



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PAPEL DEL SISTEMA CANABINÉRGICO EN LA VARIACIÓN DIURNA DE LA
NEUROPROTECCIÓN FRENTE A UN TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

JULIO JAVIER MORALES GÓMEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO.**
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: **DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA.**
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. RAÚL ANTONIO AGUILAR ROBLERO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PAPEL DEL SISTEMA CANABINÉRGICO EN LA VARIACIÓN DIURNA DE LA
NEUROPROTECCIÓN FRENTE A UN TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

JULIO JAVIER MORALES GÓMEZ

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**DR. RAÚL ANTONIO AGUILAR ROBLERO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.**

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013

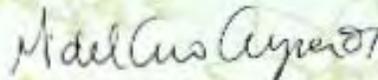
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **MORALES GÓMEZ JULIO JAVIER** con número de cuenta 300189522, con la tesis titulada "**PAPEL DEL SISTEMA CANNABINÉRGICO EN LA VARIACIÓN DIURNA DE LA NEUROPROTECCIÓN FRENTE A UN TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO**:

Presidente: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
Vocal: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Secretario: DR. RAÚL ANTONIO AGUILAR ROBLERO
Suplente: DRA. LETICIA VERDUGO DÍAZ
Suplente: DR. ÓSCAR PRÓSPERO GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de agosto de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por todo el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí beca de Maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y fui apoyado por los donativos: CONACYT 89497 y 152510 y PAPIIT IN221212.

Especialmente deseo agradecer a los miembros del Comité Tutorial: Dra. María de la Luz Navarro Angulo, Dr. Óscar Próspero García y al Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero, por su paciencia, su comprensión, sus aportaciones a este trabajo de investigación, pero sobre todo por el ejemplo de vida a seguir.

AGRADECIMIENTOS

A ti primeramente mamá por darme la vida, mostrarme el camino y apoyarme en cada una de mis decisiones que he tomado a lo largo de este tiempo.

A usted Dra. Navarro por ser mi segunda madre, por adentrarme en la ciencia, por la oportunidad y confianza que ha tenido en mí, por ser mi apoyo, mi guía y muchas veces mi fortaleza. Gracias.

A ti Bere y a ti Joshua por ser mi motor y razón de vida.

A los miembros del Comité Tutoral: Dr. Óscar Prospéro García y al Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero por el tiempo, comentarios y sus valiosas observaciones en la elaboración de esta tesis.

A los demás miembros del jurado: Dr. Manuel Miranda Anaya, Dra. Leticia Verdugo Díaz y a la Dra. Carolina Escobar Briones por la revisión del escrito de tesis, por los comentarios, observaciones y sugerencias que me permitieron tratar de mejorarlo.

A la Dra. Marina Martínez Vargas y al Dr. Rubén González Rivera por su revisión inicial a la tesis, por su apoyo incondicional para la culminación de este trabajo, por sus enseñanzas, por su guía y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Francisco Estrada por ser mi vigía y darme ánimo cuando lo necesite.

A mis compañeros de laboratorio, Erika, Barbara, Adan, Nathan, Alejandro, Ricardo, Brenda, por los momentos amenos que pasamos y como olvidar los intercambios de Navidad.

A ti Rocio que siempre que hablaba por teléfono contigo me motivabas a conseguir mis sueños, gracias hermana.

A ti Mario que cuando llegaba por las noches me esperabas junto a mamá, que me despertabas, que dabas de cenar.

A ti Gabriel, Nadia, Omar y Daniel que siempre están allí cuando los necesito.

A ti mamá Toñita, Fabiola, Samanta y Fabián, por dejarme formar parte de esa gran familia que son, por apoyarme, por todo lo que han hecho por mí para lograr este objetivo de vida. Gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas	10
Resumen	11
Abstract	12
1. Traumatismo craneoencefálico	
1.1 Definición	13
1.2 Epidemiología	14
1.3 Fisiopatología	15
1.4 Neuroprotección frente a un TCE	18
1.5 Variaciones diurnas de la Neuroprotección	19
2. Sistema canabinérgico.	
2.1 <i>Cannabis sativa</i>	20
2.2 Sistema canabinérgico	20
2.3 Receptores canabinérgicos	20
2.4 Síntesis de los endocannabinoides	21
2.5 Metabolismo de los endocannabinoides	22
2.6 Mecanismos de acción de los endocannabinoides	22
2.7 Variaciones diurnas del sistema canabinérgico	23
3. Planteamiento del problema e Hipótesis	24
4. Objetivos	25
5. Metodología.	
5.1 Sujetos	26
5.2 Variación Diurna	26
5.3 Traumatismo craneoencefálico	26
5.4 Cuantificación de sangrado	26
5.5 Evaluación de daño neurológico	26
5.6 Análisis de la expresión de CB1 y CB2	27
5.7 Detección de CB1 Y CB2	27

5.8 Western Blot	27
5.9 Cuantificación de RNAm	28
5.10 RT-PCR	28
5.11 Análisis estadístico	28
6. Resultados	29
7. Discusión	37
8. Conclusiones	40
9. Referencias bibliográficas	41

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA.

1. Escala de Glasgow	13
2. Mortalidad anual por accidentes de tránsito	14
3. Lesión axonal difusa	15
4. Alteración del transporte iónico	16
5. Fisiopatología del TCE	17
6. Cambios temporales en la lesión secundaria	17
7. Balance entre daño y neuroprotección	19
8. Estructura tridimensional de CB1 y CB2	21
9. Síntesis de anandamida	22
10. Degradación de anandamida	22
11. Grafica de sangrado posterior a un TCE	29
12. Grafica de la ingesta de alimento en 24 horas	30
13. Grafica de la ingesta de agua en 24 horas	30
14. Grafica de la pérdida de peso en 24 horas	31
15. Grafica del daño neuroconductual producido por un TCE	32
16. Grafica de la mortalidad en ratas sometidas a TCE	32
17. Efecto del ciclo luz- oscuridad sobre la expresión de CB1	33
18. Efecto del ciclo luz- oscuridad sobre la expresión de CB2	34
19. Expresión de CB1 en corteza cerebral en rata sometida a TCE	35
20. Expresión de CB2 en corteza cerebral en rata sometida a TCE	36

Abreviaturas

AA: Acido araquidonico
2-AG: 2-araquidonilglicerol
AMPc: Adenosin monofosfato ciclico
ANA: Anandamida:
ATP: Adenosin trifosfato
Ca²⁺: Calcio
CB1: Receptor a cannabinoides tipo 1
CB2: Receptor a cannabinoides tipo 2
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
COX-2: Ciclooxygenasa 2
cDNA: Acido desoxirribonucleico complementario.
DMSO: Dimetilsulfoxido
FAAH: Amidohidrolasa de acidos grasos
GABA: Acido gama aminobutirico
GMPc: Guanosin monofosfato ciclico
GPR55: "G protein-coupled receptor 55"
GTP: Guanidin trifosfato
IP: Receptores para prostaciclina
IP3: Inositol trifosfato
K⁺: Potasio
LAD: Lesion axonal difusa
Lyso PI: lisofosfatidilinositol
MAGL: Monoacilglicerol lipasa
MAPK: Proteinas quinasas activadas por mitogenos
min: Minuto
ml: Mililitro
mmHg: Milimetros de mercurio
Na⁺:Sodio
NaCl: Cloruro sodico
NADA.: N-araquidoniletanolamida
NAEs: N-aciletanolamidas
NaHCO₃: Bicarbonato sodico
NAPE- PLD: N-araquidonilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D
NAT: N-aciltransferasa
µg: Microgramo
PLC: Fosfolipasa C
PMSF: Fenilmetilsulfonilo
RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero
SNC: Sistema nervioso central.
TNF-α: Factor de necrosis tumoral α
TRPV1: "Transient receptor potential vanilloid"
Δ9-THC: Δ9-tetrahidrocannabidio

Resumen

Cuando se presenta una agresión al cerebro se activan respuestas que inducen muerte celular, sin embargo también se activan mecanismos que parecen ser de protección y han dado lugar al concepto de neuroprotección.

Posterior a un traumatismo craneoencefálico (TCE) se desencadenan mecanismos que traen como consecuencia liberación de neurotransmisores excitadores tales como glutamato, lo que provoca una entrada masiva de calcio en las neuronas, activación de proteasas, lipasas, sintasa de óxido nítrico, endonucleasas, activación de vías apoptóticas, producción de radicales libres y potencialmente necrosis y/o apoptosis; pero no todos los cambios son dañinos, se sabe que algunos tienen efectos protectores, por ejemplo la activación de los sistemas inhibitorios GABAérgico y canabinérgico puede contrarrestar el efecto excitotóxico desencadenado por el sistema glutamatérgico. El balance entre ambos tipos de respuesta determinará el destino final del tejido dañado.

Recientemente nuestro grupo reportó que el daño provocado por un TCE en ratas era menor si éste ocurría durante las horas de oscuridad respecto a las horas de luz. Creemos que puede deberse, en parte, al grado de activación que el sistema canabinérgico presenta a lo largo del día. Decidimos analizar la respuesta al TCE en distintas fases del ciclo luz-oscuridad; así como en la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en corteza cerebral, tanto en ratas control como en ratas sometidas a TCE a diferentes horas del día.

Encontramos que las ratas sometidas a TCE a las 21:00 y 01:00 horas tuvieron una menor pérdida de peso y una mejor ejecución en una prueba neuroconductual que aquellas ratas sometidas a TCE a las 09:00 y 13:00 horas.

En relación a la expresión de los receptores a cannabinoides en corteza cerebral de rata, solo encontramos una variación significativa en el receptor CB1, presentando los niveles más elevados entre la 01:00 y las 5:00 horas. Así mismo observamos que el TCE provocó la pérdida de este ritmo.

Estos resultados apoyan el papel neuroprotector del sistema canabinérgico y señalan que la expresión del receptor a cannabinoides CB1 en corteza cerebral se asocia con un menor daño ocasionado por un TCE.

Abstract

Injuries to the brain activate responses that induce cell death, but also activate mechanisms that appear to be self-protective, and have led to the concept of neuroprotection.

Traumatic brain injury (TBI) triggers pathological pathways that may potentially harm brain cells. These mechanisms include release of excitatory neurotransmitters such as glutamate, causing a massive influx of calcium into neurons, activation of proteases, lipases, nitric oxide synthase, endonucleases, apoptotic pathways, free radical production and potentially necrosis and/or apoptosis, but not all changes are harmful, some are known to have self-protective effects, for example the activation of inhibitory systems like GABAergic and cannabinergic which may counteract the effect triggered by glutamatergic system. The balance between these two types of responses will determine the fate of the damaged tissue.

Recently, our group reported that the damage caused by TBI in rats was lower if it occurred during the hours of darkness instead of light hours. We believe that it may be due, in part, to the degree of activation of the cannabinergic system along the day. We decided to analyze the damage caused by TBI in both phases of light-dark cycle, as well as in the expression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 in the cerebral cortex in both control rats and rats subjected to TBI is different regarding the time of day.

We found that the rats subjected to TBI at 21:00 and 01:00 had lower weight loss and better execution on a neurobehavioral test than those rats subjected to TBI at 09:00 and 13:00 hours.

Respect to the expression of cannabinoid receptors in rat cerebral cortex, we only found a significant variation in the CB1 receptor, presenting the highest levels between 01:00 and 5:00 hours. Also note that the TBI caused the loss of this rhythm.

These results support the neuroprotective role of the cannabinergic system and show that the expression of cannabinoid CB1 receptor in the cerebral cortex is associated with a lesser damage caused by TBI.

1. Traumatismo craneoencefálico.

1.1 Definición.

Se define al traumatismo craneoencefálico (TCE) como una alteración en la función cerebral u otra evidencia de patología cerebral, causada por una fuerza externa, la cual puede consistir en un impacto directo sobre el cráneo, aceleración o desaceleración rápida, penetración de un objeto (arma de fuego) u ondas de choque de una explosión¹, con la presencia de al menos uno de los siguientes elementos: alteración de la conciencia y/o amnesia, cambios neurológicos o neurofisiológicos, diagnóstico de fractura de cráneo o lesiones intracraneanas y ocurrencia de muerte como resultado final del traumatismo. La gravedad de un TCE puede variar desde "leve" (cambio temporal el estado de conciencia) a "severa" (período extendido de inconciencia o amnesia después de la lesión)^{2,3}, esta clasificación con base en la severidad del traumatismo craneoencefálico puede documentarse con base en la escala de Glasgow la cual toma en consideración los siguiente puntos (ver figura 1):

AREA EVALUADA	PUNTAJE
APERTURA OCULAR	
Esponanea	4
Al Estímulo Verbal	3
Al Dolor	2
No Hay Apertura Ocular	1
MEJOR RESPUESTA MOTORA	
Obedece Ordenes	6
Localiza el Dolor	5
Flexión Normal (Retina)	4
Flexión Anormal (Descorticación)	3
Extensión (Descerebración)	2
No hay Respuesta Motora	1
RESPUESTA VERBAL	
Orientada, Conversa	5
Desorientada, Confusa	4
Palabras Inapropiadas	3
Sonidos Incomprensibles	2
No hay Respuesta verbal	1

Figura. 1. Escala de Glasgow. Tomada de Belinda, 2003⁴

Esta clasificación divide al TCE en 3 grupos puntuables de manera independiente siendo la puntuación máxima y normal 15 y la mínima 3. Se considera traumatismo craneoencefálico leve al que presenta un Glasgow de 15 a 13 puntos, moderado de 12 a 9 y grave menor o igual a 8⁴.

1.2 Epidemiología.

A nivel mundial el TCE es un problema grave de Salud Pública que contribuye de manera importante al número de muertes y casos de discapacidad permanente. Anualmente el centro de prevención y control de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Estados Unidos de Norteamérica estima que, en promedio, 1.7 millones de personas sufren un TCE de las cuales, 52,000 mueren, 275,000 son hospitalizadas, 1,365,000 son atendidas ambulatoriamente en un servicio de urgencias y se desconoce el número de personas que no reciben atención médica. Se estima que aproximadamente el 80% de los eventos son de intensidad leve, con el 20% restante entre moderada y grave. En Europa se estima que el TCE tiene una incidencia de 235 por cada 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad de 11% con 775,500 cada año⁵. Por otro lado en Iberoamérica la incidencia de TCE es de 200 a 400 por cada 100,000 habitantes por año. En México, el TCE ocupa la cuarta causa de muerte, contribuyendo los accidentes de tráfico con el 75% y el resto debido a muertes violentas, caídas y lesiones deportivas.

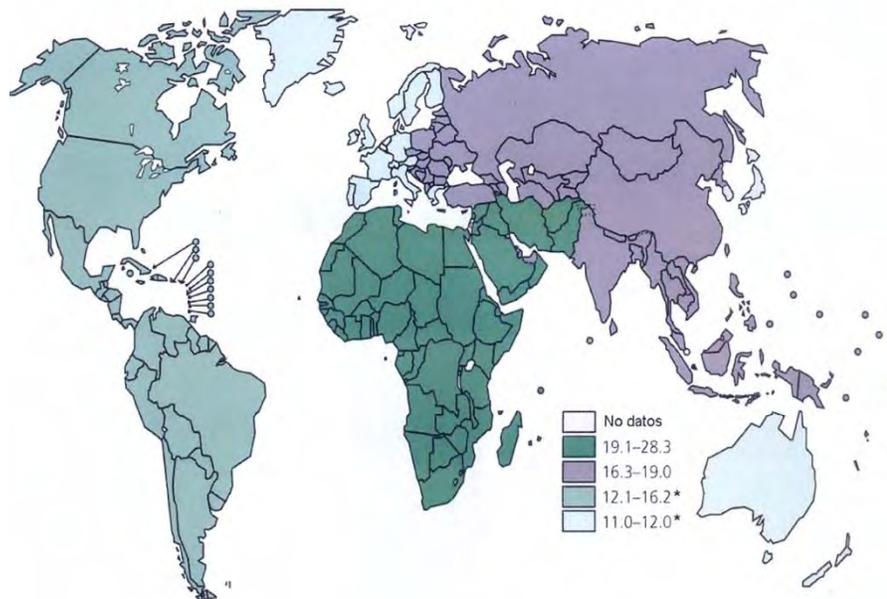


Figura 2. Mortalidad anual por accidentes de tránsito, por 100,000 habitantes. Tomado de: Peden, 2004.

En relación al género, se presenta más en los hombres que en las mujeres, en una proporción 3:1 y afecta principalmente a la población de 15 a 45 años⁶. En la figura 2 se puede apreciar la

mortalidad que se refleja posterior a un TCE a nivel mundial de allí la importancia y la repercusión que tiene este proceso en la salud pública nivel mundial.

1.3 Fisiopatología.

En un TCE, se pueden identificar dos tipos de lesiones: La lesión primaria que ocurre en el momento del impacto y no es reversible, incluye el desgarramiento de los trayectos de la materia blanca, contusión focal, hematomas (intra y extracerebral) y el edema difuso; a nivel celular los eventos tempranos del neurotrauma incluyen microperforación de membranas, desajuste de canales iónicos y cambios conformacionales de las proteínas, en los niveles más altos de daño, los vasos sanguíneos pueden ser desgarrados ocasionando microhemorragias; el daño isquémico cerebral se presenta en el daño primario y puede ser extenso o más comúnmente perilesional⁷. Este tipo de daño es macroscópico y fácil de identificar tal como lo podemos observar en la figura número 3 que nos muestra la lesión axonal difusa que se puede presentar en personas que ha sufrido TCE.

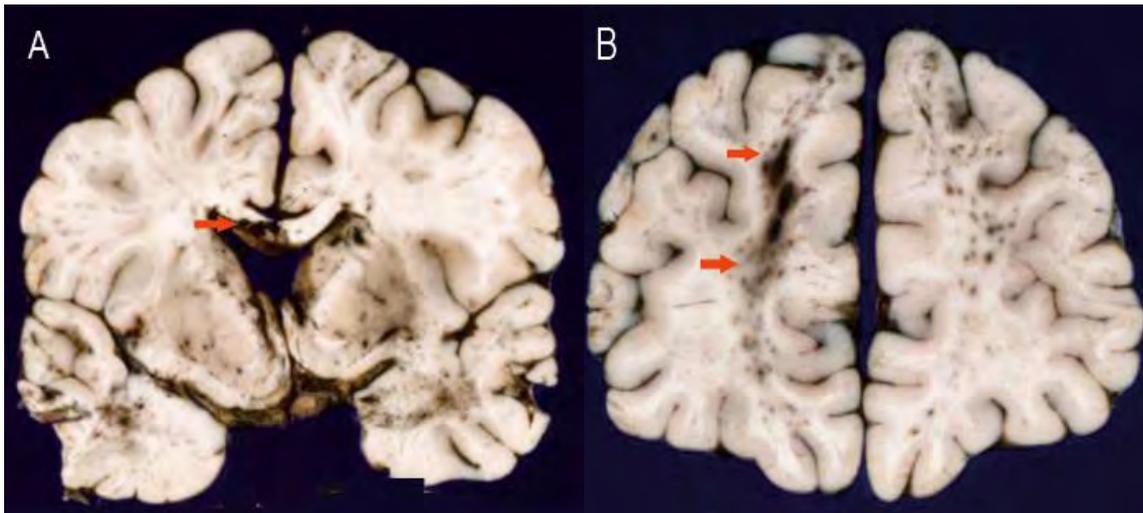


Figura 3. Lesión axonal difusa (LAD). A: muestra LAD a nivel del cuerpo calloso. B: LAD visibles como múltiples puntos oscuros en la sustancia blanca. Tomado de: Peden, 2004.

La lesión primaria desencadena una serie de alteraciones en el metabolismo cerebral, que comprometen la hemodinámica intracraneal y la homeostasis iónica; estos cambios corresponden a la denominada lesión secundaria, que es un proceso potencialmente reversible, mediante una terapia adecuada⁸ y que involucra cambios funcionales, estructurales, celulares y moleculares que incrementan el daño neuronal. El primer proceso de daño se acompaña de isquemia e hipoxia, en estas condiciones, la producción de energía va a depender de la glicólisis

anaeróbica, que es un mecanismo poco eficiente de producción energética, condicionando la disminución de los niveles de ATP durante los primeros 3 minutos de hipoxia. La bomba sodio-potasio requiere una molécula de ATP para transportar 2 iones de K^+ al interior de la célula y 3 iones de Na^+ al exterior, La disminución de los niveles de ATP altera el transporte de iones a través de la membrana, produciendo la pérdida neta de potasio y ganancia de sodio intracelular, que debido al efecto osmótico, arrastra agua al interior de la célula, generando edema celular. De igual forma, la bomba de calcio, es ATP dependiente, y extrae 2 iones Ca^{++} por cada ATP hidrolizado, al haber falla de esta bomba se produce un aumento en la concentración de calcio intracelular como se puede apreciar en la figura 4. Además, el calcio al comportarse como segundo mensajero favorece la activación de proteasas y fosfolipasas que conducen a la proteólisis y ruptura de la membrana celular⁹.

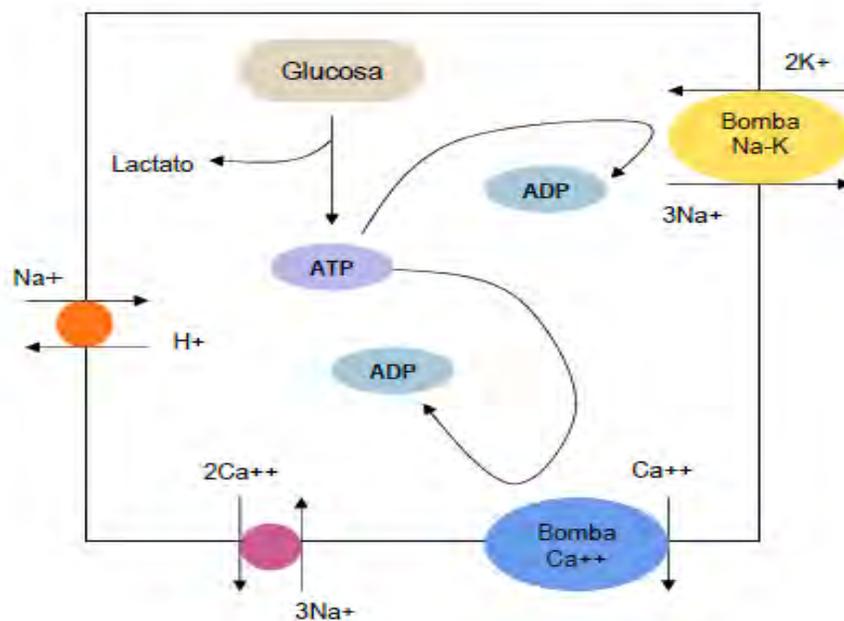


Figura 4. Sistemas de transporte iónico que se alteran al disminuir la disponibilidad de ATP. Tomado de: Peden, 2004.

Otro fenómeno que también se produce por la falla de la bomba sodio-potasio es la disminución del potasio intracelular y el aumento del extracelular produciendo un potencial de membrana en reposo menos negativo, generando la despolarización de la membrana. Esto produce la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, e induce la liberación de neurotransmisores, entre ellos el glutamato, que es responsable de la neurotoxicidad mediada por la activación de los receptores ionotrópicos como el N-metil D-Aspartato (NMDA) el cual favorece un mayor influjo de calcio al interior de la membrana. Además el glutamato debido a la activación de receptores metabotrópicos acoplados a la proteína G, induce la liberación de Ca^{++} desde el retículo endoplásmico, ejerciendo un efecto citotóxico sobre la mitocondria y provocando la liberación del citocromo C al citoplasma celular donde se une a una proteína citoplasmática (Apaf-1) y origina un complejo molecular llamado apoptosoma, que activa la caspasa 9 y está a la caspasa 3 conduciendo a la apoptosis¹⁰. La apoptosis ocurre en la zona adyacente al centro de la lesión, en

la que hay una disminución de flujo sanguíneo y que se conoce como zona de penumbra isquémica, mientras que en el centro de la lesión se produce la necrosis celular, perpetuándose de esta manera el daño neuronal¹¹.



Figura 5. Fisiopatología del TCE. Este esquema muestra los diversos procesos que ocurren en un TCE, desde el inicio de la lesión primaria así como los procesos de lesión secundaria. Tomado de: Estrada, 2011.

En la figura 5 se esquematiza la fisiopatología del TCE. Vale la pena señalar que los procesos que suelen verse involucrados al presentarse un TCE tienen una diferente temporalidad; algunos de estos procesos se presentan de manera inmediata, otros de manera mediata y algunos de forma tardía como lo ejemplifica la figura 6 pero sin embargo todos ellos son capaces de perpetuar el daño neuronal desde la lesión primaria.

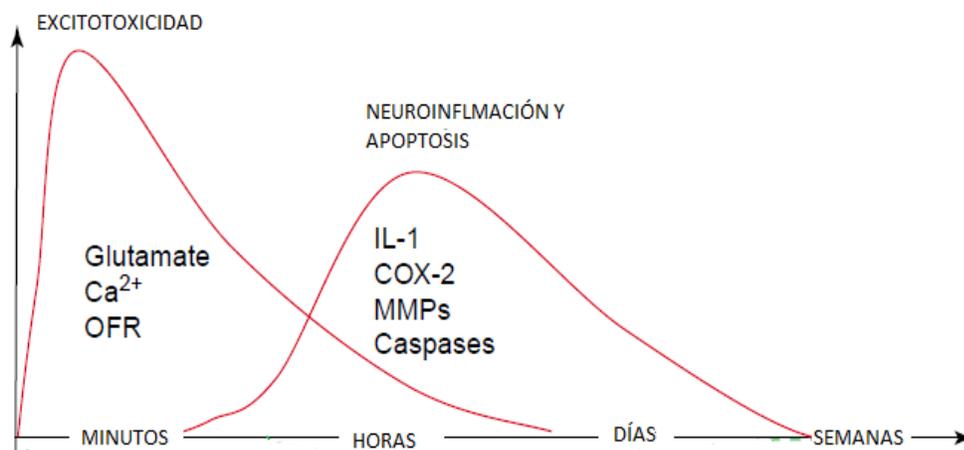


Figura 6. Esquema representativo de los procesos de lesión secundaria, que se muestran son temporales. Modificado de Dirgnal, 2003¹²

1.4 Neuroprotección frente a un TCE.

Al mismo tiempo que se activan los mecanismos de daño cerebral frente a un TCE antes mencionados, también se activan mecanismos de neuroprotección que son respuestas que el organismo despliega posterior a un evento traumático y que intentan mantener la integridad y funcionalidad del cerebro. Dentro de los mecanismos de neuroprotección planteados se encuentran la expresión de hormonas sexuales, a este respecto, las primeras observaciones fueron hechas con relación a las diferencias en la recuperación frente a un TCE entre machos y hembras; fue así como se concluyó que estas respuestas pudieran tener una base hormonal, atribuida principalmente a la progesterona, por ejemplo se ha visto que ésta protege o regenera la barrera hematoencefálica, reduce el edema cerebral, regula a la baja la cascada inflamatoria; además de reducir la excitotoxicidad causada por el glutamato y potenciar los efectos del GABA, al producir una regulación a la alta del receptor GABA_A¹³. Otro mecanismo de daño cerebral secundario producido por un TCE es la inflamación, mecanismo que tiene una función dual, durante una primera fase parece contrarrestar el daño, esto se observa en las primeras horas posteriores a un evento traumático cuando disminuye la síntesis de IL-1 y aumentando la producción de moléculas antiinflamatorias tales como IL-10.

Diversos autores han propuesto que entre los factores neuroprotectores se encuentran la activación del sistema canabinérgico. En este sentido Jin y colaboradores en el 2000¹⁴ reportaron un incremento en la expresión del receptor a cannabinoides CB1 en corteza cerebral, después de la oclusión de la arteria cerebral media, y varios reportes han mostrado incrementos de los ligandos endógenos al CB1 anandamida (ANA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG) en diferentes paradigmas de daño cerebral, sugiriendo que tales incrementos pueden estar participando en la neuroprotección^{15,16}. En coincidencia con el papel neuroprotector de los cannabinoides, se ha observado que la administración de R(+)-WIN55212-2, agonista CB1 reduce el daño causado por la oclusión de la arteria media cerebral en ratas y que este efecto es bloqueado con la administración de SR141716A, antagonista CB1¹⁷; además el 2-AG reduce el daño causado a la barrera hematoencefálica por un TCE¹⁸. *In vitro*, en cultivos neuronales sometidos a hipoxia y privación de glucosa se ha observado que el R(+)-WIN55212-2¹⁷ así como la ANA y el 2-AG incrementan la viabilidad celular¹⁹. Mostrando que la activación del sistema canabinérgico por sus mecanismo de acción, puede llegar a ser una de las terapias a utilizar para disminuir el daño neuronal producido por un TCE.

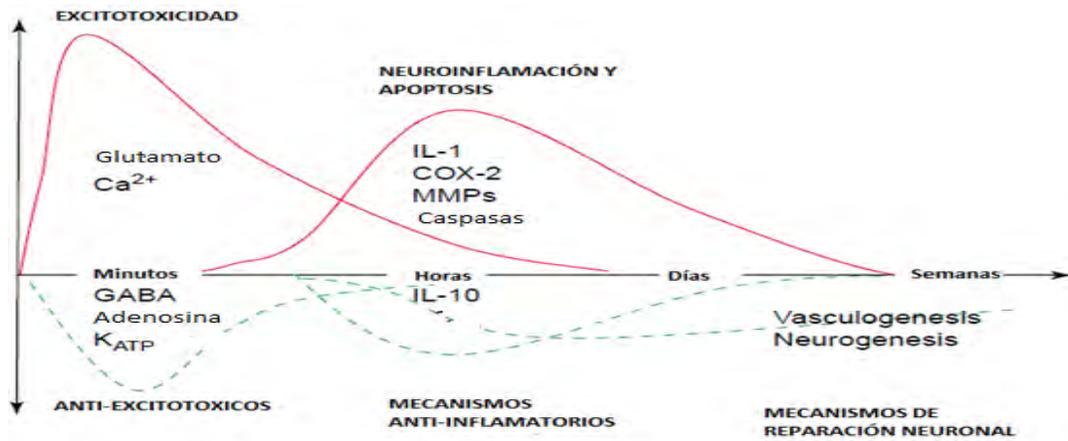


Figura 7. Los eventos de daño neuronal y neuroprotección se presentan al mismo tiempo y es el balance de ambas respuestas lo que determina el resultado final de la lesión. Modificado de Dirgnal, 2003.

Los mecanismos de daño y neuroprotección cerebral son procesos que se presentan al mismo tiempo y es el balance entre ambas respuestas determinará el destino final del tejido dañado²⁰ como lo muestra la figura 7.

1.5 Variaciones diurnas de la Neuroprotección.

Las funciones de los seres vivos no se expresan de forma constante. Cuando durante un periodo se estudia un proceso fisiológico en cualquier ser vivo, se puede observar que se alternan periodos de máxima actividad con periodos de escasa o nula actividad. Si estas variaciones se presentan con cierta regularidad relacionadas con el ciclo de día y noche, se denominan ritmos diarios, los cuales en condiciones constantes serían expresados con un periodo circadiano. Todas las especies desde las cianobacterias hasta los humanos presentan estos ritmos que les sirven para la anticipación de las variaciones diarias de diferentes variables tales como la temperatura, la luz, la ingesta de comida, etc. Recientemente nuestro grupo reportó que la recuperación frente a un TCE presenta variaciones diarias, siendo mejor la recuperación si el traumatismo ocurre en las horas de oscuridad respecto a las horas de luz²¹. Es decir parece haber una respuesta de autoprotección mayor en las horas de oscuridad. Estos datos concuerdan con reportes de la literatura en los que se describen que, en humanos, existe un ritmo diario en el inicio de un accidente vascular cerebral, así como en el ataque al miocardio²². Incluso en modelos de isquemia en rata se han descrito diferencias en el daño causado si ésta se induce en las horas de oscuridad en comparación con las horas de luz^{23,24}. Estos datos apoyan la teoría que la respuesta neuroprotectora no es constante sino que tiene fluctuaciones siendo esta una pauta para tratar de intervenir en el momento más oportuno para disminuir el daño producido por un TCE.

2. Sistema canabinérgico.

2.1 Cannabis sativa. La *Cannabis sativa* ha sido utilizada desde los años 200 D.C. por los chinos debido a sus propiedades curativas, así mismo es una de las drogas ilícitas de mayor utilización para fines recreativos, sin embargo su estudio formal comienza en 1940 con Lord Todd en Inglaterra y Roger Adams en Estados Unidos de América, quienes independientemente aislaron al canabinol un componente psicoactivo de muy baja actividad y es en 1960 cuando se establece la estructura y estereoquímica del canabidiol². Pero es hasta 1964 cuando se aísla y se conoce la estructura del principal componente activo el $\Delta 9$ -tetrahidrocanabinol o $\Delta 9$ -THC²⁶. Sin embargo la identificación de los mecanismos de acción tardaron en elucidarse hasta la identificación del receptor a canabinoides CB1²⁷, proteína membranal de unión del $\Delta 9$ -THC, posteriormente en 1993 se identifica otro receptor a canabinoides, el CB2²⁸, a partir de los estudios realizados acerca de estos 2 receptores y a la utilización de canabinomiméticos altamente selectivos se logra la identificación del sistema canabinérgico o endocanabinoide.

2.2 Sistema canabinérgico. Este sistema se compone de sus ligandos endógenos ANA²⁹, 2-AG^{30,31}, oleamida³², noladin éter³³, viridhamina³⁴; de sus 2 receptores denominados CB1²⁷ y CB2²⁸, sus transportadores y las enzimas que participan en su síntesis como N-araquidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa-D (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa alfa y beta (DAGL por sus sigla en inglés) y por último las enzimas que participan en su degradación, la hidrolasa de los ácidos grasos amidados (FAAH por sus sigla en inglés) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL por sus sigla en inglés), enzimas pertenecientes a la familia serin-hidrolasa^{35,36}. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los endocanabinoides no se almacenan en vesículas, se sintetizan a demanda siendo el aumento de calcio el principal promotor de su síntesis debido a que las enzimas que participan en su síntesis son calcio dependientes. Además se les denomina retrógrados ya que se sintetizan en la postsinapsis y actúan en la presinapsis.

2.3 Receptores canabinérgicos. Los receptores a canabinoides están acoplados a proteínas Gi. En 1990 Matsuda²⁷ reportó la clonación del cDNA que codificaba para el receptor CB1 en cerebro de rata, posteriormente Munro²⁸ en 1993 clona el cDNA que codifica para CB2, a partir de células HL-60 de leucemia promielocítica. Los 2 receptores a canabinoides se distinguen por su secuencia de aminoácidos, mecanismos de señalización y su distribución en los tejidos. Entre ambos receptores existe únicamente una homología del 44%.

El receptor CB1 de rata, ratón y tejidos de humano ha sido clonado, presentando una secuencia idéntica de aminoácidos entre el 97 a 99% entre las diferentes especies. El de rata está constituido por 472 aminoácidos. Este receptor está altamente expresado en diferentes áreas del cerebro tales como corteza cerebral, sistema límbico, hipocampo, cerebelo y ganglios basales³⁷ y es el responsable de los efectos psicoactivos de los canabinoides. Se ha mostrado que este receptor se localiza en la presinapsis de interneuronas GABAérgicas y de neuronas glutamatérgicas³⁸⁻⁴⁰.

El receptor CB2 contiene 360 aminoácidos, tiene una homología del 44% con el receptor CB1. Inicialmente se sostenía que este receptor se encontraba fuera del sistema nervioso central (SNC) y particularmente asociado con tejidos del sistema inmune, como en el bazo y timo así como en varias poblaciones de células del torrente sanguíneo asociadas al sistema inmune⁴¹. Sin embargo actualmente se ha demostrado la presencia de su mRNA en células de la capa

granulosa cerebelar, en células de la microglia perivascular ^{42,43} y en células del endotelio cerebral ⁴⁴. Algunos otros autores han demostrado que únicamente en procesos que generan respuesta neuroinflamatoria se puede producir la expresión de este receptor debido a que las neuronas cuentan con la maquinaria para procesarlo.

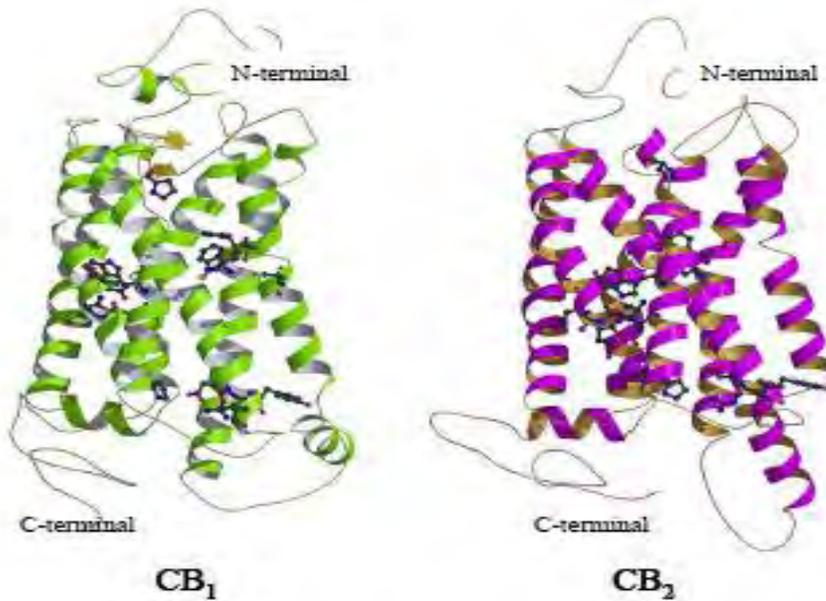


Figura 8.

Representación tridimensional de la estructura de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2. Tomado de Montero y cols., 2005.

2.4 Síntesis de los endocannabinoides. Únicamente nos enfocaremos en los dos ligandos de mayor importancia biológica y actualmente más estudiados los cuales son ANA y 2-AG. Los precursores de la ANA son fosfolípidos y componentes de la membrana celular. La síntesis comienza con la transferencia del ácido araquidónico de la fosfatidilcolina al grupo polar de la fosfatidiletanolamina a través de la enzima N-aciltransferasa (NAT por sus sigla en inglés) para de esta manera formar N-araquidonil-fosfatidiletanolamida (NAPE). La actividad de la NAT está regulada por la presencia de calcio y de AMPc ⁴⁵. Posteriormente el NAPE es degradado por la NAPE-PLD ⁴⁶ enzima calcio dependiente, para de esta manera formar ANA y precursores de ácidos grasos. La NAPE-PLD pertenece a la familia zinc metalohidrolasa, su actividad está regulada por la despolarización de las células y la activación de los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA). El 2-AG es el endocanabinoide de mayor concentración en el cerebro ocupando un 31.2% del total de este tipo de moléculas⁴⁷. También es el endocanabinoide de mayor afinidad por el receptor CB1. El 2-AG es sintetizado por la cascada de activación de 2 enzimas diferentes como son la fosfolipasa C (PLC) cuyo sustrato es el lisofosfatidilinositol (Lyso PI) y la diacilglicerol lipasa (DGL) cuyo sustrato es el diacilglicerol; datos recientes muestran que en el SNC el paso limitante en la síntesis de 2-AG está dado únicamente por la DGL⁴⁸. Una vez formado es liberado en la hendidura sináptica donde lleva a cabo su mecanismo de acción.

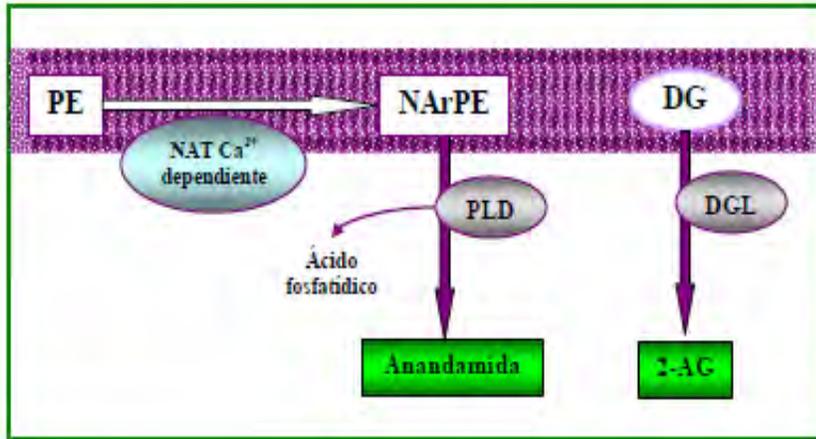


Figura 9. Esquema de la síntesis de anandamida y 2-araquidonilglicerol (2-AG). Modificado de Di Marzo, 1994.

2.5 Metabolismo de los endocannabinoides. Una vez sintetizada la ANA se libera a la hendidura pre sináptica para realizar sus diferentes funciones biológicas y a través de un transportador aún no identificado, pero del cual se tienen indicios farmacocinéticos de su existencia⁴⁹, es recapturada por las células y degradada por una amina hidrolasa de ácidos grasos denominada FAAH⁵⁰ o bien por la reciente identificada FAAH 2⁵¹ a ácido araquidónico y etanolamida. Terminando de esta manera su actividad biológica. El 2-AG es hidrolizado por diferentes enzimas, en el SNC el 85 % ocurre vía la monoacilglicerol lipasa (MGL). Piomelli³⁵ en el 2003 muestra que esta enzima se localiza principalmente en la presinapsis apoyando de esta manera el hecho de que el efecto de los endocannabinoides actúan de forma retrograda. Parte de los productos de la degradación de 2-AG son sustratos de otras enzimas de gran importancia biológica tales como la lipoxigenasa (LPX)⁵² y la ciclooxigenasa (COX 2)⁵³.

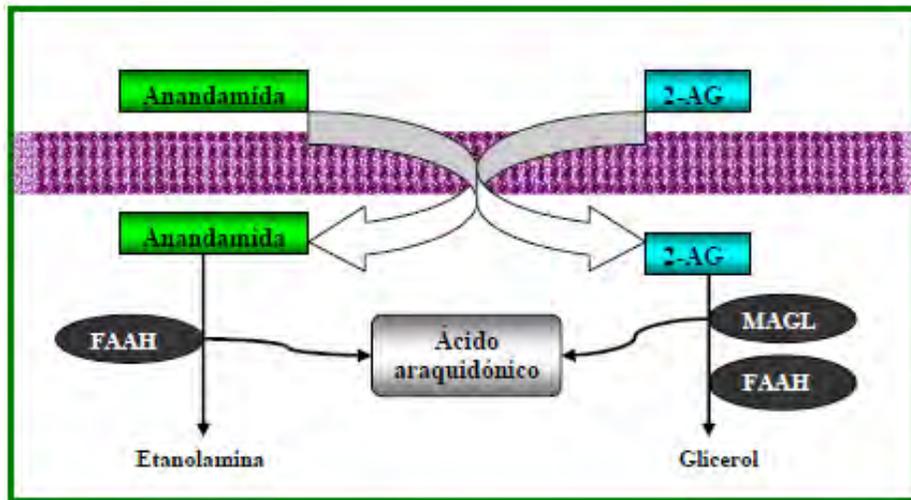


Figura 10. Esquema de las principales vías de degradación de anandamida y 2-araquidonilglicerol (2-AG). Modificado de Di Marzo, 1994.

2.6 Mecanismo de acción de los endocannabinoides. Como se mencionó anteriormente los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G de 7

dominios transmembranales, y sus respuestas funcionales son mediadas por proteínas que unen GTP sensibles a toxina de *pertussis* Gi/o⁵⁴. A través de la estimulación de los receptores CB1 y CB2 produciendo, por un lado, la inhibición de la adenilato ciclasa que lleva a la disminución de los niveles de AMP cíclico⁵⁵, y por otro, la regulación de canales iónicos como la inhibición de canales de calcio tipo L, N y P/Q y la activación de canales de K⁺⁵⁶⁻⁵⁹. Debido a estos mecanismos de acción la actividad de los endocannabinoides juega un papel importante en la neurotransmisión y la actividad cerebral como mecanismo regulador. Por último cabe mencionar que el receptor CB2 puede modular la movilización de Ca²⁺ intracelular de ciertos tipos de células, como las endoteliales⁶⁰ a través de la activación de la PLC, pero a diferencia del receptor CB1, el receptor CB2 no participa en la regulación de la funcionalidad de canales iónicos⁶¹.

Además recientemente se ha documentado que los endocannabinoides pueden actuar sobre otro tipo de receptores diferentes a CB1 y CB2. Un ejemplo de esto es un posible receptor conocido como GPR55, el cual es un receptor huérfano que aparentemente se acopla con proteínas G distintas a Gi o Gs, pero que tiene afinidad intrínseca por los endocannabinoides, lo que sugeriría que activa caminos de señalización diferentes a los ejecutados por CB1 y CB2^{62,63}. Otro ejemplo es el receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1), el cual es una proteína de 6 pasos transmembranales y un canal catiónico no selectivo que se activa por moléculas derivadas de plantas, como la capsaicina, por estímulos como el calor⁶⁴ y por la ANA que se ha mostrado es un agonista de TRPV1 y la interacción con este receptor se produce a nivel citosólico (a diferencia de los receptores CB1 y CB2 cuya unión se produce del lado extracelular) provocando la activación de canales iónicos no selectivos, la activación de protein-quinasas, aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ y liberación del citocromo C^{65,66}.

2.7 Variaciones diurnas del sistema canabinérgico. Los sistemas fisiológicos también muestran una gran variedad de cambios diurnos, ejemplos de esto lo encontramos en el ciclo actividad-reposo, la temperatura corporal, la concentración de ciertos iones, lo mismo sucede con el sistema canabinérgico en el cual se ha documentado que existen fluctuaciones en la expresión de sus receptores, sus ligandos y en las enzimas que participan en su degradación. Hay pocos datos en la literatura respecto a la variación diurna de este sistema. Datos recientes señalan que tanto la anandamida como el 2-AG poseen una marcada variación diurna, tanto en LCR, como en diversas estructuras cerebrales de rata^{67,68}, incluso se ha descrito una variación diurna en la actividad de la FAHH y de la MGL⁶⁹; además nosotros hemos documentado que el propio receptor CB1 presenta una variación diurna, con niveles mayores durante las horas de luz tanto en tallo cerebral como en hipocampo^{70,71}.

3. Planteamiento del problema e hipótesis

Durante un proceso de lesión cerebral, por ejemplo en un TCE, se activan respuestas que inducen daño cerebral y/o muerte celular; sin embargo, también se inducen respuestas de protección que intentan mantener la integridad y la funcionalidad del cerebro y se conocen como neuroprotección. El balance entre ambos tipos de respuestas determinará el destino final del tejido dañado.

En nuestro grupo hemos observado que el daño provocado por un TCE varía dependiendo de la fase del día en que éste ocurre, obteniendo una respuesta de neuroprotección mayor durante las horas de oscuridad respecto a las horas de luz. El sistema canabinérgico se activa posteriormente a una lesión cerebral y esta activación se ha considerado como parte de la respuesta neuroprotectora del organismo.

Proponemos que la diferencia que hemos observado en la recuperación de un TCE ocasionado en las horas de luz versus las horas de oscuridad puede deberse, en parte, a una variación diurna en el grado de activación de sistemas neuroprotectores, como el canabinérgico.

Hipótesis.

La recuperación frente a un traumatismo craneoencefálico presenta variaciones diurnas que se correlacionan con la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general:

Analizar la variación diurna de la respuesta neuroprotectora frente a un traumatismo craneoencefálico y correlacionarla con la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en corteza cerebral de rata.

4.2 Objetivos particulares:

1.- Evaluar los cambios en la respuesta fisiopatológica y conductual, posterior a un traumatismo craneoencefálico inducido a diferentes horas del día.

2. Analizar la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 a lo largo del día en corteza cerebral de rata.

3.- Analizar los cambios en la expresión de receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en corteza cerebral de rata ocasionados por un traumatismo craneoencefálico inducido a diferentes horas del día.

4.- Analizar la correlación entre la recuperación frente a un traumatismo craneoencefálico y la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2.

5. Metodología

5.1 Sujetos. En todos los estudios se utilizaron ratas macho Wistar de 250 a 300 g de peso, al inicio del experimento, mantenidas a temperatura constante, con agua y comida *ad libitum* y en un ciclo luz-oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 8:00 AM, denominado en lo sucesivo ciclo normal o bien luces encendidas a las 8:00 PM, denominado en lo sucesivo ciclo invertido).

5.2 Variaciones diurnas en la respuesta fisiopatológica y conductual frente a un TCE. Los sujetos se ambientaron en las condiciones de bioterio previamente descritas al menos durante 8 días. Se dividieron en 6 grupos y sometieron a un TCE a diferentes horas del día: 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 hs. De esta forma y considerando que se tenían animales tanto en ciclo normal como en ciclo invertido se cubrieron las 24 horas del día. Posteriormente se midieron las siguientes variables: sangrado, escala conductual de daño neurológico, modificaciones en el peso corporal, en la ingesta de comida y agua, así como la sobrevivencia hasta 8 días post-TCE.

5.3 Traumatismo craneoencefálico (TCE). Se utilizó el modelo conocido como –traumatismo en cabeza cerrada-. Consiste en impactar el cráneo expuesto del animal, con un objeto a una presión determinada. El sistema permite que el impacto sea en las coordenadas de P= -2 y L= 1.4, correspondiente a corteza motora. Los animales son previamente anestesiados con hidrato de cloral al 6%. Actualmente contamos en el laboratorio con un sistema que hemos desarrollado ad-hoc, que permite estandarizar el procedimiento del TCE.

El sistema está construido en acero inoxidable y con un diseño sanitario; se opera como un estereotáxico, lo que permite fijar el punto de contacto con el cráneo de manera precisa, el contacto se hace por medio de un pistón neumático, el cual está conectado a un manómetro y a un compresor, lo que a su vez permite controlar la fuerza del impacto con gran precisión. Para estos experimentos fue calibrado a 40 libras.

5.4 Sangrado. Quince minutos después del TCE, la sangre fue drenada y colocada en tubos para microcentrifuga previamente pesados⁷².

5.5 Daño neurológico. Utilizamos la escala conductual de 21 puntos reportada por Hunter et al.⁷³ para evaluar el daño neurológico 24 horas posteriores al TCE. Esta escala evalúa posición de las extremidades (4 puntos), reflejo de rotación (1), equilibrio en una barra horizontal (3), plataforma inclinada (3), rotación (2), coordinación entre visión y posición de las extremidades (2), reflejo contralateral (2), movilidad (2), y condición general (2). Puntaje máximo = 21. También se cuantificó el sangrado posterior al TCE, se analizó la ingesta de agua, de alimento y la sobrevivencia a las 24 horas posteriores al daño.

5.6 Análisis de la expresión de receptores CB1 y CB2. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital. Se extrajo el cerebro, se disectó la corteza cerebral y se congeló a -70°C hasta su análisis. Se utilizó Western blot para la detección los receptores CB1 y CB2, a nivel de proteína y RT-PCR, a nivel de RNA mensajero.

5.7 Detección de CB1 y CB2, a nivel de la proteína. Los tejidos fueron homogenizados con un amortiguador formado por fosfatos (PBS), adicionado con inhibidores de proteasas aprotinina y PMSF, utilizando un sonicador de ultrasonido (ultrasonic homogenizer 4710). Posteriormente se centrifugó ($600 \times g$, 10 min, 4°C), se desechó el primer precipitado. El sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación ($39,000 \times g$, 15min, 4°C). De este segundo sobrenadante se tomó una muestra ($5\mu\text{l}$), y del precipitado una muestra de $2\mu\text{l}$ para realizar una cuantificación de concentración proteica por el método de Lowry⁷⁴.

5.8 Western Blot. Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% adicionado con SDS (Laemmli, 1970) Se mezcló una cantidad correspondiente a $15 \mu\text{g}$ de proteína, de cada una de las muestras, con amortiguador de proteínas 2X, a una dilución 1:1. Se utilizaron estándares de pesos moleculares (GIBCO BRL), los cuales junto con las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se centrifugaron ($10,000 \times g$, 10 min). La electroforesis se corrió en un gel de 0.75 mm, a 150 V, hasta que el frente de corrida llegó a aproximadamente 5 mm del borde inferior del gel, aproximadamente 2 horas.

El patrón de proteínas obtenido se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). La transferencia se llevó a cabo a 100 V, durante una hora en una cámara de transferencia húmeda. La membrana de nitrocelulosa fue teñida con rojo de Ponceau⁷⁵, se fotografió y fue escaneada para utilizar las bandas más conservadas como control de carga en el gel. Posteriormente la membrana fue cortada en tiras, correspondientes a cada una de las muestras corridas en el SDS-PAGE; estas tiras se incubaron en una solución bloqueadora durante 30 min (PBS, Tween 3%, leche libre de grasas al 10% y suero normal de cabra al 2%) con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos. Cada tira se dividió en dos; una se incubó con anti-CB1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) (1:1600), y la otra con anti-CB2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA 1:350 toda la noche a 4°C .

Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS-Tween, 5 min cada uno; se hizo una incubación con un segundo anticuerpo (IgG peroxidado anti conejo hecho en cabra) (1:2000) durante una hora, a temperatura ambiente (TA). Se lavó nuevamente con PBS-Tween durante 5 min. La reacción antígeno-antiCB1-antiligG fue reconocida adicionando el sustrato Diaminobencidina (DBA) (0.5 mg/ml en PBS, más $0.3 \mu\text{l/ml}$ de peróxido de hidrógeno, al 30%), la DBA es oxidada por la enzima peroxidasa, permitiéndonos detectar la presencia de receptores a cannabinoides CB1 o CB2. La membrana se fotografió y fue escaneada. La densidad de las bandas fue analizada utilizando el software de Quantity One (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA).

5.9 Cuantificación del RNAm Extracción del RNA total. Para detectar los cambios en la expresión del RNAm del CB1 y del CB2, se extrajo el RNA total utilizando el método del TRIZOL (Life Technologies, Rockville, MD, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En breve, 100 mg de tejido fueron homogenizados en 1 ml de TRIZOL, se le agregaron 200 μ l de cloroformo y se mezclaron en un vortex. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 X g durante 10 min. Se le agregó 0.5 ml de isopropanol a la fase acuosa para precipitar el RNA total. Este se lavó con etanol, se cuantificó por UV y su integridad se analizó en un gel de agarosa al 1%.

5.10 Retrotranscripción del RNAm y amplificación del cDNA (RT-PCR). Dos μ g de RNA, fueron retro-transcritos utilizando el sistema One Step System (Life Technologies), basándonos en las recomendaciones del fabricante, tratando previamente a las muestras con DNAsa, libre de RNAsa en una solución amortiguadora (1U en 10 μ l), por 15 min a temperatura ambiente, con la finalidad de eliminar el DNA que pudiera interferir en la amplificación del RNAm. Se le adicionó 1 μ l de ácido etilen-diamino-tetraacético y se calentó a 65°C por 10 min, para detener la reacción. Se llevó a cabo la transcripción inversa y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando una mezcla de enzimas en 25 μ l de amortiguador 2X (0.4 mM de dNTPs y 2.4 mM de MgSO₄): 1 μ l de transcriptasa reversa, MgCl₂ y taq-polimerasa (ONE-STEP, GIBCO), así como oligonucleótidos específicos para la retrotranscripción y amplificación del mensajero del receptor CB1: 5'-cat cat cat cca cac gtc ag-3' y 5'-atg ctg ttg tct aga ggc tg-3'; que corresponden a las regiones 951-970 y 1201-1302 del cDNA del CB1²⁷; o bien para el RNAm del receptor CB2: 5'-gga tgc cgg gag aca gaa gtg a-3' y 5'-ccc atg agc ggc agg taa gaa at-3' que corresponden a las regiones 81-102 y 553-552 del cDNA del CB2²⁸. A 33 ciclos; desnaturalización: 45 s, 94°C, alineación: 45 s, 53°C y elongación: 1 min, 72°C. También amplificamos cDNA de ciclofilina, utilizando los oligonucleótidos: 5'-aga cgc cgc tgt ctc ttt tcg-3' y 5'-cca cac agt cgg aga tgg tga tc-3'⁷⁰. Los fragmentos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% y fueron visualizados utilizando bromuro de etidio. Se utilizó un negativo de la fotografía del gel para cuantificar la densidad de las bandas utilizando el software de Quantity One (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA).

5.11 Análisis Estadístico. Los resultados son reportados como valores promedio \pm error estándar. Para ingesta de agua y alimento, pérdida de peso, sangrado y densidad óptica las diferencias significativas fueron obtenidas mediante análisis de varianza y Duncan como post hoc. Para los valores de la escala neuroconductual se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov como post hoc. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

6. Resultados.

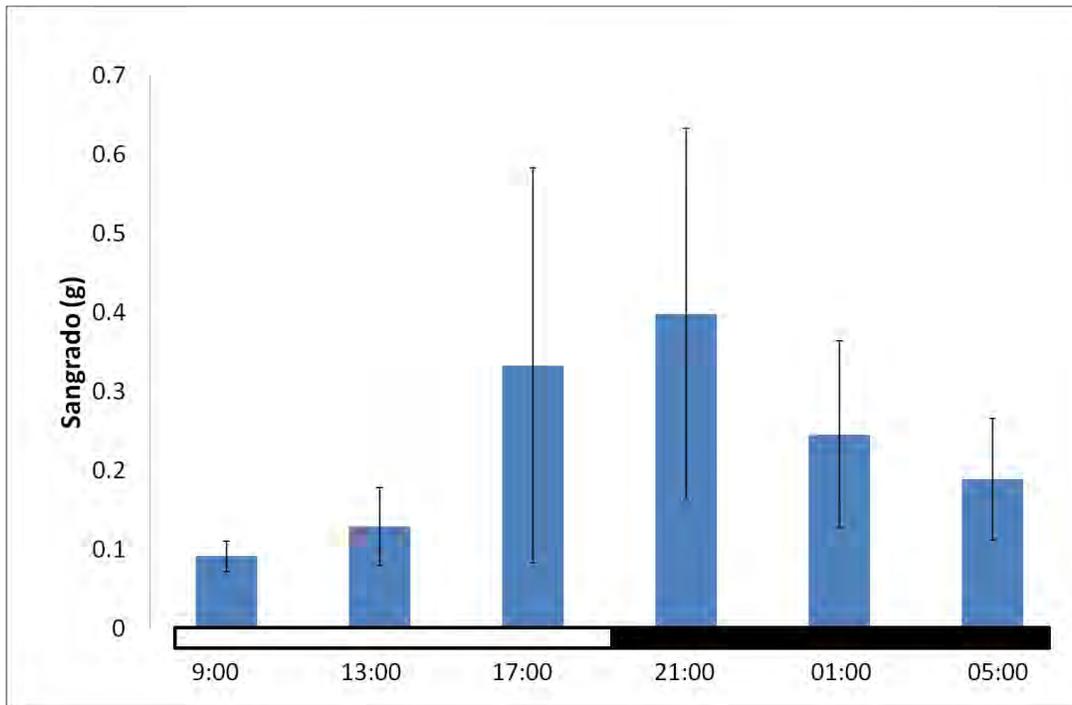


Figura 11. Sangrado provocado por un TCE a diferentes horas del día. Las barras representan el promedio \pm ee del sangrado cuantificado inmediatamente después de un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 19 y 24. No se observan diferencias estadísticamente significativas, análisis de varianza de una vía.

Variaciones diarias en la respuesta fisiopatológica y conductual frente a un TCE. Sometimos a diferentes grupos de ratas a TCE a diferentes horas (9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 hs). No encontramos que existan diferencias significativas en el sangrado ocasionado por el TCE a diferentes horas del día como puede apreciarse en la figura 11.

Tampoco encontramos diferencias significativas en la ingesta de comida y de agua que presentaron las ratas en las 24 horas posteriores al TCE; ver figuras 12 y 13.

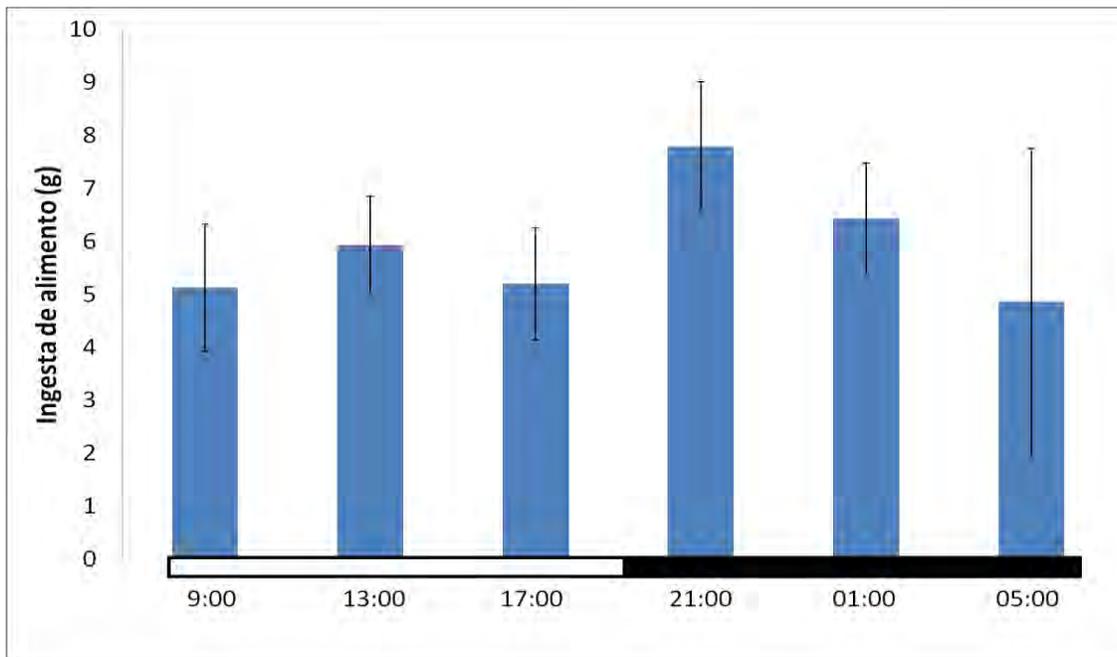


Figura 12. Ingesta de alimento 24 hs posterior a un TCE inducido a diferentes horas del día. Las barras representan el promedio \pm ee del alimento ingerido durante las 24 horas posteriores a un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 16 y 19. No se observan diferencias estadísticamente significativas, análisis de varianza de una vía.

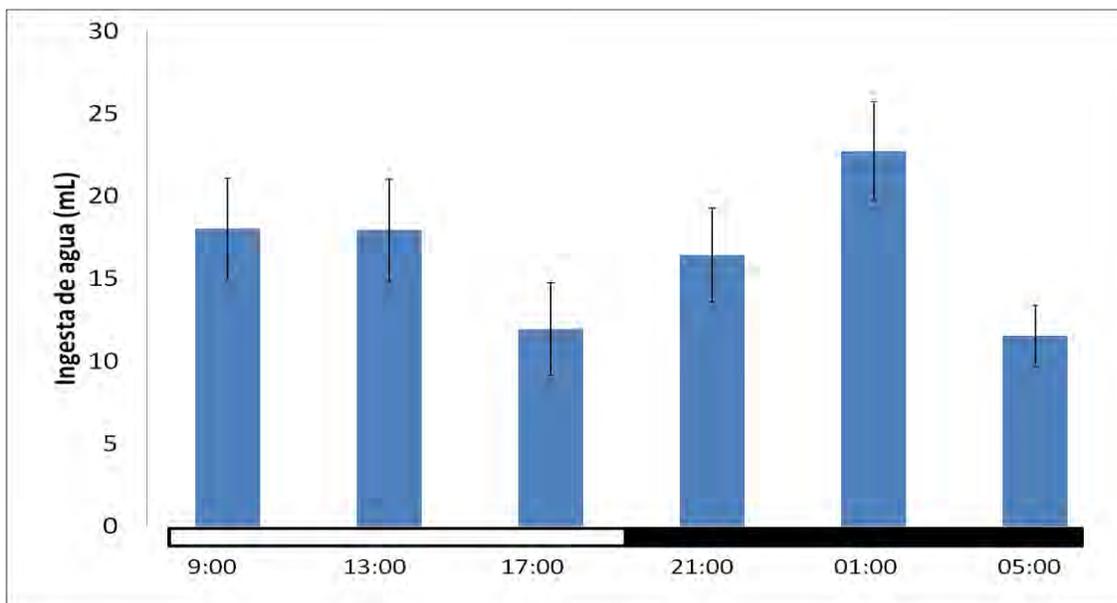


Figura 13. Ingesta de agua 24 hs posterior a un TCE inducido a diferentes horas del día. Las barras representan el promedio \pm ee del agua ingerida durante las 24 horas posteriores a un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 16 y 19. No se observan diferencias estadísticamente significativas, análisis de varianza de una vía.

Sin embargo, encontramos que la pérdida de peso ocasionada por el TCE varía dependiendo de la hora en que éste se ocasiona, como puede apreciarse en la figura 14; en donde se observa que

las ratas sometidas a un TCE a las 21:00 horas presentan una pérdida de peso significativamente menor que aquellas sometidas a un TCE a las 9:00, 13:00 o 5:00 horas.

También observamos que la ejecución de una prueba neuroconductual para evaluar el daño ocasionado por el TCE depende de la hora en que éste ocurrió; en la figura 15 se puede observar que las ratas sometidas a TCE a las 21:00 y 1:00 horas tienen un puntaje significativamente mayor que aquellas en la que el TCE se indujo a las 9:00 o a las 13:00 horas.

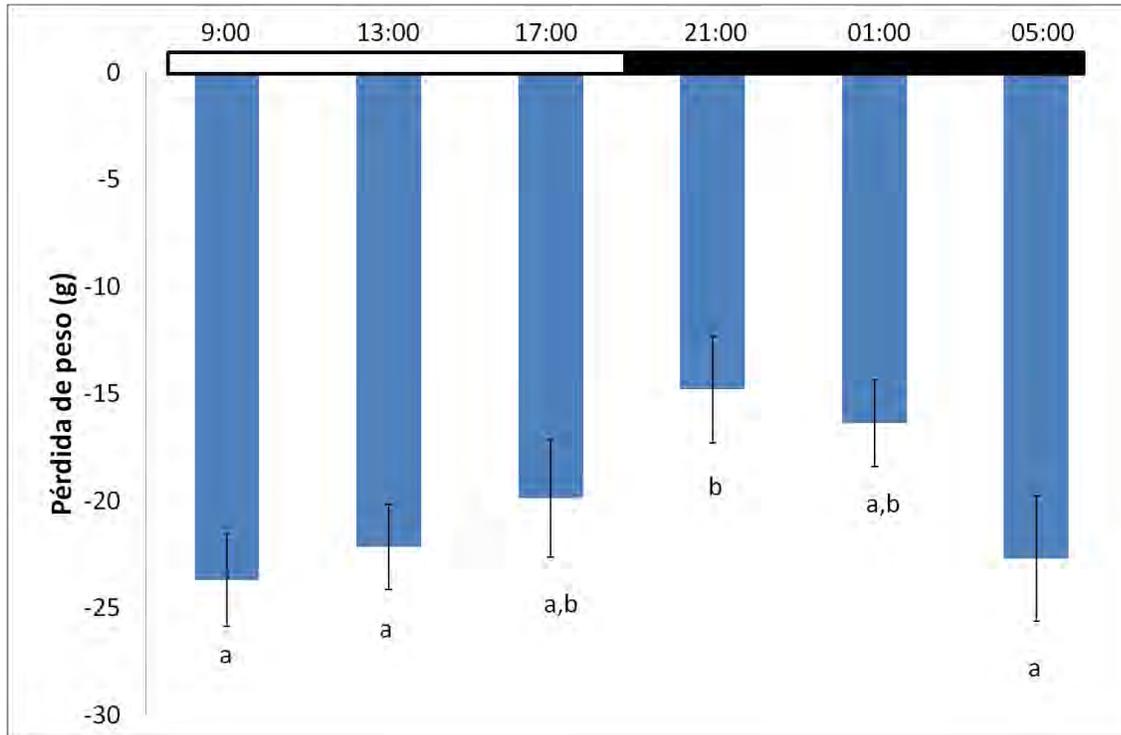


Figura 14. Pérdida de peso corporal posterior a un TCE inducido a diferentes horas del día. Las barras representan el promedio \pm ee de la disminución de peso corporal a las 24 horas después de un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 16 y 19. Las barras con letras iguales no son estadísticamente diferentes, análisis de varianza de una vía y Duncan como post hoc.

En relación a la mortalidad ocasionada por el TCE también observamos que varía dependiendo de la hora en que éste ocurra, como puede apreciarse en la figura 16; sin embargo no alcanza a ser estadísticamente significativo si consideramos todas las horas analizadas ($\chi^2_{5gl} = 7.67$; $p = 0.175$), ya que esta prueba estadística requiere tamaños de muestra muy grande. Sin embargo si juntamos los datos por fase del ciclo luz oscuridad encontramos una disminución estadísticamente significativa en la mortalidad ocasionada por el TCE cuando este se induce en las horas de oscuridad ($\chi^2_{1gl} = 4.42$; $p < 0.035$).

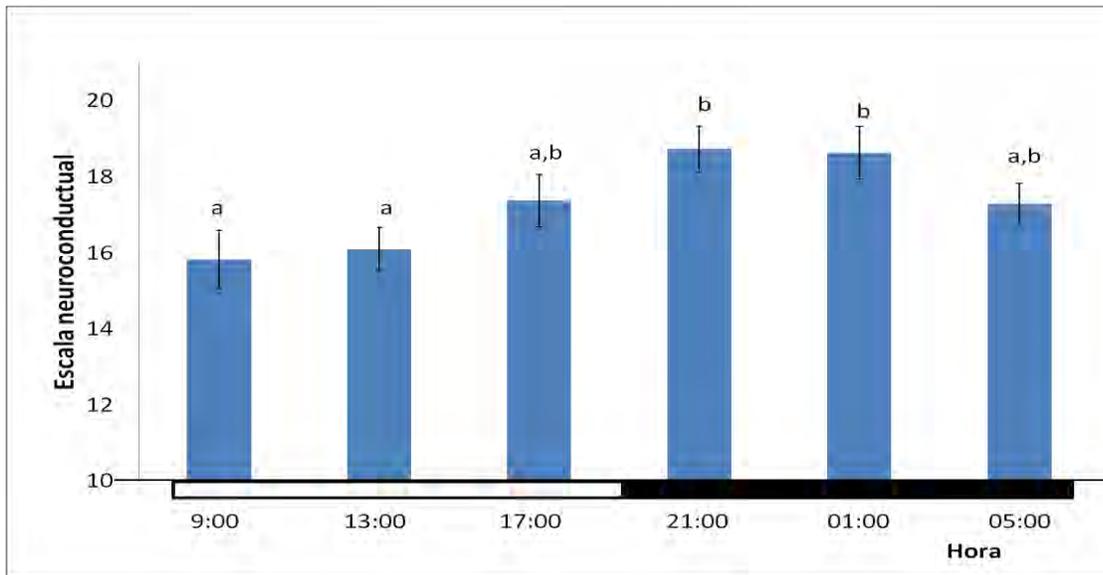


Figura 15. Evaluación del daño neuroconductual 24 hs posterior a un TCE inducido a diferentes horas del día. Las barras representan el promedio \pm ee del puntaje obtenido en la ejecución de una prueba neuroconductual (Hunter et al, 2000) a las 24 horas después de un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 16 y 19. Las barras con letras iguales no son estadísticamente diferentes, Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov como post hoc.

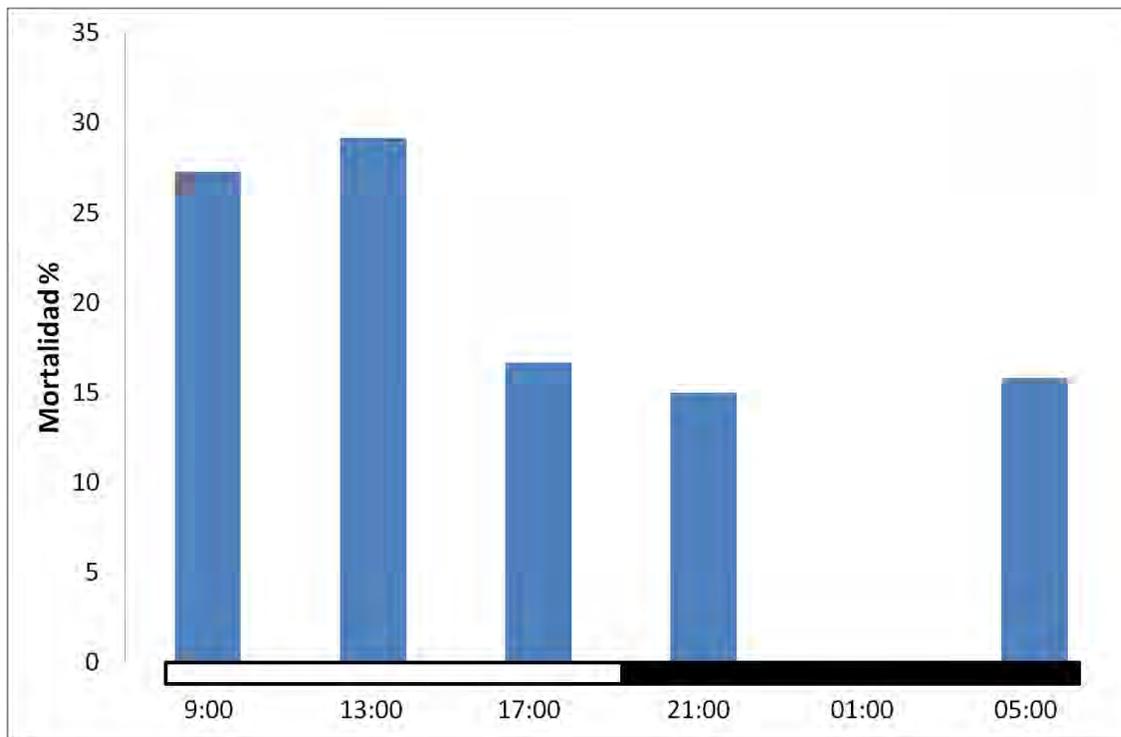


Figura 16. Mortalidad ocasionada por un TCE inducido a diferentes horas del día. Las barras representan el porcentaje de mortalidad observado en un periodo de 24 horas ocasionado por un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 18 y 24. No se observan diferencias estadísticamente significativas, Chi cuadrada.

Expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 a lo largo del día en corteza cerebral de rata. Sacrificamos diferentes grupos de ratas a lo largo de las 24 horas del día para analizar la

expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2, tanto a nivel de proteína como del RNAm. En la figura 17 podemos observar que el RNAm para el CB1 no presenta variaciones significativas a lo largo del día; sin embargo la proteína si presenta diferencias significativas dependiendo de la hora del día, con una mayor expresión significativamente mayor a las 5:00 horas respecto a las 9:00, 13:00 y, 21:00 horas. En relación a la expresión del receptor CB2, en la figura 18 podemos observar que no se presentan variaciones significativas a lo largo de las 24 horas del día ni en la expresión del RNAm ni de la proteína.

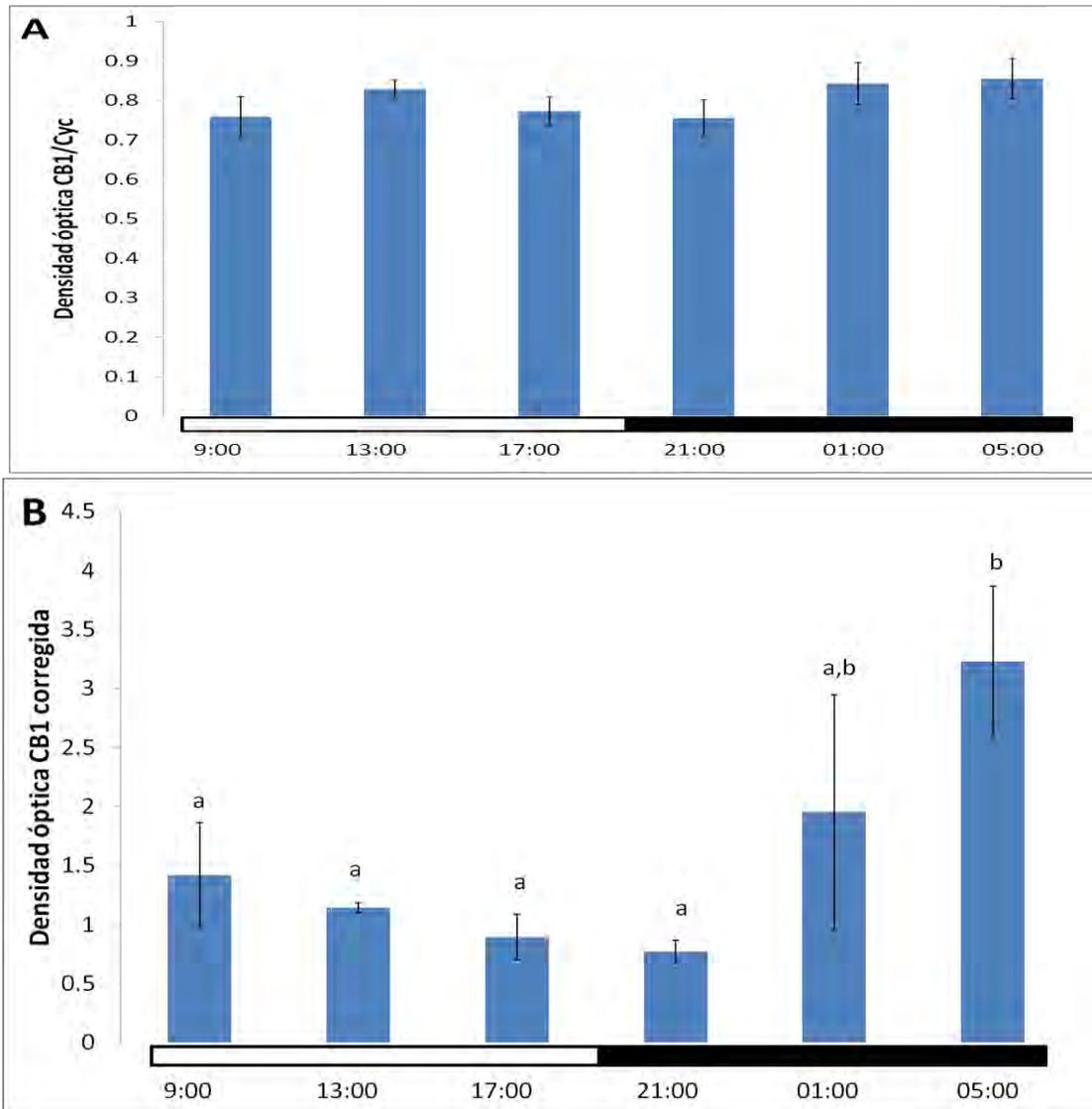


Figura 17. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la expresión del receptor CB1 en corteza cerebral. (A) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad óptica obtenida a partir de un negativo del gel teñido con bromuro de etidio de los fragmentos de RT-PCR correspondientes al receptor CB1 entre la densidad obtenida para los fragmentos de ciclofilina; n=3. No se observan diferencias estadísticamente significativas. (B) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad óptica para la banda correspondiente al receptor CB1 dividida entre la densidad óptica de la banda más conservada en la tinción de rojo de Ponceau. Las barras con letras iguales no son estadísticamente diferentes, análisis de varianza de una vía y Duncan como *post hoc*.

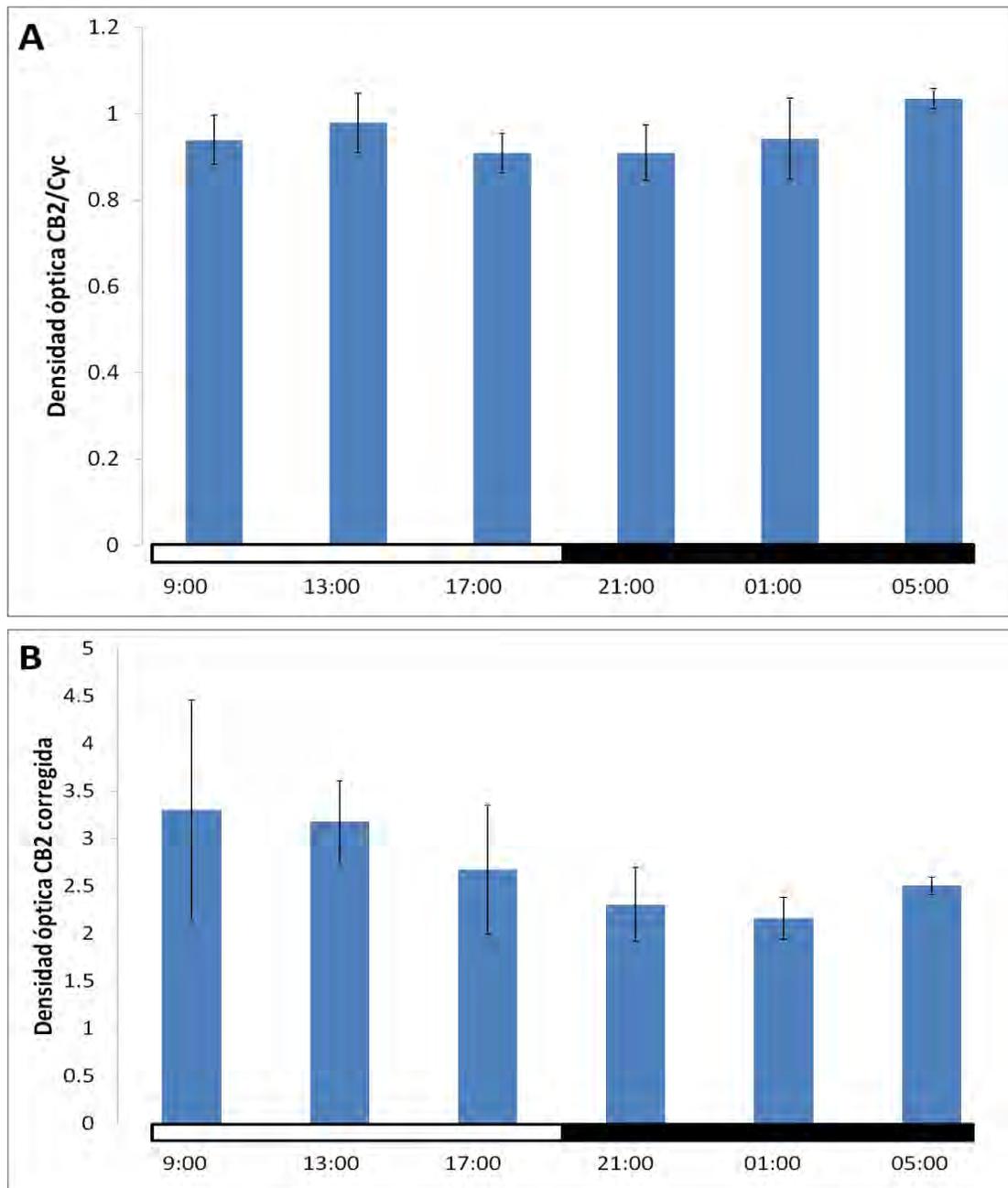


Figura 18. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la expresión del receptor CB2 en corteza cerebral. (A) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad obtenida a partir de un negativo de un gel teñido con bromuro de etidio de los fragmentos de RT-PCR correspondientes al receptor CB2 entre la densidad obtenida para los fragmentos de ciclofilina; n=3. No se observan diferencias estadísticamente significativas. (B) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad óptica para la banda correspondiente al receptor CB2 dividida entre la densidad óptica de la banda más conservada en la tinción de rojo de Ponceau; n=3. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

Expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 posterior a un traumatismo craneoencefálico inducido a diferentes horas del día. Sometime a diferentes grupos de ratas a TCE a lo largo de las 24 horas del día y las sacrificamos 24 horas pos traumatismo para analizar la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2, tanto a nivel de proteína como del RNAm.

En la figura 19 se muestra la expresión del receptor CB1, tanto a nivel de su RNAm como de la proteína; no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión asociadas a las diferentes horas del día ni en la corteza cerebral contralateral al TCE ni en la ipsilateral. En la figura 20 se muestra la expresión del receptor CB2, tanto a nivel de su RNAm como de la proteína; no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la expresión a nivel del RNAm asociadas a las diferentes horas del día ni en la corteza cerebral contralateral al TCE ni en la ipsilateral, sin embargo a nivel de la proteína se observa un incremento en la expresión a las 17:00 horas respecto a las 13:00 horas en la corteza ipsilateral.

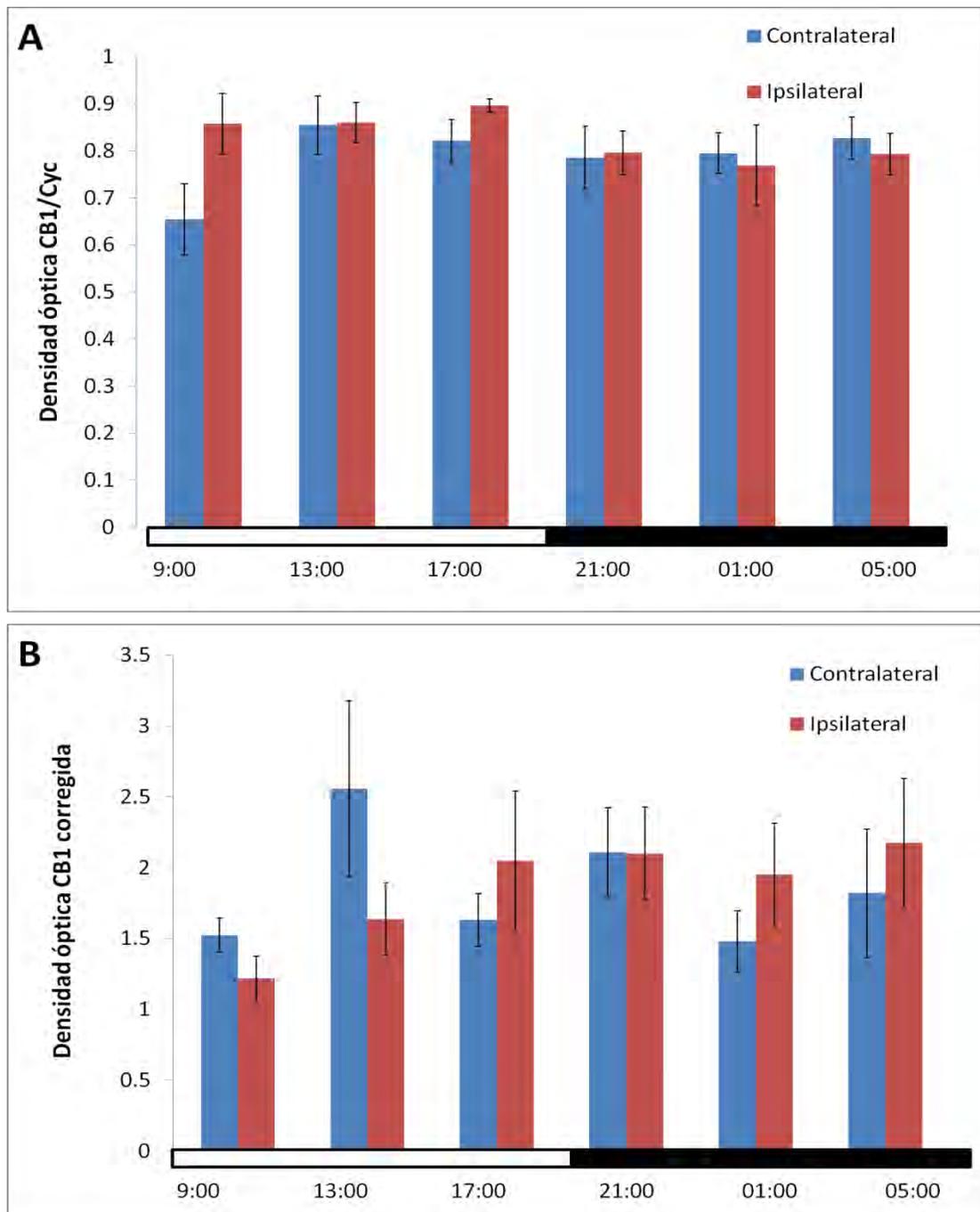


Figura 19. Expresión del receptor CB1 en corteza cerebral en ratas sometidas a un TCE a diferentes horas del día. (A) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad obtenida a partir de un negativo del gel teñido con bromuro de etidio de los fragmentos de RT-PCR correspondientes al receptor CB1 entre la densidad obtenida para los fragmentos de ciclofilina; n=3. No se observan diferencias estadísticamente significativas. (B) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad óptica para la banda correspondiente al receptor CB1 dividida entre la densidad óptica de la banda más conservada en la tinción de rojo de Ponceau; n=4. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

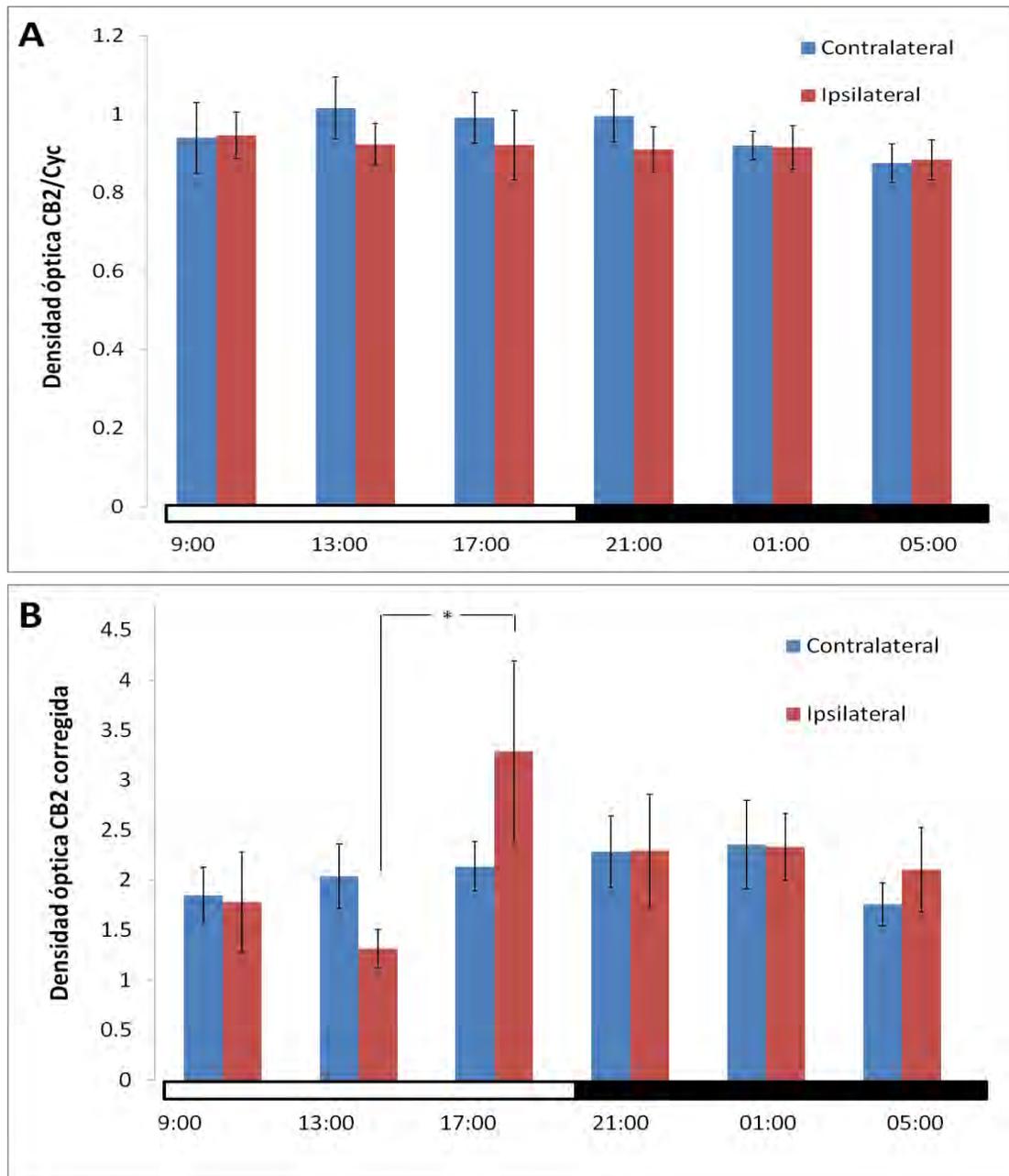


Figura 20. Expresión del receptor CB2 en corteza cerebral en ratas sometidas a un TCE a diferentes horas del día. (A) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad obtenida a partir de un negativo del gel teñido con bromuro de etidio de los fragmentos de RT-PCR correspondientes al receptor CB2 entre la densidad obtenida para los fragmentos de ciclofilina; n=3. No se observan diferencias estadísticamente significativas. (B) Las barras representan el promedio \pm ee de la densidad óptica para la banda correspondiente al receptor CB2 dividida entre la densidad óptica de la banda más conservada en la tinción de rojo de Ponceau; n=4. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

densidad óptica de la banda más conservada en la tinción de rojo de Ponceau; n=4. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

7. Discusión

Variaciones diurnas en la respuesta fisiopatológica y conductual frente a un TCE. Como señalamos en la introducción, es bien conocido que el ataque isquémico cerebral, de manera similar al ataque al miocardio, tiene un marcado ritmo nictameral en humanos. Numerosos estudios han mostrado que la hora de inicio de los accidentes vasculares cerebrales, así como de los ataques isquémicos transitorios ocurren preferentemente entre las 6:00 y las 12:00 de la mañana, es decir, después de que el sujeto se levanta y empieza a presentar actividad^{22,77}. Así mismo, en modelos animales de isquemia, se ha observado que ésta provoca mayor o menor daño dependiendo de la hora en que se induce. Por ejemplo, en ratas, utilizando un modelo de oclusión y reperusión de la arteria cerebral media, se observa un volumen mayor de lesión cerebral, si la isquemia se induce en las horas de oscuridad en comparación con las horas de luz²³; que coincide al igual que en el ser humano con el inicio de su actividad, mientras que en ratones, sometidos a isquemia global, se ha observado una mayor mortalidad y menor grado de recuperación si este evento se induce a la mitad del periodo de luz en comparación con otras horas del día⁷⁹.

En el laboratorio previamente habíamos mostrado que la severidad de un TCE variaba de acuerdo al fotoperiodo. Utilizando a la rata como modelo, encontramos que la recuperación frente a un TCE infligido mediante la técnica de —closed head injury¹⁵ depende del ciclo luz-oscuridad, siendo mejor la recuperación si el traumatismo ocurre en las horas de oscuridad respecto a las horas de luz²¹. Es decir parece haber una respuesta de neuroprotección mayor en las horas de oscuridad. En este trabajo estamos ampliando estas observaciones previas, utilizando un sistema para inducir el TCE que nos permite tener resultados más reproducibles y encontramos que, efectivamente el daño causado por un TCE presenta variaciones diurnas, mostramos que el TCE inducido a las 21:00 o a la 1:00 horas produce un daño neuroconductual menor que si éste es inducido a las 9:00 o 13:00 horas. Incluso encontramos una menor mortalidad ocasionada por el TCE, si éste se induce en las horas de oscuridad respecto a las horas de luz. En relación a que el cerebro no sea igual en las horas de luz que en las de oscuridad no es sorprendente, numerosas evidencias señalan la importancia de los ritmos en general, y en particular de los ritmos circadianos en la fisiología. La presencia de ritmos circadianos se ha explicado como una respuesta adaptativa de los diferentes organismos a las variables medioambientales. De hecho se acepta que prácticamente cualquier parámetro fisiológico que se ha medido por un periodo de 24 horas en el ser humano presenta fluctuaciones⁷⁹ incluso varios aspectos de la fisiología del cerebro, actividad neuronal y secreción de neurotransmisores, entre otros, cambian a lo largo del día, de tal forma que las funciones cerebrales presentan

variaciones circadianas, dependientes de la hora del día; aunque cabe señalar que también dependen del ciclo sueño-vigilia^{80,81}.

Variaciones diurnas en la expresión de receptores a cannabinoides CB1 y CB2 a lo largo del día en corteza cerebral de rata.

La variación diurna del sistema canabinérgico ha sido reportada previamente tanto por nuestro grupo como por otros investigadores. Por ejemplo se conoce que tanto la anandamida como el 2-AG poseen una marcada variación diurna en LCR y en diversas estructuras cerebrales de rata^{69,82}; incluso se ha descrito una variación diurna en la actividad de la FAHH y de la MGL⁶⁹. Resultados nuestros y en colaboración con el grupo del Dr. Prospéro han mostrado que el propio receptor CB1 presenta una variación diaria, con niveles mayores para la proteína durante las horas de luz y para el RNAm durante la oscuridad, tanto en tallo cerebral como en hipocampo. Estas variaciones no se observan en el cuerpo estriado^{80,81}.

En este trabajo mostramos que en corteza cerebral se presenta una variación diurna para la expresión del receptor CB1, a nivel de proteína, sin embargo no encontramos variaciones en su RNAm. En cuanto al receptor CB2, encontramos una variación diurna en la expresión de la proteína, que sin embargo se pierde al utilizar el valor corregido por la ciclofilina y no encontramos variaciones en su RNAm.

No es sorprendente encontrar variaciones diurnas en el receptor CB1, en el sentido de que muchos otros receptores han sido reportados que presentan una variación a lo largo de las 24 horas del día, por ejemplo, los receptores dopaminérgicos^{84,85}. A pesar de que la mayoría de los receptores expresan cambios mucho más apreciables que los que estamos reportando para el CB1, la variación en dicho receptor, pensamos que es suficiente para tener significancia fisiológica, ya que contribuye potencialmente en los efectos conductuales provocados por los cannabinoides vía receptor CB1, por lo que podríamos decir que estamos ante un sistema muy sensible capaz de registrar cambios mínimos en su receptor para modular una conducta dada.

Variaciones diurnas en la expresión de receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en corteza cerebral de rata ocasionadas por un traumatismo craneoencefálico inducido a diferentes horas del día.

Diversos autores han reportado que la isquemia induce variaciones en la expresión de los receptores CB1 y CB2, aunque la temporalidad con que este incremento se aprecia varía dependiendo del modelo empleado; por ejemplo Jin⁵² señala que la oclusión de la arteria cerebral media por 20 minutos ocasiona un incremento en la expresión del receptor CB1 en la zona adyacente a la arteria desde 2 horas después de la isquemia y hasta por 72 horas; mientras que Schomacher⁸⁶ reporta que periodo más cortos de isquemia, de 2.5 minutos, reducen la expresión del receptor CB1 en hipocampo de gerbos. Zhang⁸⁷ encuentra que, en ratones, la oclusión de la arteria cerebral media por 60 minutos causa un incremento en la expresión del RNAm del receptor CB1 en las primeras 6 horas de reperfusión, que se pierde a las 24 horas; mientras que el RNAm del CB2 presenta una disminución en las primeras horas de reperfusión y un incremento a las 24 horas.

El cambio en la expresión de estos receptores utilizando modelos de TCE prácticamente no está analizado. Nuestros resultados no muestran un cambio importante en la expresión ni de CB1 ni de CB2, sin embargo muestran que el TCE provoca una disrupción de la variación diurna en la expresión del receptor CB1 en corteza cerebral. En este sentido diversos autores han reportado que un TCE provoca desregulación circadiana en pacientes, que incluyen mecanismos homeostáticos alterados tales como la regulación de la presión arterial, la frecuencia cardiaca, la temperatura corporal⁸⁸, y los ciclos hormonales⁸⁹, así como el ciclo de sueño-vigilia^{90,91}. Incluso recientemente se ha mostrado que en ratas sometidas a TCE se pierde la expresión circádica del gen clock en núcleo supraquiasmático y en hipocampo⁹².

8. Conclusiones.

Encontramos que el TCE inducido a diferentes horas del día produce cambios diferenciales en la pérdida de peso corporal y en la ejecución en una prueba neuroconductual, analizando ambas variables a las 24 horas post-TCE. Las ratas sometidas a TCE a las 21:00 y 01:00 horas tuvieron una menor pérdida de peso y una mejor ejecución que aquellas ratas sometidas a TCE a las 09:00 y 23:00 horas.

No encontramos diferencias significativas en las otras variables analizadas: sangrado, ingesta de comida y de agua.

Con relación a la expresión de los receptores a cannabinoides en corteza de rata, solo encontramos una variación significativa en la proteína del receptor CB1, presentando los niveles más elevados entre la 01:00 y las 5:00 horas. Así mismo observamos que el TCE provocó la pérdida de este ritmo.

Estos resultados no apoyan el papel neuroprotector del sistema canabinérgico y señalan que la expresión del receptor a cannabinoides CB1 en corteza cerebral se asocia con un menor daño ocasionado por un TCE.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Menon K, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position Statement: Definition of Traumatic Brain Injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2010;91:1637-40
2. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Aspectos clínicos y epidemiológicos del Trauma Craneoencefálico en México. *Secretaría de Salud* 2008;25:1-4
3. Chen AY, Colantonio A. Defining neurotrauma in administrative data using the International. Classification of Diseases Tenth Revision. *Emerging Themes in Epidemiology.* 2011; 8: 1 – 45
4. Belinda J Gabbe, Peter A Cameron, Caroline F Finche. The status of the Glasgow Coma Scale. *Emergency Medicine* 2003; 15: 353-360.
5. Traumatic Brain Injury In the United States. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. Emergency Department Visits, Hospitalizations and Deaths 2002-2006. Revisado en Junio 1, 2011, Disponible en: <http://www.cdc.gov/TraumaticBrainInjury>
6. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Aspectos clínicos y epidemiológicos del Trauma Craneoencefálico en México. *Secretaría de Salud* 2008;25:1-4.
7. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic injury in adults. *Lancet Neurology.* 2008;7:728-41.
8. Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. Seizures and Stroke. In: *Molecular Neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience.* McGraw-Hill, NY. 2000; p 479-503.
9. Budd SL, Nicholls DG: Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1996; 67:2282-91
10. Johnson EM Jr, Greenlund LJS, Akins PT, et al: Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury. *J Neurotrauma* 1995; 12:843-52
11. Chen J, Nagayama T, Jin K, et al: Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1998; 18:4914-28
12. Dignal Ulrich, Ischemic tolerance and endogenous. *Neurosciences* Vol.26 No.5 May 2003
13. Stein DG, Wright DW. Progesterone in the clinical treatment of acute traumatic brain injury. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010;19(7):847-57.
14. Jin KL, Mao XO, Godsmith PC, Greenberg DA. 1 cannabinoid receptor induction in experimental stroke. *Ann Neurol* 48: 257-261, 2000.
15. Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413: 527-531, 2001.

16. Mechoulam R, Lichtman AH. Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science*, 302:65-67, 2003.
17. Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 19: 2987-2995, 1999.
18. Panikashvili D, Shein, NA, Mechoulam R, , Trembomblor V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis* 22: 257-264, 2006.
19. Sinor AM, Irving SM, Greenberg DA. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Letters* 278: 157-160, 2000.
20. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities *Brain Research Reviews* 39: 55–73, 2002.
21. Martínez Vargas M, González-Rivera R., Soto Núñez M., Cisneros Martínez M., Huerta Saquero A., Morales Gomez J., Molina guarneros J., Navarro L. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations. Effect of cystatin C. *Neuroscience Letters* 400 21-24, 2006.
22. Marler J. Circadian variation in stroke onset. In: Deedwania PC (ed). *Circadian Rhythms of Cardiovascular Disorders*. Futura publishing Co Inc. Armonk NY. Pp 163-172, 1993.
23. Vinall P E, Kramer M S, Heinel L A, Rosenwasser R H. Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult. *J Neurosurg* 93: 82-89, 2000.
24. Tischkau SA, Cohen JA, Stark JT, Gross DR, Bottum KM. Time of the day affects expression of hippocampal markers for ischemic damage induced by global ischemia. *Experimental Neurology* 208: 314-322, 2007.
25. Mechoulam R, Feigenbaum JJ, Lander N, Segal M, Jarge TUC, Hiltunen AJ, Consroe P. Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity. *Experientia*. 1988;44(9): 762-764.
26. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, elucidation and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 1964; 86: 1646-1947.
27. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein, M, Young A, and Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564, 1990.
28. Munro S, Thomas KL and Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65, 1993.
29. Devane WA, Hanus L, Brever AS, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949, 1992.
30. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumdky M, Kaminski NE. Identification of an endogenous 2-monoglyceride present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90, 1995.
31. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 215(1): 89-97.
32. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996;384(6604): 83-87.
33. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98(7): 3662-3665.

34. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(3): 1020-1024.
35. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(11):873-884.
36. Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 2006; 8(2): E298-E306.
37. Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1998; 85(2): 393-411.
38. Hajos N, Kathuria S, Dinh T, Piomelli D, Freund TF. Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: effects of low temperature and the transport inhibitor AM404. *Eur J Neurosci.* 2004; 19(11): 2991-2996.
39. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(14):8268-8273.
40. Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2(1): 69-82.
41. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci.* 2003;23(4): 1398-1405.
42. Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology.* 2001; 121(4): 767-774.
43. Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan?. *Br J Pharmacol.* 2007;152(7): 1092-1101.
44. Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribouot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2002; 55(3): 619-625.
45. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(11)873-884.
46. Okamoto Y, Wang J, Morishita J y Ueda N. 2007. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodiver.* 4(8):1842-1857.
47. Habayeb OM, Bell SC y Konje JC. 2002. Endogenous cannabinoids: metabolism and their role in reproduction. *Life Sci.* 70(17):1963-1977.
48. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S y Waku K. 2002. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66(2-3):173-192.
49. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC y Piomelli D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 372(6507):686-691.
50. Cravatt BF y Lichtman AH. 2003. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Curr Opin Chem Biol.* 7:469-475.

51. Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, Dubois RN, Brash AR, Marnett LJ. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem.* 2002; 277(26): 23278-23286.
52. Edgmond WS, Hillard CJ, Falck JR, Kern CS y Campbell WB. 1998. Human platelets and polymorphonuclear leukocytes synthesize oxygenated derivatives of arachidonylethanolamide (anandamide): their affinities for cannabinoid receptors and pathways of inactivation. *Mol Pharmacol.* 54(1):180-188.
53. Kozak KR, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002; 66(2-3): 211-220.
54. Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(2): 224-238.
55. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein, M, Young A, and Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564, 1990.
56. Mackie K y Hille B. 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3825-3829.
57. Mackie K, Lai Y, Westenbroek R y Mitchell R. 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 15:6552-6561.
58. Henry DJ y Chavkin C. 1995. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett.* 186:91-94.
59. Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol.* 1999; 276(6 Pt 2): H2085-H2093.
60. Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(8): 1351-1361.
61. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 1995; 48(3): 443-450.
62. Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27(1): 1-4.
63. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR y O'Dowd BF. 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 64:193-198.
64. Szallasi A y Blumberg PM. 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 51:159-212.
65. Maccarrone M y Finazzi-Agro A. 2003. The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 10:946-955.
66. Yamaji K, Sarker KP, Kawahara K, Iino S, Yamakuchi M, Abeyama K, Hashiguchi T y Maruyama I. 2003. Anandamide induces apoptosis in human endothelial cells: its regulation system and clinical implications. *Thromb Haemost.* 89:875-884.
67. Valenti, M., Vigano, D., Casico, M. G., Rubino, T., Steardo, L., Parolaro, D. and Di Marzo, V. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 945–950, 2004.
68. C

69. Valenti, M., Vigano, D., Casico, M. G., Rubino, T., Steardo, L., Parolaro, D. and Di Marzo, V. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 945–950, 2004.
70. Martínez-Vargas M, González-Rivera R, Murillo-Rodríguez E, Landa A, Méndez-Díaz M, Prospero-García O, Navarro L. Sleep modulates Cannabinoid Receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117: 197-201, 2003.
71. Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats *Psychopharmacology (Berl)*. 2007
72. Martínez Vargas M, González-Rivera R., Soto Núñez M., Cisneros Martínez M., Huerta Saquero A., Morales Gomez J., Molina guarneros J., Navarro L. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations. Effect of cystatin C. *Neuroscience Letters* 400 21-24, 2006.
73. Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadigam SJ, Parson AA. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*, 2000, 39, 806-816
74. Lowry oh, Rosebrough NJ, Farr Al, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75
75. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010 Jun 15;401(2):318-20
76. Porcella A, Casellas P, Gessa GL, Pani L. Cannabinoid receptor CB1 mRNA is highly expressed in the rat ciliary body: implications for the antiglaucoma properties of marihuana. *Brain Res Mol Brain Res.* 15;58(1-2):240-245, 1998.
77. Butt MU, Zakaria M, Hussain HM. Circadian pattern of onset of ischaemic and haemorrhagic strokes, and their relation to sleep/wake cycle. *J Pak Med Assoc.* 2009 Mar;59(3):129-32.
78. Weil ZM, Karelina K, Su AJ, Barker JM, Norman GJ, Zhang N, Devries AC, Nelson RJ. Time-of-day determines neuronal damage and mortality after cardiac arrest. *Neurobiol Dis.* 2009 Nov;36(2):352-60
79. Gruart A, Delgado JM, Escobar C, Aguilar-Roblero R (2002). Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos* 188. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
80. Valdez P, Ramírez C, García A, Talamantes J (2008). Los cambios en la atención a lo largo del día. *Ciencia* 59: 14-23.
81. Leproult R, Persson PB. (2002) Enhanced mental performance at higher body temperature? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283: R1368-1369.
82. Murillo-Rodriguez E, Désarnaud F, Prospero-García O. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci* 79 (1): 30-7. 2006.
83. Naber D, Wirz-Justice A, Kafka MS, Tobler I, Borbely AA (1981) Seasonal variations in the endogenous rhythm of dopamine receptor binding in rat striatum. *Biol Psychiatry* 16:831–835.
84. Wirz-Justice A. Dopamine receptor rhythms. *Biol Psychiatry.* 1984 Aug;19(8):1274-1276.

85. Torner C, Sanchez-Hurtado S, Aguilar-Roblero R (1998) Diurnal variations of striatal D2 dopaminergic receptors and its relation with haloperidol-induced catalepsy. *Biol Rhythm Res* 29:538–545.
86. Schomacher M, Müller HD, Sommer C. Short-term ischemia usually used for ischemic preconditioning down-regulates central cannabinoid receptors in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol.* 2006 Jan;111(1):8-14.
87. Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Ganea D, Tuma RF. Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Neuroscience.* 2008 Mar 27;152(3):753-60.
88. Paul T, Lemmer B (2007) Disturbance of circadian rhythms in analgosedated intensive care unit patients with and without craniocerebral injury. *Chronobiol Int* 24: 45–61.
89. Llompart-Pou JA, Perez G, Raurich JM, Riesco M, Brell M, et al. (2010) Loss of cortisol circadian rhythm in patients with traumatic brain injury: a microdialysis evaluation. *Neurocrit Care* 13: 211–216.
90. Ayalon L, Borodkin K, Dishon L, Kanety H, Dagan Y (2007) Circadian rhythm sleep disorders following mild traumatic brain injury. *Neurology* 68: 1136–1140.
91. Castriotta RJ, Murthy JN (2010) Sleep Disorders in Patients with Traumatic Brain Injury: A Review. *CNS Drugs* 25: 175–185.
92. Boone DR, Sell SL, Micci MA, Crookshanks JM, Parsley M, Uchida T, Prough DS, DeWitt DS, Hellmich HL. Traumatic brain injury-induced dysregulation of the circadian clock. *PLoS One.* 2012;7(10):e46204.