alto en las escalas). Este deterioro no se observó en las ratas de la condición TCE+EMT 1 Hz, con lo que sugerimos que la EMT de 1 Hz impide el deterioro motor asociado al TCE desde las 24 hasta las 72 horas.

## 7.7 DISCUSIÓN GENERAL

### 7.7.1 Papel Neuroprotector del Sistema Endocannabinoide

El papel neuroprotector del SE mediado por receptores CB<sub>1</sub> se ha comprobado en otros protocolos murinos de TCE, donde al administrar 2-AG y anandamida se observa una protección contra el déficit neurológico medido con la escala NSS-r; al utilizar ratones Knock-out de CB<sub>1</sub> no se observan mejoras en la escala NSS-r cuando se administra 2-AG exógeno (Schurman y Lichtman, 2017). De manera similar, en modelos animales de isquemia se ha observado un incremento en la neurotoxicidad mediada por NMDA, aumento en la mortalidad y peor puntuación en escala neurológica en ratones knock-out para CB<sub>1</sub> (Pacher y Haskó, 2008).

Uno de los mecanismos celulares que explican los efectos neuroprotectores de CB<sub>1</sub> es la activación de vías celulares citoprotectoras, por ejemplo, la vía de PIK3/Akt, la cual media la protección en neuronas contra excitotoxicidad y aumento en la expresión de BDNF mediados por CB<sub>1</sub> (Blázquez *et al.*, 2015). Estudiar si esta vía es activada por la EMTr de 1 Hz podría explicar algunos de los efectos neuroprotectores de la EMT en nuestro modelo.

Existen otros mecanismos neuroprotectores mediados por CB<sub>1</sub> que se podrían estudiar en protocolos similares en un futuro. Hay evidencia de una interacción entre CB<sub>1</sub> y NMDA, lo que permite a CB<sub>1</sub> regular la actividad de NMDA y proteger células neuronales contra la excitotoxicidad (Zou y Kumar, 2018). CB<sub>1</sub> mitocondrial también es otro componente que valdría la pena estudiar en futuros experimentos de TCE: estos receptores (localizados en dendritas y terminales axónicas) afectan la función de la mitocondria y modulan procesos celulares bioenergéticos (Joshi y Onaivi, 2019). Considerando que el fallo metabólico inducido por el TCE causa muchos procesos que deterioran el tejido neuronal (McGinn y Povlishock, 2016), este receptor mitocondrial podría ser un blanco muy importante en la patología del TCE.

Aunque se tuvieron problemas en la cuantificación de CB<sub>2</sub>, es muy probable que este receptor también juegue un papel en los efectos neuroprotectores observados en la escala NSS-r. En otros experimentos se ha observado que al utilizar un agonista de CB<sub>2</sub> en un modelo murino de TCE se pueden observar mejoras significativas en la locomoción y comportamiento exploratorio (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019). Además, se ha estudiado en modelos murinos de TCE el papel de CB<sub>2</sub> en la neuronainflamación por medio de agonistas y se ha observado que este receptor atenúa la polarización de macrófagos pro-inflamatorios M1, incrementa la polarización de macrófagos anti inflamatorio M2, reduce el desarrollo de edema y produce mejoras neuroconductuales (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019).

Otra posibilidad de estudio son otros sistemas de neurotransmisión que son regulados por el SE. Por ejemplo, se sugiere que existen cambios a largo plazo en la función del sistema glutamatérgico después de administrar cannabinoides en modelos de TCE animales (Schurman y Lichtman, 2017). Además, CB<sub>1</sub>

modula la transmisión de otros sistemas como GABA, glicina, acetilcolina, norepinefrina, dopamina y serotonina (Pacher y Haskó, 2008).

Es importante determinar la ventana terapéutica en que el SE produce de manera más eficiente sus efectos neuroprotectores. En un estudio con rata se ha visto que la activación temprana (hasta 3 horas después del TCE) del SE por medio del uso de fármacos (HU-211) resulta en mejores efectos protectores que una activación tardía (Shohami *et al.*, 2009). Otro cannabinoide que se ha estudiado para producir efectos neuroprotectores es el THC, el cual se ha visto en ratón que protege contra daño excitotóxico del SNC si se administra antes (hasta 7 días antes) o después (hasta 3 días después) de la lesión (Assaf *et al.*, 2011). Dentro de esta ventana terapéutica también se debe evaluar si hay condiciones donde pueda resultar perjudicial la activación del SE. Por ejemplo, 2-AG puede activar CB<sub>1</sub> localizado en astrocitos, llevando a la liberación de glutamato (Zou y Kumar, 2018), lo cual podría promover el daño excitotóxico.

Aunque la evidencia en modelos animales de la manipulación del SE para el tratamiento del TCE es amplia, no existe un tratamiento que explote estas ventajas en pacientes clínicos. Existen pocos cannabinoides que se han tratado de implementar como un tratamiento novedoso en el TCE. Entre estos está el Dexamabinol o **HU211**, el cual no ha producido efectos positivos en pacientes clínicos (tiene efectos similares al placebo), aunque en ratas si mostraba mejoras posteriores al TCE (Maas *et al.*, 2006; Shohami *et al.*, 2009). Es importante resaltar que este cannabinoide sintético no activa ni se une a los receptores cannabinoides, por lo que es importante reconsiderar la clasificación de los cannabinoides (Schurman y Lichtman, 2017).

Sin embargo, existe evidencia de que algunos cannabinoides, como el KN38-7271 (agonista de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>) y THC (agonista de CB<sub>1</sub>) podrían funcionar en pacientes con TCE. Un estudio retrospectivo (3 años) de uso de THC en pacientes con TCE severo se observó una menor mortalidad en aquellos pacientes positivos al uso de THC (Nguyen *et al.*, 2014). En un estudio en ratón se ha demostrado que el THC activa la vía de PIK3/Akt en varias regiones del cerebro (Zou y Kumar, 2018). Como se discutió antes, esta vía protege contra el daño excitotóxico, pero hay poca investigación que muestre evidencia del uso de este compuesto como un auxiliar en el TCE. Por otro lado, en un estudio clínico de fase 2 se administró KN38-7271 en pacientes con TCE severo dentro de las primeras 4.5 horas de la lesión. Este cannabinoide fue asociado a una mayor supervivencia en el grupo experimental hasta 1 mes después de la lesión, además de que este grupo experimental presentó menos casos severos de presión intracraneal y mejor perfusión cerebral (Firsching *et al.*, 2012).

Por último, la amplia distribución del SE limita su aplicación terapéutica, por lo que es importante conocer y manipular este sistema en una manera condición-específica; se debe hacer una caracterización completa de ligandos y receptores del SE, así como sus enzimas y receptores como consecuencia de un TCE (Schurman y Lichtman, 2017; Zou y Kumar, 2018).

## 7.7.2 Papel de la EMTr en el TCE

La EMTr puede ser benéfica para el tratamiento de TCE y muestra potencial en el tratamiento de síntomas relacionados al TCE. Sin embargo, la literatura en el asunto sigue en su infancia y no hay datos para sacar conclusiones definitivas sobre la eficacia de la EMTr en el tratamiento del TCE (Pink *et al.*, 2019).

En humanos se han observado beneficio en el tratamiento de varias sintomatologías producidas por el TCE al utilizar EMTr: dolores de cabeza, mareos, dolores crónicos, depresión, mejoras en cognición, afasia, atención visual-espacial, recuperación de desórdenes de conciencia, recuperación motora, y alucinaciones auditivas. Existe el problema que en estos estudios los tamaños de muestra son pequeños (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019).

En estudios animales de TCE se ha probado que la EMTr reduce degeneración, inflamación, muerte neuronal, regula activación de glía, promueve mejoras funcionales y favorece la recuperación motora (Nardone *et al.*, 2020; Yoon *et al.*, 2015).

Casi todos estos efectos positivos se han observado y/o estudiado solamente con estimulación de alta frecuencia (Nardone *et al.*, 2020), aunque hay otras frecuencias utilizadas que generan efectos positivos. En nuestro laboratorio se ha observado que ratas con TCE tratados con EMTr de frecuencias intermedias (2 Hz) producen una recuperación conductual y mejoras histológicas (Verdugo-Diaz *et al.*, 2017).

En humanos se ha observado que la EMTr de 1 Hz combinada con EMTr de 6 Hz produce mejoras en inteligencia, atención, memoria lógica y mejoras conductuales en un paciente de 26 años con TCE (Nardone *et al.*, 2020). También en humanos con TCE se ha probado que la EMTr de 1 Hz produce mejoras en depresión inducida por la lesión traumática (Nardone *et al.*, 2020).

Se hipotetiza que estos efectos positivos se generan por un remodelamiento de la actividad neuronal anormal después de un TCE, haciendo posible generar estrategias que aumenten la rehabilitación. Además, la EMTr podría bajar la hiperexcitabilidad cortical que ocurre frecuentemente tras un TCE, modular la plasticidad sináptica a largo plazo y evitar consecuencias plásticas maladaptativas (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003; Nardone *et al.*, 2020).

Adicionalmente, otros estudios han demostrado ciertos efectos inducidos por la EMT que podrían resultar en una mayor recuperación del daño secundario de un TCE. Estudios en humanos han detectado supresión o incremento cerebral en el flujo sanguíneo y metabolismo en el área estimulada después de estimulaciones de baja (1 Hz) o alta (10-20 Hz) intensidad en la corteza motora, respectivamente (Kobayashi y Pascual-Leone, 2003). Por ejemplo, Kimbrell *et al.*, (2002) encontraron en pacientes que estimular 30 minutos con 1 Hz la corteza prefrontal izquierda induce un decremento del metabolismo de glucosa. Speer *et al.*, (2000) observaron que 10 estímulos diarios a 1 Hz sobre la corteza prefrontal reducen el flujo sanguíneo cerebral, mientras que 20 Hz aumenta el flujo. Esto es consistente con otros estudios donde se observa que la EMTr de 1 Hz disminuye la excitabilidad cerebral produciendo efectos inhibitorios en el cerebro (Klomjai *et al.*, 2015). Contrario a esto, Li *et al.*, (2004) registraron un incremento inmediato del flujo sanguíneo (aumento en actividad) en la corteza prefrontal al aplicar estimulación con trenes de 7 minutos a 1 Hz en pacientes con depresión.

Del mismo modo, Loo *et al.*, (2003) encontraron que 1 Hz (por 6 minutos) aumenta el flujo en la corteza y en regiones más profundas. Estudiar más como la EMTr de 1 Hz modifica el flujo sanguíneo cerebral podría generar terapias contra traumatismos, por ejemplo, generando una condición parecida a la hipotermia (neuroprotectora) o aumentando el flujo sanguíneo a regiones cerebrales que no estén teniendo una perfusión correcta.

El contraste y variabilidad que existe en estos estudios (y en muchas otras áreas de la EMTr) se puede deber a diferencias en los protocolos de estimulación: intensidad, número de pulsos, forma y dimensiones de la bobina, localización de bobina y estado del animal (anestesiado, despierto) (Klomjai *et al.*, 2015; Pink *et al.*, 2019; Rajan *et al.*, 2017). Además, los efectos de EMTr son influenciados por morfología neuronal, células gliales, neurogenesis, diferenciación celular y proliferación, mecanismos apoptóticos, concentraciones de neurotransmisores, ATP y factores neurotróficos, metabolismo de glucosa y la expresión de ciertos genes (Chervyakov *et al.*, 2015). Todas estas variables generan resultados distintos en protocolos de estimulación similares, por lo que debe ser importante comparar los efectos de un protocolo específico de EMTr en diferentes condiciones y regiones del cerebro (Müller-Dahlhaus y Vlachos, 2013).

También es difícil explicar los fenómenos observados con la EMTr cuando no se conoce exactamente el mecanismo de acción de esta técnica. El uso terapéutico de EMTr está asociado a un cambio en la excitabilidad cortical (Müller-Dahlhaus y Vlachos, 2013). Este cambio se manifiesta como alteraciones en la plasticidad neuronal por medio de procesos similares a la PLP y DLP (Chervyakov *et al.*, 2015). A partir de estos procesos de PLP y DLP, se trata de explicar los otros cambios en la célula observados con la EMTr, como los cambios genéticos, cambios en la modulación de neurotransmisores, efectos en la expresión de AMPA/NMDA, efectos neuroprotectores, reducción de estrés oxidativo e inflamación, activación de factores neurotróficos, etc. (Chervyakov *et al.*, 2015; Rajan *et al.*, 2017). Por lo general se considera que la PLP es inducida por EMTr de alta frecuencia y la DLP es inducida por la EMTr de baja frecuencia (Lefaucheur, 2019). Tanto en la PLP y DLP participa NMDA y producen un incremento intracelular de  $Ca^{2+}$ , pero con la diferencia que en la PLP el incremento es rápido, mientras que en la DLP se induce un incremento pequeño y lento de  $Ca^{2+}$  (Chervyakov *et al.*, 2015; Klomjai *et al.*, 2015).

Debido a esta interacción de la EMTr con receptores NMDA se debe estudiar más cómo modular este receptor en el contexto del TCE y buscar la manera que se evite propagar el daño citotóxico mediado por este receptor. Esta interacción de EMTr con NMDA está más estudiada en EMTr de alta frecuencia (Rajan *et al.*, 2017). Para investigar más sobre la función de NMDA en la EMTr se podría utilizar en conjunto con fármacos bloqueadores de este receptor (Chervyakov *et al.*, 2015).

Por otro lado, es posible que la EMTr no genere cambios en la excitabilidad neuronal, pero si module la habilidad de las neuronas a expresar plasticidad sináptica. Esto es conocido como metaplasticidad y describe la habilidad de neuronas a cambiar su estado en la dirección, magnitud y duración de futuros cambios sinápticos (Müller-Dahlhaus y Vlachos, 2013). Entonces la EMTr puede ser una herramienta para modular o restablecer la habilidad de neuronas a expresar plasticidad sináptica bajo condiciones patológicas (Müller-Dahlhaus y Vlachos, 2013).



Estos cambios plásticos dependerán, además de la frecuencia utilizada, del ritmo de disparo, la sumación temporal y espacial de los inputs a nivel presináptico y del nivel de actividad de la neurona postsináptica. Esto último es importante, ya que lesiones y enfermedades del SNC pueden generar cambios en la actividad de cierta región cortical. Entonces, los efectos de la estimulación cortical pueden diferir en pacientes sanos y con alguna enfermedad (Lefaucheur, 2019).

Por otro lado, se sabe que la EMTr favorece la producción de BDNF, el cual está involucrado en supervivencia neuronal después de un daño al SNC, neurogenesis, migración y diferenciación de neuronas, crecimiento de dendritas y axones y formación de sinapsis. El aumento de BDNF se ha estudiado con EMTr de alta frecuencia, por lo que sería interesante estudiar qué pasa con este factor en la EMTr de baja frecuencia en el contexto de una lesión traumática, en especial porque la producción de BDNF podría explicar efectos benéficos neuroprotectores y neuroplásticos (Chervyakov *et al.*, 2015; Nardone *et al.*, 2020).

Puede que existan otros mecanismos de acción no clásicos producidos por la EMTr. Esto se cree por los fenómenos que generan los campos magnéticos en sistemas físicos, químicos y biológicos, aunque no se han probado en el contexto de la EMTr. Entre efectos podrían estar: cambios en proteínas magnetosensibles (como proteínas de la familia de criptocromo CRY) y efectos en macromoléculas/organelos (provocando cambios en orientación espacial en estos, alterando su función) (Chervyakov *et al.*, 2015). Además, puede haber efectos directos o indirectos en células gliales, mitocondria, depósitos intracelulares de calcio, buffers de calcio, factores de transcripción-traducción, receptores metabotrópicos y otras estructuras celulares y moleculares (Müller-Dahlhaus y Vlachos, 2013).

La mayoría de los estudios se han enfocado a frecuencias altas, pero hay interés en 1 Hz por considerarse como una alternativa más segura al ser menos probable que induzca epilepsia y puede ser igual de efectiva que la alta frecuencia (Loo *et al.*, 2003; Pink *et al.*, 2019). Existe el riesgo teórico de aumentar excitabilidad neuronal (en especial con EMTr de alta frecuencia) y provocar convulsiones en pacientes con TCE. Sin embargo, se han reportado pocos efectos secundarios menores en los pacientes tratados, como dolores de cabeza, mareos y fatiga (Pink *et al.*, 2019).

Para utilizar la EMTr en futuros protocolos de investigación y/o tratamientos para pacientes con TCE se deben establecer medidas de seguridad como el número máximo de estímulos en una sesión. Antes de iniciar el tratamiento, cada paciente debe de pasar por criterios previos, como historial de convulsiones, administración de medicamentos que bajen el umbral de convulsiones o que tengan implantes metálicos. Sin embargo, la naturaleza heterogénea del TCE hace que no sea realista tener un solo protocolo óptimo para el tratamiento de TCE. Por ejemplo, se han utilizado protocolos de estimulación similares y se generan respuestas y procesos bioquímicos diferentes en los pacientes. Esto puede deberse al tiempo que pasa después del TCE, localización de trauma, severidad, comorbilidades, variaciones en la zona cortical estimulada y diferentes protocolos de posicionamiento de la bobina (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019).

### 7.7.3 Final

El TCE es un problema de salud pública importante por su alta incidencia en población activa (Rovegno *et al.*, 2012). Es importante continuar buscando alternativas y medidas de rehabilitación ante un TCE. En países desarrollados ha habido una reducción de 50% a 20-30% en mortalidad después de un TCE severo que se ha logrado gracias a toda la investigación de las últimas 3 décadas (Amouzeshi y Pourbagher-Shahri, 2019). Es difícil estudiar el TCE ya que es heterogéneo en su etiología, presentación clínica, severidad y patología (Schurman y Lichtman, 2017). Sin embargo, la EMTr y la manipulación del SE muestran ser herramientas prometedoras para controlar el daño secundario asociado al TCE. Además, la EMTr tiene la ventaja de administrarse fácilmente al tejido nervioso, a diferencia de los fármacos donde se debe observar si estos llegan al tejido afectado (Schurman y Lichtman, 2017).

## 8 Conclusiones

Por medio del ensayo de Western blot encontramos que 7 días de EMTr de 1 Hz aplicada en cerebros de ratas con TCE, fue capaz de aumentar la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en la corteza cerebral. Este aumento de receptor también se observó en ratas control tratadas con EMTr de 1 Hz. Los Westerns blot de CB<sub>2</sub> no se pudieron realizar de manera correcta al no encontrar un anticuerpo confiable para este receptor. Los análisis de PCR tampoco se pudieron realizar de manera correcta.

El protocolo de TCE causó en las ratas un deterioro a las 24 horas en el consumo de alimento y agua, pero no empeoró el peso de los animales. Con un solo día de EMTr de 1 Hz se observaron efectos positivos en el consumo de alimento y agua en las ratas con TCE a las 24 horas de la lesión.

El deterioro motor fue significativo en las ratas con TCE desde las 24 hasta las 72 horas. La escala NSS-r mostró que la EMTr de 1 Hz fue capaz de prevenir el daño motor asociado a las ratas con TCE. Este resultado, junto con el de alimento y agua, nos muestran que la EMTr de baja frecuencia puede impedir el deterioro físico y motor inducido por el TCE. Esto es consistente con el aumento de CB<sub>1</sub> inducido por la EMTr, ya que este receptor juega un papel neuroprotector en esta patología (Magid *et al.*, 2019).

La EMTr muestra potencial para el tratamiento del TCE. Tanto este estudio como otras investigaciones en modelos humanos y murinos han encontrado mejoras en distintas sintomatologías producidas por esta enfermedad (Nardone *et al.*, 2020; Pink *et al.*, 2019).

La mayoría de los estudios se han enfocado a frecuencias altas. Este es el único estudio a nuestro conocimiento que muestra evidencia que aplicar 7 días de EMTr de 1 Hz puede ser utilizada para aumentar la expresión del receptor CB<sub>1</sub> en corteza de rata con TCE y generar una mejora en la conducta motora de ratas con lesión traumática.

## 9 Abreviaturas y Glosario

2-AG = 2-araquidonilglicerol

AMPA = ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPC = AMP cíclico

AMT = Transportador de membrana de anandamida

BHE = barrera hematoencefálica

CB<sub>1</sub> = Receptor cannabinoide tipo 1

CB<sub>2</sub> = Receptor cannabinoide tipo 2

CBD = cannabidiol

DAGL = diacilglicerol lipasa; enzima que participa en la síntesis de 2-AG

DLP = depresión a largo plazo

EET = Estimulación Eléctrica Transcraneal

EMT = Estimulación magnética transcraneal

EMTr = Estimulación magnética transcraneal repetitiva

ERN = especies reactivas de nitrógeno

ERO = especies reactivas de oxígeno

FAAH = amido hidrolasa de ácidos grasos; enzima que degrada anandamida

GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GCS = Escala de Coma de Glasgow

GPCR = receptores acoplados a proteínas G

MAGL = monoacilglicerol lipasa; enzima que degrada 2-AG

NADA = N-arachidonildopamina

NAPE = N-araquidonil fosfatidil etanol; precursor de anandamida

NMDA = N-metil-D-aspartato

NSS-r = escala de severidad neuroconductual revisada

PIC = Presión intracraneal

PIP<sub>2</sub> = fosfatidil inositol bi-fosfato

PLC  $\beta$  = fosfolipasa C beta

PLP = potenciación a largo plazo

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SE = Sistema endocannabinoide

SNC = Sistema Nervioso Central

TCE = traumatismo craneoencefálico

## 10 Referencias

- Amenta, P. S., Jallo, J. I., Tuma, R. F. y Elliott, M. B. (2012). A cannabinoid type 2 receptor agonist attenuates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in a murine model of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 90(12), 2293 – 2305.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.23114>
- Amouzesi, A. y Pourbagher-Shahri, A. M. (2019). Effects of endocannabinoid system, synthetic and nonsynthetic cannabinoid drugs on traumatic brain injury outcome: a narrative review. *Journal of Surgery and Trauma*, 7(1), 3 – 14. <https://doi.org/10.32592/jsurgery.2019.7.1.101>
- Ashton, J. C. (2012). The use of knockout mice to test the specificity of antibodies for cannabinoid receptors. *Hippocampus*, 22(3), 643 – 644. <https://doi.org/10.1002/hipo.20946>
- Assaf, F., Fishbein, M., Gafni, M., Keren, O. y Sarne, Y. (2011). Pre- and post-conditioning treatment with an ultra-low dose of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) protects against pentylentetrazole (PTZ)-induced cognitive damage. *Behavioural Brain Research*, 220(1), 194 – 201.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.005>
- Atwood, B. K. y MacKie, K. (2010). CB 2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 160, Issue 3, pp. 467 – 479). Br J Pharmacol.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x>
- Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G. y Thompson, A. J. (2003). The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurology*, 2(5), 291 – 298. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00381-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00381-8)
- Bárcena-Orbe, A., Rodríguez-Arias, C. A., Rivero-Martín, B., Cañizal-García, J. M., Mestre-Moreiro, C., Calvo- Pérez, J. C., Molina-Foncea, A. F. y Casado-Gómez, J. (2006). Revisión del traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía*, 17(6), 495–518.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130147306703141>
- Blázquez, C., Chiarlone, A., Bellocchio, L., Resel, E., Pruunsild, P., García-Rincón, D., Sendtner, M., Timmusk, T., Lutz, B., Galve-Roperh, I. y Guzmán, M. (2015). The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death and Differentiation*, 22(10), 1618 – 1629. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.11>
- Cabrera Rayo, A., Martínez Olazo, Ó., Ibarra Guillén, A., Morales Salas, R., Laguna Hernández, G. y Sánchez Pompa, M. (2009). Traumatismo craneoencefálico severo. *Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int*, 23(2), 94–101. [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com)
- Cardonne, M. M., Font, L. P. y Gómez, A. M. (2014). La neuroprotección en la isquemia cerebral: potencialidades del campo magnético. *Investigación y Saberes*, 3(1), 1–20.
- Chantsoulis, M., Pótrola, P., Góral-Pótrola, J., Hajdukiewicz, A., Supiński, J., Kropotov, J. D. y Pachalska, M. (2017). Application of ERPs neuromarkers for assessment and treatment of a patient with chronic crossed aphasia after severe TBI and long-term coma – Case report. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(1), 141 – 147.  
<https://doi.org/10.5604/12321966.1232770>
- Charry, J. D., Cáceres, J. F., Salazar, A. C., López, L. P. y Solano, J. P. (2019). Trauma craneoencefálico. Revisión de la literatura. *Revista Chilena de Neurocirugía*, 43(2), 177–182.  
<https://doi.org/10.36593/rev.chil.neurocir.v43i2.82>
- Chervyakov, A. V., Chernyavsky, A. Y., Sinitsyn, D. O. y Piradov, M. A. (2015). Possible mechanisms

- underlying the therapeutic effects of transcranial magnetic stimulation. *Frontiers in Human Neuroscience*, 9(June), 1 – 14. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00303>
- Clarke, R. C. y Merlin, M. D. (2013). *Cannabis : evolution and ethnobotany*. University of California Press.
- Dhaliwal, S. K., Meek, B. P. y Modirrousta, M. M. (2015). Non-invasive brain stimulation for the treatment of symptoms following traumatic brain injury. *Frontiers in Psychiatry*, 6(AUG), 1 – 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00119>
- Doyle, K. P., Simon, R. P. y Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310 – 318. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.005>
- Elphick, M. R. y Egertová, M. (2005). The Phylogenetic Distribution and Evolutionary Origins of Endocannabinoid Signalling. In *Cannabinoids* (Issue 168, pp. 283 – 297). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_9](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_9)
- Elphick, Maurice R. (2012). The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 367, Issue 1607, pp. 3201 – 3215). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0394>
- Estrada-Rojo, F., Morales-Gomez, J., Coballase-Urrutia, E., Martinez-Vargas, M. y Navarro, L. (2018). Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage. *BMC Research Notes*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3258-0>
- Estrada Rojo, F., Morales Gómez, J., Tabla Ramón, E., Solís Luna, B., Navarro Argüelles, H. A., Martínez Vargas, M., Pérez Arredondo, A., González Rivera, R., Rodríguez Salazar, L. E. y Navarro, L. (2012). Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 55(4), 16–29. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422012000400004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422012000400004)
- Fang, G. y Wang, Y. (2018). Effects of rTMS on Hippocampal Endocannabinoids and Depressive-like Behaviors in Adolescent Rats. *Neurochemical Research*, 43(9), 1756 – 1765. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2591-y>
- Firsching, R., Piek, J., Skalej, M., Rohde, V., Schmidt, U. y Striggow, F. (2012). Early survival of comatose patients after severe traumatic brain injury with the dual cannabinoid CB1/CB2 receptor agonist KN38-7271: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *Journal of Neurological Surgery, Part A: Central European Neurosurgery*, 73(4), 204 – 216. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304815>
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E. y Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. In *Neurología* (Vol. 27, Issue 5, pp. 301 – 310). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
- Gertsch, J., Pertwee, R. G. y Di Marzo, V. (2010). Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - Do they exist? *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 523 – 529. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00745.x>
- Ghajar, J. (2000). Traumatic brain injury. *The Lancet*, 356, 923 – 929.
- Gould, J. (2015). The cannabis crop. *Nature*, 525(7570), S2 – S3. <https://doi.org/10.1038/525S2a>
- Grimsey, N. L., Goodfellow, C. E., Scotter, E. L., Dowie, M. J., Glass, M. y Graham, E. S. (2008). Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created

- equal! *Journal of Neuroscience Methods*, 171(1), 78 – 86.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.02.014>
- Hallett, M. (2000). Transcranial magnetic stimulation and the human brain. *Nature*, 406(July), 147 – 150.
- Hara, T., Abo, M., Sasaki, N., Yamada, N., Niimi, M., Kenmoku, M., Kawakami, K. y Saito, R. (2017). Improvement of higher brain dysfunction after brain injury by repetitive transcranial magnetic stimulation and intensive rehabilitation therapy. *NeuroReport*, 28(13), 800 – 807.  
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000830>
- Herrera-Solís, A., Vásquez, K. G. y Prospéro-García, O. (2010). Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95(1), 106 – 112. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.12.014>
- Hunter, A. J., Hatcher, J., Virley, D., Nelson, P., Irving, E., Hadingham, S. J. y Parsons, A. A. (2000). Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*, 39(5), 806 – 816.  
[https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00262-2)
- Jain, K. K. (2008). Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discovery Today*, 13(23 – 24), 1082 – 1089. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.09.006>
- Jones, W., Silkworth, W., Dusto, N., Pelak, V. S., Berliner, J., Buard, I. y Kluger, B. (2018). Central Visual Oscillopsia. *Cognitive And Behavioral Neurology*, 31(2), 86 – 95.  
<https://doi.org/10.1097/WNN.0000000000000151>
- Joshi, N. y Onaivi, E. S. (2019). Recent Advances in Cannabinoid Research. *Recent Advances in Cannabinoid Research*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73801>
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M. y Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. In *Physiological Reviews* (Vol. 89, Issue 1, pp. 309 – 380). <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>
- Kimbrell, T. A., Dunn, R. T., George, M. S., Danielson, A. L., Willis, M. W., Repella, J. D., Benson, B. E., Herscovitch, P., Post, R. M. y Wassermann, E. M. (2002). Left prefrontal-repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) and regional cerebral glucose metabolism in normal volunteers. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 115(3), 101 – 113. [https://doi.org/10.1016/S0925-4927\(02\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0925-4927(02)00041-0)
- Klomjai, W., Katz, R. y Lackmy-Vallée, A. (2015). Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS). *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 58(4), 208 – 213. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2015.05.005>
- Kobayashi, M. y Pascual-Leone, A. (2003). Transcranial magnetic stimulation in neurology. *Lancet Neurology*, 2(3), 145 – 156. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00321-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00321-1)
- Kreuzer, P. M., Landgrebe, M., Frank, E. y Langguth, B. (2013). Repetitive transcranial magnetic stimulation for the treatment of chronic tinnitus after traumatic brain injury: A case study. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 28(5), 386 – 389.  
<https://doi.org/10.1097/HTR.0b013e318254736e>
- Laursen, L. (2015). Botany: The cultivation of weed. *Nature*, 525(7570), S4 – S5.  
<https://doi.org/10.1038/525S4a>
- Lee, S. A. y Kim, M. K. (2018). Effect of low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on depression and cognition of patients with traumatic brain injury: A randomized controlled trial. *Medical Science Monitor*, 24, 8789 – 8794. <https://doi.org/10.12659/MSM.911385>

- Lefaucheur, J. P. (2019). Transcranial magnetic stimulation. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 160, pp. 559 – 580). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64032-1.00037-0>
- Li, X., Nahas, Z., Kozel, F. A., Anderson, B., Bohning, D. E. y George, M. S. (2004). Acute left prefrontal transcranial magnetic stimulation in depressed patients is associated with immediately increased activity in prefrontal cortical as well as subcortical regions. *Biological Psychiatry*, *55*(9), 882 – 890. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.01.017>
- Liu, Q. R., Pan, C. H., Hishimoto, A., Li, C. Y., Xi, Z. X., Llorente-Berzal, A., Viveros, M. P., Ishiguro, H., Arinami, T., Onaivi, E. S. y Uhl, G. R. (2009). Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): Identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes, Brain and Behavior*, *8*(5), 519 – 530. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00498.x>
- Ljubisavljevic, M. R., Javid, A., Oommen, J., Parekh, K., Nagelkerke, N., Shehab, S. y Adrian, T. E. (2015). The Effects of Different Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) Protocols on Cortical Gene Expression in a Rat Model of Cerebral Ischemic-Reperfusion Injury. *PLOS ONE*, *10*(10), e0139892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139892>
- Loo, C. K., Sachdev, P. S., Haindl, W., Wen, W., Mitchell, P. B., Croker, V. M. y Malhi, G. S. (2003). High (15 Hz) and low (1 Hz) frequency transcranial magnetic stimulation have different acute effects on regional cerebral blood flow in depressed patients. *Psychological Medicine*, *33*(6), 997 – 1006. <https://doi.org/10.1017/S0033291703007955>
- López-Ibor, J. J., López-Ibor, M. I. y Pastrana, J. I. (2008). Transcranial magnetic stimulation. *Current Opinion in Psychiatry*, *21*(6), 640 – 644. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e3283136a0c>
- Lopez-Rodriguez, A. B., Acas-Fonseca, E., Viveros, M. P. y Garcia-Segura, L. M. (2015). Changes in cannabinoid receptors, aquaporin 4 and vimentin expression after traumatic brain injury in adolescent male mice. Association with edema and neurological deficit. *PLoS ONE*, *10*(6), 1 – 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128782>
- Lopez-Rodriguez, A. B., Siopi, E., Finn, D. P., Marchand-Leroux, C., Garcia-Segura, L. M., Jafarian-Tehrani, M. y Viveros, M. P. (2013). CB1 and CB2 cannabinoid receptor antagonists prevent minocycline-induced neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *Cerebral Cortex*, *25*(1), 35 – 45. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht202>
- Lu, H. C. y MacKie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. In *Biological Psychiatry* (Vol. 79, Issue 7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Ma, L., Jia, J., Niu, W., Jiang, T., Zhai, Q., Yang, L., Bai, F., Wang, Q. y Xiong, L. (2015). Mitochondrial CB1 receptor is involved in ACEA-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/srep12440>
- Maas, A. I. R., Murray, G., Henney, H., Kassem, N., Legrand, V., Mangelus, M., Muizelaar, J. P., Stocchetti, N. y Knoller, N. (2006). Efficacy and safety of dexanabol in severe traumatic brain injury: Results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Lancet Neurology*, *5*(1), 38 – 45. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70253-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70253-2)
- Magid, L., Heymann, S., Elgali, M., Avram, L., Cohen, Y., Liraz-Zaltsman, S., Mechoulam, R. y Shohami, E. (2019). Role of CB2 Receptor in the Recovery of Mice after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, *36*(11), 1836 – 1846. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6063>
- Marchalant, Y., Brownjohn, P. W., Bonnet, A., Kleffmann, T. y Ashton, J. C. (2014). Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody



- Specificity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 62(6), 395 – 404. <https://doi.org/10.1369/0022155414530995>
- Martinez-Vargas, M., Estrada Rojo, F., Tabla-Ramon, E., Navarro-Argüelles, H., Ortiz-Lailzon, N., Hernández-Chávez, A., Solis, B., Martínez Tapia, R., Perez Arredondo, A., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Nava-Talavera, K. y Navarro, L. (2012). Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat. *Neuroscience Letters*, 529(2), 118–122. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.09.037>
- Martinez-Vargas, M., Morales-Gomez, J., Gonzalez-Rivera, R., Hernandez-Enriquez, C., Perez-Arredondo, A., Estrada-Rojo, F. y Navarro, L. (2013). Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 23341 – 23355. <https://doi.org/10.3390/ijms141223341>
- McGinn, M. J. y Povlishock, J. T. (2016). Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. In *Neurosurgery Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2016.06.002>
- McPartland, J. M. (2004). Phylogenomic and chemotaxonomic analysis of the endocannabinoid system. In *Brain Research Reviews* (Vol. 45, Issue 1, pp. 18 – 29). Brain Res Brain Res Rev. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.11.005>
- McPartland, J. M., Norris, R. W. y Kilpatrick, C. W. (2007). Coevolution between cannabinoid receptors and endocannabinoid ligands. *Gene*, 397(1 – 2), 126 – 135. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.017>
- Mehta, R. y Chinthapalli, K. (2019). Glasgow coma scale explained. *The BMJ*, 365(May), 1 – 7. <https://doi.org/10.1136/bmj.l1296>
- Moreno, P. G. (2011). Sistema endocannabinoide. *Neurofarmacología Contemporánea*, 301–324. <https://doi.org/10.1016/b978-84-8086-875-4.50013-6>
- Müller-Dahlhaus, F. y Vlachos, A. (2013). Unraveling the cellular and molecular mechanisms of repetitive magnetic stimulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6(DEC), 1 – 7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00050>
- Nardone, R., Sebastianelli, L., Versace, V., Brigo, F., Golaszewski, S., Manganotti, P., Saltuari, L. y Trinka, E. (2020). Repetitive transcranial magnetic stimulation in traumatic brain injury: Evidence from animal and human studies. In *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.016>
- Nguyen, B. M., Kim, D., Bricker, S., Bongard, F., Neville, A., Putnam, B., Smith, J. y Plurad, D. (2014). Effect of marijuana use on outcomes in traumatic brain injury. *American Surgeon*, 80(10), 979 – 983. <https://doi.org/10.1177/000313481408001015>
- Nielson, D. M., McKnight, C. A., Patel, R. N., Kalnin, A. J. y Mysiw, W. J. (2015). Preliminary guidelines for safe and effective use of repetitive transcranial magnetic stimulation in moderate to severe traumatic brain injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 96(4), S138 – S144. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2014.09.010>
- O’ Shea, J. y Walsh, V. (2007). Transcranial magnetic stimulation. *Current Biology*, 17(6), 196 – 199. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.030>
- 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.
- Pachalska, M., Łukowicz, M., Kropotov, J. D., Herman-Sucharska, I. y Talar, J. (2011). Evaluation of

- differentiated neurotherapy programs for a patient after severe TBI and long term coma using event-related potentials. *Medical Science Monitor*, 17(10), 120 – 128.  
<https://doi.org/10.12659/MSM.881970>
- Pacher, P. y Haskó, G. (2008). Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 252 – 262.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707582>
- Pain, S. (2015). A potted history. *Nature*, 525(7570), S10 – S11. <https://doi.org/10.1038/525S10a>
- Parikh, S., Koch, M. y Narayan, R. k. (2007). Traumatic brain injury. *International Anesthesiology Clinics*, 45(3), 119 – 135.
- Pink, A. E., Williams, C., Alderman, N. y Stoffels, M. (2019). The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) following traumatic brain injury (TBI): A scoping review. In *Neuropsychological Rehabilitation* (pp. 1 – 27). Routledge.  
<https://doi.org/10.1080/09602011.2019.1706585>
- Porter, A. C., Sauer, J. M., Knierman, M. D., Becker, G. W., Berna, M. J., Bao, J., Nomikos, G. G., Carter, P., Bymaster, F. P., Leese, A. B. y Felder, C. C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 1020 – 1024.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.301.3.1020>
- Prospéro-García, O., Murillo-Rodríguez, E., Giordano, M., Gómez-Chavarín, M., Méndez, M. y Navarro, L. (2000). Oleamide: a potential endogenous marihuana. *Medicina Universitaria*, 3(9), 269–274.
- Rajan, T. S., Ghilardi, M. F. M., Wang, H. Y., Mazzon, E., Bramanti, P., Restivo, D. y Quartarone, A. (2017). Mechanism of action for rTMS: A working hypothesis based on animal studies. *Frontiers in Physiology*, 8(JUN), 1 – 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00457>
- Rossini, P. M. y Rossi, S. (2007). Transcranial magnetic stimulation: Diagnostic, therapeutic, and research potential. *Neurology*, 68(7), 484 – 488.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000250268.13789.b2>
- Rovegno, M., Soto, P. A., Sáez, J. C. y von Bernhardt, R. (2012). Mecanismos biológicos involucrados en la propagación del daño en el traumatismo encéfalo craneano. *Medicina Intensiva*, 36(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2011.06.008>
- Ruiz-Contreras, A. E. y Prospero-García, Ó. (2014). La Marihuana. *Ciencia*, 65(1), 8.  
[http://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/65\\_1/PDF/Marihuana.pdf](http://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/65_1/PDF/Marihuana.pdf)
- Russo, E. B. (2016). Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(7), 594 – 605. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.04.005>
- Schurman, L. D. y Lichtman, A. H. (2017). Endocannabinoids: A promising impact for traumatic brain injury. *Frontiers in Pharmacology*, 8(FEB), 69. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00069>
- Shohami, E., Novikov, M. y Mechoulam, R. (2009). A Nonpsychotropic Cannabinoid, HU-211, Has Cerebroprotective Effects After Closed Head Injury in the Rat. *Journal of Neurotrauma*, 10(2), 109 – 119. <https://doi.org/10.1089/neu.1993.10.109>
- Speer, A. M., Kimbrell, T. A., Wassermann, E. M., Repella, J. D., Willis, M. W., Herscovitch, P. y Post, R. M. (2000). Opposite effects of high and low frequency rTMS on regional brain activity in depressed patients. *Biological Psychiatry*, 48(12), 1133 – 1141.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01065-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01065-9)

- Svíženská, I., Dubový, P. y Šulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures - A short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(4), 501–511. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.05.010>
- Verdugo-Diaz, L., Estrada-Rojo, F., Garcia-Espinoza, A., Hernandez-Lopez, E., Hernandez-Chavez, A., Guzman-Uribe, C., Martinez-Vargas, M., Perez-Arredondo, A., Calvario, T., Elias-Viñas, D. y Navarro, L. (2017). Effect of Intermediate-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Recovery following Traumatic Brain Injury in Rats. *BioMed Research International*, 2017, 4540291. <https://doi.org/10.1155/2017/4540291>
- Wang, H. ning, Wang, L., Zhang, R. guo, Chen, Y. chun, Liu, L., Gao, F., Nie, H., Hou, W. gang, Peng, Z. wu y Tan, Q. (2014a). Anti-depressive mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in rat: The role of the endocannabinoid system. *Journal of Psychiatric Research*, 51(1), 79 – 87. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.01.004>
- Wang, H. ning, Wang, L., Zhang, R. guo, Chen, Y. chun, Liu, L., Gao, F., Nie, H., Hou, W. gang, Peng, Z. wu y Tan, Q. (2014b). Anti-depressive mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in rat: The role of the endocannabinoid system. *Journal of Psychiatric Research*, 51(1), 79 – 87. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.01.004>
- Xi, G., Keep, R. F. y Hoff, J. T. (2006). Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurology*, 5(1), 53 – 63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70283-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70283-0)
- Xue, S. shan, Xue, F., Ma, Q. rui, Wang, S. quan, Wang, Y., Tan, Q. rong, Wang, H. ning, Zhou, C. hong y Peng, Z. wu. (2019). Repetitive high-frequency transcranial magnetic stimulation reverses depressive-like behaviors and protein expression at hippocampal synapses in chronic unpredictable stress-treated rats by enhancing endocannabinoid signaling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172738>
- Yarnell, A. M., Barry, E. S., Mountney, A., Shear, D., Tortella, F. y Grunberg, N. E. (2016). The revised neurobehavioral severity scale (NSS-R) for rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 2016(April), 9.52.1-9.52.16. <https://doi.org/10.1002/cpns.10>
- Yoon, K. J., Lee, Y. K. Y. T., Chung, P. W., Lee, Y. K. Y. T., Kim, D. Y. y Chun, M. H. (2015). Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on behavioral recovery during early stage of traumatic brain injury in rats. *Journal of Korean Medical Science*, 30(10), 1496 – 1502. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.10.1496>
- Zhou, J., Noori, H., Burkovskiy, I., Lafreniere, J., Kelly, M. y Lehmann, C. (2019). Modulation of the Endocannabinoid System Following Central Nervous System Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 388. <https://doi.org/10.3390/ijms20020388>
- Zou, S. y Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>