

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Trastornos de los estados de ánimo secundarios al infarto cerebral neonatal en un modelo en rata. Eficacia terapéutica del cannabidiol**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Villa Cruz**

**Directores**

**José Martínez Orgado**  
**Ana Gutiérrez Rodríguez**

**Madrid**

**© María Villa Cruz, 2022**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

TRASTORNOS DE LOS ESTADOS DE ÁNIMO SECUNDARIOS AL INFARTO  
CEREBRAL NEONATAL EN UN MODELO EN RATA.  
EFICACIA TERAPÉUTICA DEL CANNABIDIOL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

MARÍA VILLA CRUZ

DIRECTORES

JOSÉ MARTÍNEZ ORGADO  
ANA GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
Accidente Cerebrovascular Isquémico Perinatal .....	23
Definición .....	23
Tipos .....	23
Incidencia .....	25
Gasto para el sistema sanitario .....	26
Etiología.....	27
Factores de riesgo .....	28
Fisiopatología .....	29
Cerebro inmaduro .....	33
Presentación clínica.....	35
Secuelas.....	35
Falta de tratamiento óptimo .....	36
El CBD como opción de tratamiento en el PAIS .....	38
Cannabinoides y Sistema Cannabinoide Endógeno .....	38
Cannabidiol.....	40
VCE-004.8 .....	42
Trastornos del estado de ánimo tras infarto cerebral .....	44
Relación con el infarto cerebral isquémico arterial .....	44
Depresión post-stroke.....	44
Problemas de conducta y del estado de ánimo después de PAIS.....	45
Monoaminas e infarto cerebral isquémico arterial .....	45
Dopamina y depresión .....	46
Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad .....	48
Dopamina y TDAH .....	48
Falta de estudios en PAIS .....	49
Modelos animales .....	51
Modelo animal de PAIS .....	51
Modelos preclínicos de trastornos del estado de ánimo .....	51
Implicación en el PAIS .....	53
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
Diseños experimentales .....	61
Diseño experimental 1 .....	61
Diseño experimental 2 .....	61
Diseño experimental 3 .....	62
Diseño experimental 4 .....	62
Animales de experimentación.....	63
Inducción del PAIS.....	63
Distribución de grupos experimentales .....	64
Preparación de los fármacos.....	65
Cannabidiol.....	65
GBR 12909 dihidrocloruro.....	66
VCE-004.8 .....	66
Imágenes de resonancia magnética.....	66
Pruebas neuroconductuales .....	67
Pruebas neuroconductuales a corto plazo (p14) .....	68
Pruebas neuroconductuales a largo plazo (p37).....	68
Medida de neurotransmisores.....	70
Obtención de muestras.....	70
Determinación de neurotransmisores .....	70
Estado histológico a nivel microscópico .....	71
Obtención y preparación de muestras.....	71
TUNEL.....	71
Inmunohistoquímica .....	72
Expresión de receptores dopaminérgicos.....	73
Obtención y procesado de muestras .....	73
Western blot.....	74
Análisis estadístico .....	75
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
Aclaraciones iniciales .....	79
Reproducción del modelo de MCAO.....	79
Determinación del daño por MRI.....	79
Determinación del daño funcional.....	80
Determinación de la muerte celular mediante TUNEL .....	81
Alteraciones del estado de ánimo.....	82
Alteraciones neuroconductuales .....	82

Alteraciones moleculares.....	84
Alteraciones histológicas.....	85
Alteración de receptores.....	87
Efecto de un inhibidor de la recaptación de DA en el daño isquémico .....	90
Efecto sobre el daño a nivel macroscópico.....	90
Efecto sobre el daño funcional.....	90
Efecto sobre la muerte celular .....	91
Efecto de un inhibidor de la recaptación de DA en el estado de ánimo.....	93
Efecto sobre las alteraciones neuroconductuales .....	93
Efecto del CBD en el daño isquémico.....	96
Efecto sobre el daño a nivel macroscópico.....	96
Efecto sobre el daño funcional.....	96
Efecto sobre la muerte celular .....	97
Efecto del CBD en el estado de ánimo .....	99
Efecto sobre las alteraciones neuroconductuales .....	99
Efecto sobre las alteraciones moleculares.....	101
Efecto sobre las alteraciones histológicas.....	103
Efecto sobre la alteración de receptores .....	105
Efecto del VCE-004.8 en el daño isquémico clásico .....	107
Efecto sobre el daño a nivel macroscópico.....	107
Efecto sobre el daño funcional.....	107
Efecto sobre la muerte celular .....	109
Efecto del VCE-004.8 en el estado de ánimo .....	110
Efecto sobre las alteraciones neuroconductuales .....	110
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>113</b>
Reproducción del modelo de MCAO.....	115
Alteraciones del estado de ánimo.....	117
El sistema dopaminérgico tras el PAIS .....	118
Efecto de un inhibidor de la recaptación de DA en el estado de ánimo tras PAIS.....	121
Efecto neuroprotector del CBD en el daño isquémico.....	123
Efecto del CBD sobre el estado de ánimo tras PAIS.....	123
Efectos sobre el cuadro depresivo .....	123
Efectos sobre el cuadro hiperactivo.....	125
Efecto del VCE-004.8 en el daño isquémico.....	127
Efecto del VCE-004.8 en el estado de ánimo .....	129
Visión integrada de los diferentes tratamientos.....	130

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>

# **ABREVIATURAS**



<b>2-AG</b>	2-Araquidonilglicerol
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	Receptor de serotonina 1A
<b>AEA</b>	Anandamida
<b>AIS</b>	Accidente cerebrovascular arterial isquémico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovina
<b>CB<sub>1</sub></b>	Receptor cannabinoide tipo 1
<b>CB<sub>2</sub></b>	Receptor cannabinoide tipo 2
<b>CBD</b>	Cannabidiol
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CRT</b>	Test del cilindro
<b>D<sub>1</sub></b>	Receptor de dopamina D1
<b>D<sub>2</sub></b>	Receptor de dopamina D2
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPX</b>	Resina acrílica con base de xileno
<b>dUTP</b>	Desoxiuridina trifosfato
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia mejorada
<b>EHI</b>	Encefalopatía hipóxico-isquémica
<b>FCA-i</b>	Arteriopatía cerebral focal de tipo inflamatorio
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<b>FST</b>	Test de natación forzada
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GBR 12909</b>	Dihidrocloruro de 1-[2-[bis-(4-fluorofenil)metoxi]etil]-4-(3-fenilpropil)piperazina
<b>GPR55</b>	Receptor acoplado a proteína G 55
<b>HIF</b>	Factor inducible por hipoxia
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta presión/Cromatografía líquida de alta resolución
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>iNOS</b>	Oxido nítrico sintasa inducible
<b>MCAO</b>	Oclusión de la arteria cerebral media
<b>MRI</b>	Imagen de Resonancia Magnética
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NAIS</b>	Accidente cerebrovascular arterial isquémico neonatal
<b>NMDA</b>	Receptores N-metil-D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOR</b>	Test de reconocimiento de objeto nuevo
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>OFT</b>	Test de campo abierto

<b>PAIS</b>	Accidente cerebrovascular arterial isquémico perinatal
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>pN</b>	Día postnatal N
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor activado por proliferador del peroxisoma $\gamma$
<b>PSD</b>	Depresión post infarto
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SEC</b>	Sistema Endocannabinoide
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TBS</b>	Solución salina tamponada con TRIS
<b>TBS-T</b>	Solución salina tamponada con TRIS y Tween-20 al 0,1%
<b>TDAH</b>	Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad
<b>TdT</b>	Desoxinucleotidil transferasa terminal
<b>TH</b>	Tirosina-hidroxilasa
<b>THC</b>	$\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>t-PA</b>	Activador de plasminógeno tisular
<b>T-PER</b>	Reactivo para la extracción de proteínas tisulares
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio vaniloide subtipo 1
<b>TST</b>	Test de suspensión caudal
<b>TUNEL</b>	Técnica de marcado de final de corte por desoxiuridina trifosfato y desoxinucleotidil transferasa terminal
<b>VCE-004.8</b>	(1'R,6'R)-3-(bencilamino)-6-hidroxi-3'-metil-4-pentil-6'-(prop-1-en-2-il)-[1,1'bi (ciclohexano)]-2',3,6-trieno-2,5-diona
<b>VTA</b>	Área Tegmental Ventral
<b>WB</b>	Western blot

# RESUMEN





El Accidente cerebrovascular arterial isquémico (AIS) es una patología típicamente considerada propia de la edad adulta. Sin embargo, la incidencia de esta patología alrededor del momento del parto es muy similar a la encontrada en la vejez, siendo el periodo perinatal la segunda edad con mayor riesgo de sufrir este infarto. A este accidente cerebrovascular isquémico perinatal (PAIS) se han asociado un elevado número de secuelas como la epilepsia, alteraciones motoras como la hemiparesia, problemas del lenguaje o trastornos cognitivos y del comportamiento. Estos trastornos del comportamiento han sido vagamente descritos en los estudios longitudinales presentes en la bibliografía, pero podrían tener una importancia decisiva a la hora de determinar una correcta terapia para los pacientes y mejorar en gran medida su calidad de vida y, tal vez, otras secuelas que podrían estar derivadas de estas alteraciones. Es determinante tener en cuenta que estos pacientes podrían tener que hacer frente a trastornos tipo depresivos o hiperactivos en unas épocas decisivas como son la infancia o la adolescencia, condicionando el desarrollo de sus vidas y las de sus familias, sin embargo, no se ha prestado suficiente atención al estudio de los trastornos del estado de ánimo.

La fisiopatología que subyace a este PAIS se inicia por un bloqueo en el suministro de sangre a un área determinada del cerebro, con la subsecuente falta de aporte de glucosa y oxígeno a este tejido. Los procesos que suceden a este bloqueo son complejos y se relacionan entre sí de una manera altamente intrincada. De estos, cabe destacar tres factores claves implicados en la fisiopatología: la inflamación, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo. Cabe destacar que hay determinadas neuronas que pueden ser especialmente vulnerables a alguno de estos procesos de daño, como por ejemplo es el caso de las neuronas dopaminérgicas, que cuentan con unos niveles basales altos de especies reactivas de oxígeno (ROS), haciéndolas más sensibles al estrés oxidativo. Precisamente estas neuronas dopaminérgicas y el principal neurotransmisor que generan y les da nombre, la dopamina (DA), están implicadas en diversos trastornos del estado de ánimo como la depresión o la hiperactividad.

Los cannabinoides se presentan como una estrategia terapéutica muy prometedora, tanto para el PAIS como para otros tipos de daño cerebral neonatal, como son la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI), causante de un daño más global, o la hemorragia intraventricular que suele afectar a los prematuros, especialmente a los de extremado bajo peso. Particularmente, el cannabidiol (CBD), el cual no tiene propiedades psicoestimulantes que podrían ser perjudiciales en el cerebro de un recién nacido, ha mostrado una gran eficacia en estos modelos de daño, hasta el punto de lograr que sea utilizado en un ensayo clínico de EHI. Precisamente, es la actividad del CBD sobre los tres procesos clave antes citados (inflamación, excitotoxicidad y estrés oxidativo) lo que le confiere esta capacidad neuroprotectora sobre este tipo de daño. Además, este cannabinoide ha mostrado eficacia terapéutica sobre diferentes trastornos del estado de ánimo, mostrando por ejemplo propiedades antidepresivas. Todo ello hace de este fármaco un candidato muy prometedor para tratar, tanto las secuelas clásicamente caracterizadas del PAIS, como las posibles alteraciones del estado de ánimo que también puedan sufrir estos pacientes. Otros cannabinoides, como el VCE-004.8, el cual es un derivado del CBD, con una aumentada actividad sobre los receptores CB<sub>2</sub> y PPAR-γ, presentan características que podrían ser especialmente beneficiosas para el tratamiento de dichas secuelas.

Teniendo todo esto en cuenta, parece importante definir los trastornos del estado de ánimo que puedan aparecer a consecuencia del PAIS, así como los mecanismos subyacentes a estos a fin de definir una correcta estrategia terapéutica para tratar a los pacientes. Para ello los modelos animales se presentan como una herramienta muy útil, dado el símil en cuanto al desarrollo de la patología en el humano, la facilidad para obtener las muestras necesarias y la mayor rapidez para que tenga lugar el desarrollo de las secuelas en los roedores respecto al tiempo requerido en el caso de los humanos.

Por todo ello, la hipótesis planteada en este trabajo es que en un modelo de PAIS en ratas neonatas, a las cuales se les ocluya la arteria cerebral media, tendrán lugar alteraciones del estado de ánimo, tanto a medio como a largo plazo, que será posible revertir mediante la administración de cannabinoides como el CBD o el VCE-004.8.

Para demostrar la validez de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Reproducir correctamente las secuelas típicas asociadas a un modelo animal de PAIS.
- Determinar en este modelo animal de PAIS la aparición de trastornos del estado de ánimo como consecuencia del daño, tanto a medio como a largo plazo.
- Esclarecer los mecanismos subyacentes a estos trastornos del estado de ánimo.
- Analizar la eficacia terapéutica del CBD sobre estas alteraciones del estado de ánimo y los mecanismos subyacentes a estas.
- Analizar la eficacia terapéutica del VCE-004.8 sobre las alteraciones del estado de ánimo.

En primer lugar, los resultados mostraron la correcta reproducción del modelo, observándose mediante imágenes de resonancia magnética un volumen de daño similar al documentado previamente, tanto en modelos animales como a nivel clínico, y mantenido proporcionalmente a lo largo del tiempo. Se observaron también daños a nivel motor en las pruebas funcionales que evaluaron los reflejos a medio plazo y la hemiparesia a largo plazo; de nuevo estas alteraciones fueron equiparables a lo encontrado en la clínica y en la bibliografía. Por último, los resultados relativos a la muerte celular, observada mediante la técnica de TUNEL también fueron consistentes con estudios previos.

Se encontraron alteraciones del estado de ánimo asociadas al daño isquémico, tanto una semana como un mes después de producirse este. Una semana después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) la sintomatología encontrada en las pruebas neuroconductuales, concretamente en el test de suspensión caudal (TST), fue compatible con un trastorno tipo depresivo. Sin embargo, un mes después del daño, las pruebas neuroconductuales realizadas en este sentido descubrieron un comportamiento tipo hiperactivo, mostrándose especialmente con un comportamiento de trepar aumentado en el test de natación forzada (FST) y una locomoción y un número de entradas al centro excesivas el test de campo abierto (OFT).

A medio plazo (p14), en los animales isquémicos únicamente se encontraron alteraciones en la concentración cerebral de noradrenalina (NA), aumentada a consecuencia del propio daño isquémico, y de DA, que se encontró disminuida. A largo plazo (p37), solo se encontraron alteraciones en los niveles de DA, que en esta ocasión se mostró aumentada en

asociación al MCAO. No se encontraron alteraciones en los niveles de serotonina (5-HT) en ninguno de los tiempos analizados. Al evaluar el estado de las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (VTA) una semana después del daño, se encontró una pérdida de la densidad de neuronas, sin alterarse el tamaño del núcleo. Cuando la evaluación se realizó un mes después del daño, la densidad de neuronas fue similar en el grupo lesionado y el control, hallándose una reducción del tamaño del VTA en el caso del primero. Los niveles de expresión del transportador de DA (DAT) se encontraron disminuidos a ambas edades en asociación al PAIS. No así los de receptores D<sub>2</sub>.

Al administrar un inhibidor de la recaptación de DA (GBR 12909) durante los tres días anteriores y posteriores a la evaluación del TST, se comprobó que la administración de este compuesto evitó la aparición del comportamiento tipo depresivo encontrado en las pruebas neuroconductuales una semana después del daño, confirmando la relación entre la disminución de la concentración cerebral de DA y la sintomatología tipo depresiva tras MCAO. Sin embargo, ese tratamiento no tuvo efectos sobre el desarrollo a largo plazo del comportamiento tipo hiperactivo, sugiriendo que la normalización temporal de la concentración de DA no evita el desarrollo de una descompensación del sistema dopaminérgico a largo plazo tras el PAIS.

El CBD, administrado a una dosis que logró revertir el daño típico de la isquemia, no mostró eficacia a la hora de evitar la aparición de la sintomatología depresiva hallada una semana después del daño, las alteraciones en los niveles de DA, la reducción del número de neuronas dopaminérgicas del VTA ni la disminución de la expresión de DAT. Sin embargo, el tratamiento con CBD sí resultó efectivo en la prevención de la aparición del comportamiento de tipo trepar en el FST y de la hiperactividad observada en el OFT, a largo plazo, efecto relacionado con la normalización en los niveles de DA, del tamaño, y por tanto el número total de neuronas dopaminérgicas, del VTA y de la expresión del receptor DAT.

Por su parte, el tratamiento con VCE-004.8 logró revertir los daños típicamente descritos en este modelo animal de PAIS (lesión en MRI, reflejos motores y muerte celular una semana después del daño y hemiparesia un mes después de este) a excepción del reflejo de agarre. No obstante, al igual que el CBD, este cannabinoide no fue capaz de paliar la sintomatología depresiva descrita una semana después de la lesión. Los datos de eficacia para evitar el desarrollo de la hiperactividad a largo plazo fueron contradictorios, ya que esa eficacia se demostró en el OFT, pero no en FST.

En conclusión, se comprobó la existencia de alteraciones del estado de ánimo, diferentes a medio y a largo plazo, asociadas a la inducción de un infarto cerebral en ratas recién nacidas. Estas alteraciones se asociaron a trastornos en el sistema dopaminérgico, de modo que el comportamiento depresivo se vinculó a un descenso de la concentración de DA asociado a una reducción de la población neuronal dopaminérgica, mientras que el comportamiento hiperactivo se asoció a un aumento de la concentración de DA correspondiente a una disminución de su recaptación. La administración de CBD a dosis única tras el infarto no fue capaz de mostrar eficacia evitando el comportamiento tipo depresivo a corto plazo, pero sí evitó el desarrollo del cuadro hiperactivo observado a largo plazo. Este efecto se asoció a la normalización de la densidad de celularidad dopaminérgica y de la expresión del DAT. La

administración del VCE-004.8 reprodujo a grandes rasgos los efectos del CBD, sin mostrar beneficios adicionales de la potenciación del efecto antiinflamatorio de este cannabinoide.

# ABSTRACT





Arterial ischemic stroke (AIS) accident is a pathology typically considered typical of adulthood. However, the incidence of this pathology around the time of delivery is very similar to that found in old age, with the perinatal period being the second age with the highest risk of suffering this heart attack. A high number of sequelae such as epilepsy, motor disorders such as hemiparesis, language problems or cognitive and behavioral disorders have been associated with this perinatal arterial ischemic stroke (PAIS). These behavioral disorders have been vaguely described in the longitudinal studies present in the literature, but could be of decisive importance in determining the correct therapy for patients and greatly improve their quality of life and, perhaps, other sequelae that could be derived from these alterations. It is crucial to bear in mind that these patients could have to deal with depressive or hyperactive type disorders in decisive times such as childhood or adolescence, conditioning the development of their lives and those of their families, however, it has not been provided sufficient attention to the study of mood disorders.

The pathophysiology underlying this PAIS is initiated by a blockage in the blood supply to a certain area of the brain, with the subsequent lack of glucose and oxygen supply to this tissue. The processes that follow this blockage are complex and interrelated in a highly intricate way. Of these, three key factors involved in the pathophysiology should be highlighted: inflammation, excitotoxicity and oxidative stress. It should be noted that there are certain neurons that may be especially vulnerable to some of these damage processes, such as the case of dopaminergic neurons, which have high basal levels of reactive oxygen species, making them more sensitive to oxidative stress. Precisely these dopaminergic neurons and the main neurotransmitter they generate and give them their name, dopamine, are involved in various mood disorders such as depression or hyperactivity.

Cannabinoids are presented as a very promising therapeutic strategy, both for PAIS and for other types of neonatal brain damage, such as hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), which causes more global damage, or intraventricular hemorrhage that usually affects premature infants, especially extremely low birth weight infants. In particular, cannabidiol (CBD), which does not have psychostimulant properties that could be harmful to the brain of a newborn, has shown great efficacy in this damage, to the point of being used in a clinical trial of HIE. It is precisely the activity of CBD on the three key processes mentioned above (inflammation, excitotoxicity and oxidative stress) that gives it this neuroprotective capacity against this type of damage. In addition, this cannabinoid has shown therapeutic efficacy on different mood disorders, showing, for example, antidepressant properties. All this makes this drug a very promising candidate for treating both the classically characterized sequelae of PAIS, as well as the possible mood changes that these patients may also suffer from. Other cannabinoids, such as VCE-004.8, which is a derivative of CBD, with increased activity on CB2 and PPAR- $\gamma$  receptors, presenting characteristics that could be especially beneficial for the treatment of said sequelae.

Bearing all this in mind, it seems important to define the mood disorders that can appear as a result of PAIS, as well as the basis for them, in order to define a correct therapeutic strategy to treat patients. For this, animal models are presented as a very useful tool, given the similarity in terms of the development of the pathology in humans, the ease of obtaining the

necessary samples and the greater speed for the development of sequelae in rodents compared to the time required in the case of humans.

The hypothesis proposed in this work is that in a PAIS model in neonatal rats, in which the middle cerebral artery is occluded, changes in mood will take place, both in the medium and long term, which will be possible to reverse through the administration of cannabinoids such as CBD or VCE-004.8.

To demonstrate the validity of this hypothesis, the following objectives were set:

- To Correctly reproduce the typical sequelae associated with an animal model of PAIS.
- To determine in this animal model of PAIS the appearance of mood disorders as a consequence of the damage, both in the medium and long term.
- To Clarify the mechanisms underlying these mood disorders.
- To Analyze the therapeutic efficacy of CBD on these mood disorders and their underlying mechanisms.
- To Analyze the therapeutic efficacy of VCE-004.8 on mood disorders.

Firstly, the results showed the correct reproduction of the model, with magnetic resonance imaging showing a volume of damage similar to that previously documented, both in animal models and at the clinical level, and maintained proportionally over time. Motor damage was also observed in the functional tests that evaluated medium term reflexes and long-term hemiparesis; again, these alterations were comparable to what was found in the clinic and in the literature. Finally, the results regarding cell death, observed using the TUNEL technique, were also consistent with previous studies.

Mood disturbances associated with ischemic damage were found, both one week and one month after it occurred. One week after the middle cerebral artery occlusion (MCAO), the symptoms found in the neurobehavioral tests, specifically in the tail suspension test (TST), were compatible with a depressive-like disorder. However, one month after the injury, neurobehavioral tests performed in this regard revealed a hyperactive-type behavior, especially showing increased climbing behavior in the forced swimming test (FST) and excessive locomotion and number of center entries in the open field test (OFT).

In the medium term (p14), in the ischemic animals only alterations were found in the cerebral concentration of norepinephrine, increased as a result of the ischemic damage itself, and of dopamine, which was found to be decreased. In the long term (p37), alterations were only found in dopamine levels, which this time was shown to be increased in association with MCAO. No alterations were found in serotonin levels at any of the analyzed times. When evaluating the state of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) one week after the damage, a loss of neuron density was found, without altering the size of the nucleus. When the evaluation was carried out one month after the injury, the density of neurons was similar in the injured group and the control group, finding a reduction in the size of the VTA in the case of the former. The expression levels of the dopamine transporter (DAT) were found to be decreased at both ages in association with PAIS. Not so the D<sub>2</sub> receptors.

When administering a dopamine reuptake inhibitor (GBR 12909) during the three days before and after the TST evaluation, it was found that the administration of this compound prevented the appearance of the depressive-like behavior found in neurobehavioral tests one week after the damage, confirming the relationship between the decrease in brain concentration of dopamine and depressive-like symptoms after MCAO. However, this treatment had no effect on the long-term development of hyperactive-like behavior, suggesting that the temporary normalization of dopamine concentration does not prevent the development of long-term dopaminergic system decompensation after PAIS.

CBD, administered a dose that reversed the typical damage of ischemia, did not show efficacy in preventing the appearance of depressive symptoms found a week after the damage, alterations in dopamine levels, reduction in the number of dopaminergic neurons in the VTA nor the decrease in the expression of DAT. However, treatment with CBD was effective in preventing the appearance of climbing-type behavior in the FST and the hyperactivity observed in the OFT in the long term, an effect related to the normalization of dopamine levels, of the size, and therefore the total number of dopaminergic neurons in the VTA and the expression of the DAT receptor.

For its part, treatment with VCE-004.8 achieved the reversal of the damage typically described in this animal model of PAIS (MRI lesion, motor reflexes and cell death one week after the damage and hemiparesis one month after it) with the exception of the reflex of grip. However, like CBD, this cannabinoid was not able to alleviate the depressive symptoms described one week after the injury. Efficacy data in preventing the development of long-term hyperactivity were conflicting, as that efficacy was demonstrated in the OFT, but not in the FST.

In conclusion, the existence of mood changes, different in the medium and long term, associated with the induction of cerebral infarction in newborn rats was confirmed. These alterations were associated with disorders in the dopaminergic system, so that depressive behavior was linked to a decrease in dopamine concentration associated with a reduction in the dopaminergic neuronal population, while hyperactive behavior was associated with an increase in dopamine concentration corresponding to a decrease in its reuptake. The administration of CBD in a single dose after the infarction was not capable of showing efficacy in preventing depressive behavior in the short term, but it did prevent the development of the hyperactive condition observed in the long term. This effect was associated with normalization of dopaminergic cell density and dopamine transporter expression. The administration of VCE-004.8 reproduces great characteristics of the effects of CBD, without showing additional benefits of enhancing the anti-inflammatory effect of this cannabinoid.



# INTRODUCCIÓN





# Accidente Cerebrovascular Isquémico Perinatal

## Definición

El accidente cerebrovascular arterial isquémico (AIS, por sus siglas en inglés), o también llamado stroke, consiste en la reducción o bloqueo completo focal del flujo sanguíneo cerebral, y su consecuencia final es el infarto cerebral (Fluss et al., 2016). Cuando este se produce en el periodo perinatal, comprendido entre la semana 20 de vida fetal y el día 28 de desarrollo postnatal (ya que, habitualmente, el momento exacto del infarto no está claro), es denominado accidente cerebrovascular isquémico perinatal (PAIS). El PAIS debe ser confirmado mediante estudios de neuroimagen o neuropatológicos (Bernson-Leung & Rivkin, 2016; Fluss et al., 2016; Grunt et al., 2015; Munoz et al., 2018; Titomanlio et al., 2015).

Estos días previos y posteriores al nacimiento suponen un periodo de particular riesgo de infarto, tanto para el bebé como para la madre, que podrían deberse a la activación de mecanismos de coagulación en este momento (Nelson & Lynch, 2004).

La principal diferencia entre el PAIS y la EHI reside en término "focal", que se asocia al stroke (Titomanlio et al., 2015).

## Tipos

Cuando el infarto cerebral sucede en el periodo perinatal, al igual que cuando tiene lugar en la infancia o la edad adulta, se puede dividir en dos tipos principales: el stroke hemorrágico y el isquémico. El primero, generalmente, es menos frecuente; sin embargo, la mortalidad asociada a este es mucho más elevada. El segundo es el tipo presente en aproximadamente el 85% de los casos totales de accidente cerebrovascular (Amarenco et al., 2009; *El Ictus*, s. f.; Kuriakose & Xiao, 2020; Lehman & Rivkin, 2014; Woodruff et al., 2011).

El **infarto hemorrágico** se caracteriza porque se produce la rotura de un vaso sanguíneo y, por tanto, conlleva la liberación de sangre al tejido circundante (*El Ictus*, s. f.; Kuriakose & Xiao, 2020; Woodruff et al., 2011). Este stroke hemorrágico puede subdividirse, según la localización donde se produce, en:

**Intracerebral:** Se produce por la rotura de un vaso en el parénquima cerebral, dejando salir su contenido, el cual se expande por el tejido circundante, lo que adicionalmente produce una sobrepresión que daña este tejido cerebral. Por tanto, la gravedad de este tipo de infarto está determinada, tanto por el daño focal *per se*, como por este aumento de presión intracraneal. Dentro del stroke hemorrágico es el subtipo más frecuente (Amarenco et al., 2009; *El Ictus*, s. f.).

**Subaracnoideo:** En este caso, la hemorragia se produce en las meninges, ubicadas entre la superficie del tejido cerebral y la parte más interna del cráneo, concretamente por debajo de la aracnoides, en el espacio subaracnoideo. El desencadenante principal de este subtipo es la rotura de un aneurisma arterial (*El Ictus*, s. f.; Kuriakose & Xiao, 2020).

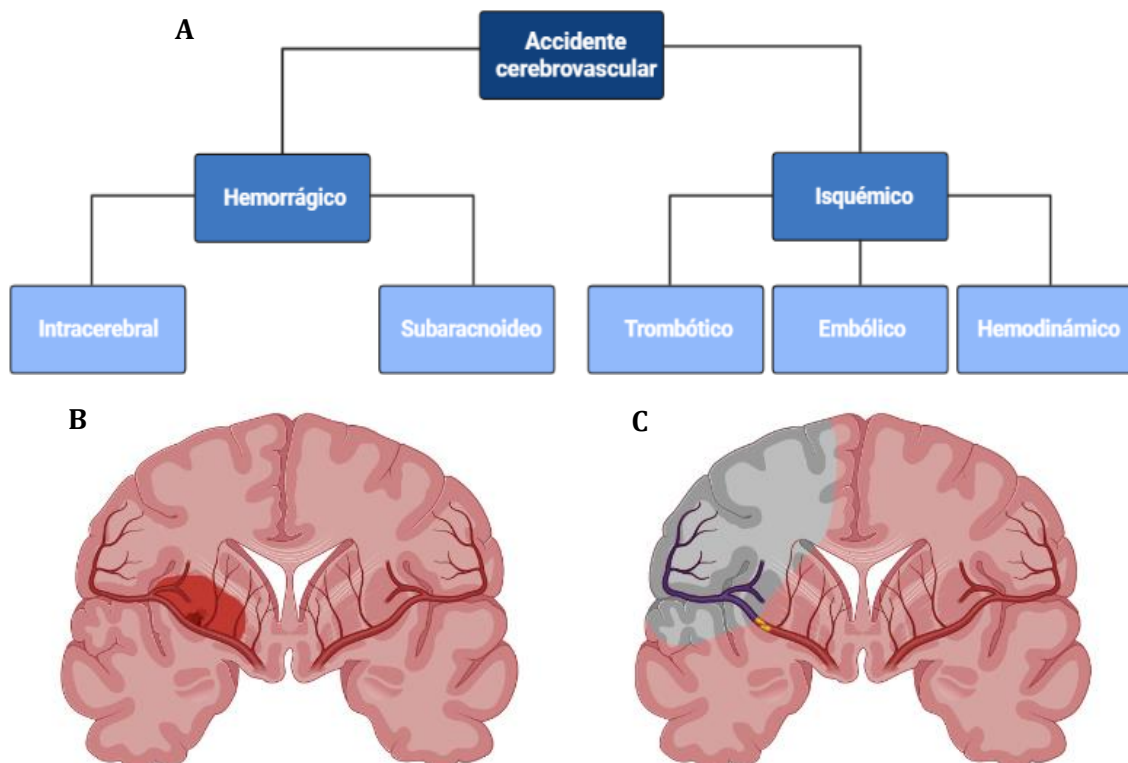
Por su parte, el **infarto isquémico** está producido generalmente por la obstrucción de una arteria, sin que se produzca su rotura de la misma (Kuriakose & Xiao, 2020). Este tipo de

infarto puede clasificarse atendiendo a su etiología, dando lugar a los siguientes subtipos (*El Ictus*, s. f.; Kuriakose & Xiao, 2020; Woodruff et al., 2011):

**Trombótico, aterotrombótico o trombosis cerebral:** La causa de este es un coágulo de sangre (trombo), el cual se forma en la pared de una arteria de tal manera que impide el paso de la sangre a través de esta, afectando a la parte del cerebro que irriga (*El Ictus*, s. f.; Kuriakose & Xiao, 2020).

**Embólico o embolia cerebral:** Este subtipo también se produce por un coágulo, al igual que en el caso anterior, sin embargo, la diferencia reside en que este coágulo no se forma en el propio lugar de la oclusión, sino lejos de este, generalmente en el corazón. Este coágulo que se desplaza hasta bloquearse al reducirse la luz de una arteria, bloqueándola, se denomina émbolo. Las embolias son responsables de alrededor del 75% de las obstrucciones de los vasos cerebrales, representando la causa más frecuente de accidente cerebrovascular (*El Ictus*, s. f.; Kuriakose & Xiao, 2020; Woodruff et al., 2011).

**Hemodinámico:** En este caso, la reducción en el aporte sanguíneo está producida por una disminución en la presión arterial. Este descenso puede estar debido, por ejemplo, a hipotensión arterial (principalmente si esta es grave y persistente), a una arritmia o a una parada cardíaca. Este subtipo es el menos frecuente dentro de los clasificados como stroke isquémico (*El Ictus*, s. f.).



**Figura 1. 1. A.** Esquema de los diferentes tipos de infarto según su etiología. **B.** Representación gráfica de un stroke hemorrágico. **C.** Representación gráfica de un stroke isquémico.

Concretamente, cuando este infarto se produce en el bebé alrededor del momento del parto, este accidente cerebrovascular se puede dividir en función del momento en el que es diagnosticado, dando lugar a los siguientes tipos (Munoz et al., 2018):

Infarto isquémico fetal: El diagnóstico, en este caso, se produce antes de que tenga lugar el nacimiento, mediante el uso de técnicas de imagen fetal. También es el caso de los mortinatos, diagnosticado a través de un examen neuropatológico (Munoz et al., 2018; Whitaker & Cipolla, 2020).

Infarto isquémico arterial neonatal (NAIS): Es aquel diagnosticado posterior al nacimiento y hasta el día 28 postnatal, incluyendo los casos de recién nacidos prematuros (Munoz et al., 2018; Whitaker & Cipolla, 2020).

Presunto infarto perinatal: Diagnosticado después del día 28 postnatal, pero ocasionado presumiblemente (sin tener la certeza) con anterioridad, entre la semana 20 gestacional y este día 28 postnatal (Munoz et al., 2018; Whitaker & Cipolla, 2020).

De manera general, el stroke de tipo isquémico y neonatal es el accidente cerebrovascular agudo más frecuente, ya que se estima que representa entre un 80% y un 90% de los casos descritos en la literatura (Dunbar & Kirton, 2019).

## **Incidencia**

Típicamente, el stroke es considerado una patología propia de la edad adulta. Sin embargo, como ya se ha mencionado, el periodo perinatal, y principalmente las primeras horas o días posteriores al parto, suponen un tiempo de particular susceptibilidad y riesgo. La incidencia del accidente cerebrovascular perinatal es similar a la de los ancianos, considerándose el período perinatal el segundo grupo de mayor riesgo de sufrir un infarto cerebral. Es, además, tan común como el accidente cerebrovascular arterial isquémico de gran vaso en adultos y 17 veces mayor que en la infancia (Bernson-Leung & Rivkin, 2016; Fernández-López et al., 2014; Lehman & Rivkin, 2014; Munoz et al., 2018; Raju, 2008; Rayasam et al., 2020).

Las estimaciones sobre la incidencia encontradas en la bibliografía son muy variables. Por lo general, en las bases de datos de los hospitales se encontraron tasas más altas que en la literatura. Probablemente esto pueda deberse a que las bases de datos hospitalarias incluyen una población más grande con una mayor precisión a la hora de la clasificación por grupos de edad y cuentan con datos más contemporáneos que los de la literatura, todo ello puede ser asociado con una mejor identificación del AIS pediátrico (Oleske et al., 2021).

Teniendo en cuenta estas divergencias, los datos sobre la incidencia del stroke perinatal parecen encontrarse entre 1 caso de cada 1.600 a 5.000 bebés nacidos vivos. Siendo el NAIS el que cuenta con una mayor incidencia, representando aproximadamente entre el 80% y el 90% de los casos descritos (Clive et al., 2020; Dunbar & Kirton, 2019; Fernández-López et al., 2014; Ferriero et al., 2019; Martinez-Biarge et al., 2019; Munoz et al., 2018; Oleske et al., 2021; Vexler & Yenari, 2009; Wagenaar et al., 2018).

A pesar de estas estimaciones, hay que tener presente que, probablemente, se trate de subestimaciones, dada la dificultad para obtener imágenes cerebrales neonatales, especialmente en determinados entornos donde los recursos son limitados (Fernández-López et al., 2014; Wagenaar et al., 2018).

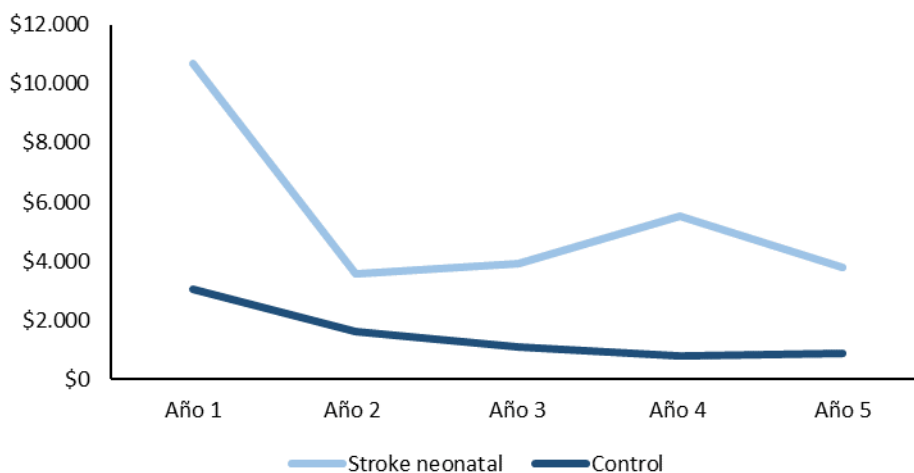
## Gasto para el sistema sanitario

Es preciso tener en cuenta, que de forma adicional a los perjuicios ocasionados sobre la salud de los pacientes, el accidente cerebrovascular perinatal conlleva gastos sustanciales para el sistema sanitario (Berrigan et al., 2021).

Según un estudio realizado en 2010, el 88% del coste medio de atención hospitalaria en casos de accidente cerebrovascular neonatal fue debido al propio stroke, suponiendo un gasto medio de 34.821 dólares en cada uno de estos casos. El 12% restante fue asociado a gastos propios de un parto sin complicaciones (Gardner et al., 2010).

Sin embargo, evaluar gastos de una forma tan puntual, o incluso únicamente durante el primer año posterior al accidente cerebrovascular, podría ser una medida útil en el caso de los adultos, pero la distribución de estos costes en el tiempo difiere considerablemente en el caso de los neonatos, ya que en lo respectivo a estos pacientes hay gastos que aparecen a posteriori, por ejemplo en el momento de la escolarización (Ellis et al., 2014). Pese a que, en cuanto a los gastos crónicos, la mayor diferencia entre los neonatos con este daño y los sanos se observa durante el primer año, esta medida no ofrece una visión real y clara de todos los costes económicos que realmente subyacen a esta patología (Ellis et al., 2014; Gardner et al., 2010). Es por esto por lo que es preciso tener en cuenta estimaciones a un plazo mayor. En 2010 se calculó un coste total máximo a cinco años de 792.648 dólares asociado al stroke neonatal. A pesar de que tras el primer año las diferencias se hicieron menos notables, los costes crónicos asociados al stroke neonatal no lograron alcanzar los niveles de los neonatos controles a lo largo de cinco años (Gardner et al., 2010).

### COSTES CRÓNICOS MEDIOS



**Figura I. 2.** Representación de los costes crónicos medios asociados al stroke neonatal, comparados con neonatos sanos, a lo largo de 5 años. Adaptado de Gardner et al., 2010.

Es importante destacar que este estudio no tuvo en cuenta los costes indirectos asociados al stroke neonatal ni la pérdida en cuanto a la calidad de vida de estos pacientes y sus familias (Gardner et al., 2010, p. 5). Además de los gastos asociados al sistema sanitario, hay que tener en cuenta y evaluar, desde una perspectiva económica, otras consecuencias a largo plazo. Por ejemplo, hay que tomar en consideración los costes de institucionalización de estos pacientes que desarrollen discapacidades físicas o mentales, los gastos asociados a educación especial, así como los derivados del uso de los servicios de atención domiciliaria

y, asimismo, los gastos derivados de la pérdida de oportunidades laborales para los pacientes y sus familiares cuidadores (Ellis et al., 2014; Petrou & Davidson, 2000).

*Tabla I. 1. Costes medios diarios asociados a los cuidados neonatales según el nivel de cuidado. Adaptado de Petrou y Davidson, 2000.*

Nivel de cuidado	Número de estudios	Gasto medio por día	Intervalo de confianza del 95%	
			Inferior	Superior
Intensivo	15	629	530	728
Elevada dependencia	8	392	320	465
Cuidado especial	14	234	197	271

Otros costes no tomados en cuenta, que tal vez implican de forma más directa a las familias, son los derivados de adaptaciones realizadas en el hogar del niño debidos a su estado de salud, o aquellos que son consecuencia de los trastornos en actividades cotidianas. Los costes intangibles, como el dolor y el duelo, tampoco se han tenido en consideración en estos estudios y es trascendental que también sean reconocidos (Petrou & Davidson, 2000).

## Etiología

Cuando se produce un PAIS, muchas veces no se puede clarificar su inicio. No obstante, generalmente las causas se deben a oclusiones de las arterias cerebrales, ocasionadas por trombos o émbolos, o a trastornos de dichas arterias (arteriopatías) (Whitaker & Cipolla, 2020).

Los días circundantes al parto, el riesgo de infarto se incrementa tanto en el bebé como en la madre (Munoz et al., 2018). Esta elevada vulnerabilidad de ambos podría estar relacionada con los cambios en los sistemas de coagulación que se producen durante el parto, lo cual posiblemente representa una adaptación evolutiva para evitar hemorragias relativas a este momento (Felling et al., 2017; Munoz et al., 2018). Estos cambios podrían ocasionar un evento tromboembólico, cuya procedencia más probable sería la placenta (Vasudevan & Levene, 2013). Este émbolo generado en la placenta entraría en la circulación fetal o neonatal, una vez aquí se desviaría de la parte derecha del corazón a la izquierda a través del foramen oval permeable, desde donde pasaría a la circulación sistémica del bebé (Fluss et al., 2019; Martinez-Biarge et al., 2019). Una gran proporción de esta circulación sistémica se dirige al cerebro y es en este camino donde, finalmente, el émbolo bloqueará una arteria cuando la luz de este vaso se reduzca impidiendo su paso; la persistencia del Ductus Arterioso hace que la mayoría de estos émbolos, tras salir del ventrículo izquierdo, pasen a la arteria carótida izquierda, afectando por tanto con más frecuencia ese lado (Dunbar & Kirton, 2019; Fluss et al., 2019; Whitaker & Cipolla, 2020).

A favor de este origen placentario del émbolo, en la gran mayoría de casos en los que se dispone de la placenta se encuentran trastornos de la misma, como vasculopatía trombótica fetal o corioamnionitis con endovasculitis fetal (Bernson-Leung et al., 2018; Fluss et al., 2019). En general, los factores protrombóticos no son un hallazgo frecuente en los estudios del PAIS (Rutherford et al., 2012). Por otro lado, algunos estudios hacen hincapié en el papel de la infección, y consecuente inflamación, materno-fetal que podría ser responsable de las modificaciones inflamatorias y trombóticas de la placenta (Bernson-Leung et al., 2018; Fluss et al., 2019). Por su parte, la corioamnionitis podría provocar la liberación de

citoquinas, promoviendo así la arteriopatía fetal difusa y la formación de trombos (Fluss et al., 2019).

En el caso de las arteriopatías, estas son una causa muy común de PAIS especialmente en neonatos previamente sanos. Estas suelen clasificarse en cuatro tipos: disección arterial, arteriopatía cerebral focal de tipo inflamatorio (FCA-i), enfermedad de moyamoya y vasculitis multifocal difusa (Whitaker & Cipolla, 2020).

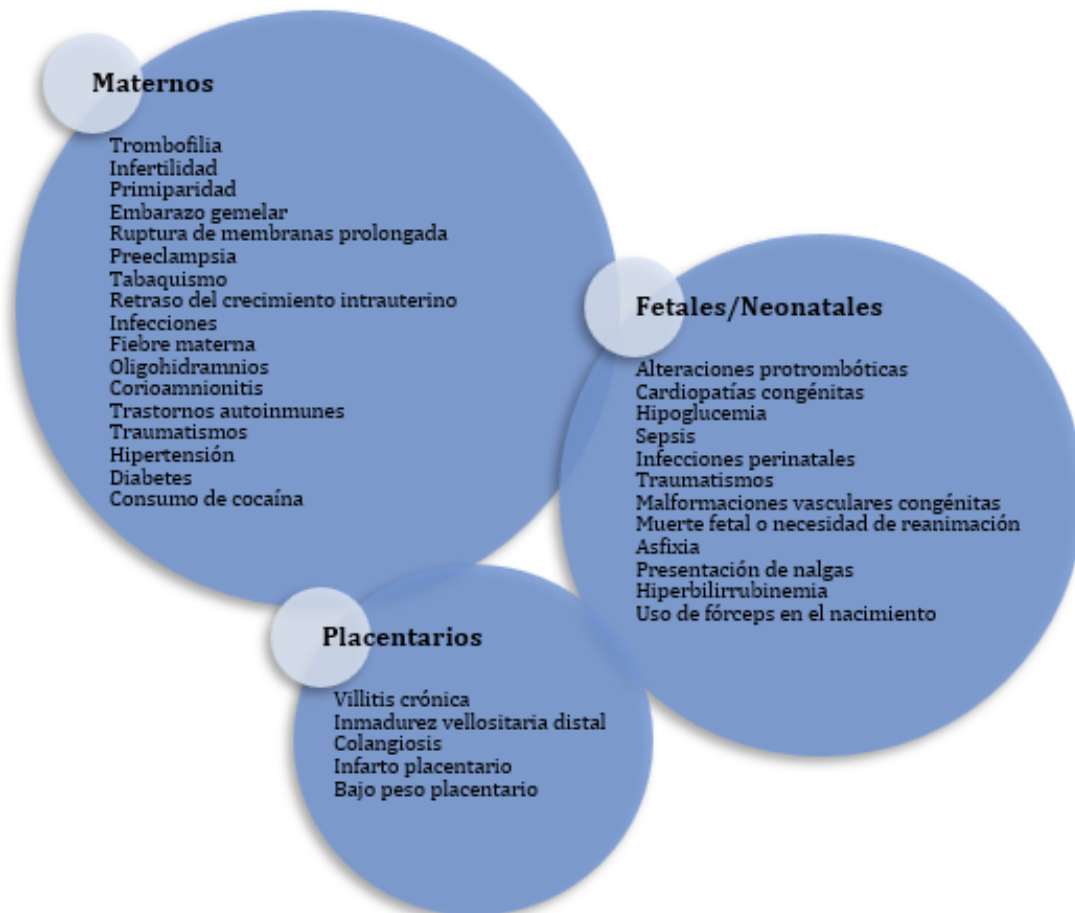
## **Factores de riesgo**

Basados en estos eventos, se han descrito numerosos factores de riesgo asociados al PAIS, a pesar de que en un gran número de casos estos factores no son evidentes (Dunbar & Kirton, 2019; Grunt et al., 2015). Estos pueden ser relativos a la madre (maternos), al bebé (fetales/neonatales) o a la placenta (placentarios) (Lehman & Rivkin, 2014).

Los factores de riesgo que hacen referencia al estado materno incluyen la trombofilia, la infertilidad, primiparidad o el embarazo de gemelos. Pero también otros como preeclampsia (relacionada con alteraciones protrombóticas maternas), rotura prolongada de membranas, tabaquismo, retraso del crecimiento intrauterino, infecciones, fiebre materna, oligoamnios o corioamnionitis (Lehman & Rivkin, 2014; C. Li et al., 2017; Martinez-Biarge et al., 2019; Munoz et al., 2018). Otros factores de riesgo maternos asociados con el PAIS podrían ser trastornos autoinmunes, traumatismos, hipertensión, diabetes o exposición del útero a cocaína (Martinez-Biarge et al., 2019; Rutherford et al., 2012). Muchos de estos factores tienen una elevada prevalencia en la población, no obstante, en algunos de los casos de PAIS no se encuentra ninguno de estos factores de riesgo (Martinez-Biarge et al., 2019).

Los factores de riesgo relativos al bebé son, de nuevo, alteraciones protrombóticas, las cardiopatías congénitas, la hipoglucemia o la sepsis (Lehman & Rivkin, 2014; Munoz et al., 2018). En el caso de las arteriopatías, pueden ser intrínsecas o adquiridas, asociándose a infecciones perinatales, traumatismos, malformaciones vasculares congénitas y varios síndromes genéticos (Whitaker & Cipolla, 2020). Se han descrito otros factores como muerte fetal, así como necesidad de reanimación perinatal, asfixia, presentación de nalgas o hiperbilirrubinemia (Lehman & Rivkin, 2014; Munoz et al., 2018). En el momento del nacimiento, la fuerza aplicada en la cabeza del neonato, así como el uso de fórceps puede aumentar el riesgo de accidente cerebrovascular (Dunbar & Kirton, 2018, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; C. Li et al., 2017). Por otro lado, el sexo del feto también puede influir, ya que los niveles elevados de testosterona aumentan las probabilidades de tromboembolismo cerebral (Grunt et al., 2015).

En muchos casos, no se dispone de la placenta para examinar posibles alteraciones, por ejemplo, debido a que en un gran número de casos el PAIS se detecta a posteriori. Por tanto no existen muchos estudios que aborden las alteraciones de esta en relación con el stroke perinatal (Lehman & Rivkin, 2014; Martinez-Biarge et al., 2019). Sin embargo, algunas anomalías de la placenta son villitis crónica, inmadurez vellositaria distal, colangiomas, infarto placentario o un peso placentario inferior al décimo percentil (Lehman & Rivkin, 2014; Martinez-Biarge et al., 2019).



*Figura 1. 3. Resumen de los principales factores de riesgo según si estos son relativos a la madre, al feto o a la placenta. Adaptado de Lehman y Rivkin, 2014.*

Es importante tener en cuenta que, la presencia de más de un factor de riesgo aumenta cinco veces la probabilidad de padecer PAIS (Fluss et al., 2019; Rutherford et al., 2012).

## Fisiopatología

La fisiopatología del infarto arterial isquémico es muy compleja e incluye diferentes procesos interconectados entre sí. Principalmente consiste en una serie de mecanismos de excitotoxicidad, estrés oxidativo, inflamatorios y microvasculares, cuya consecuencia final es la muerte del tejido afectado (Jordán et al., 2007; Mergenthaler et al., 2004; Woodruff et al., 2011).

En el accidente cerebrovascular se pueden diferenciar dos zonas: el **núcleo o core** de la lesión, que es aquella zona principalmente irrigada por los vasos en los que se produce el bloqueo y la **penumbra**, que rodea al núcleo de la lesión y conserva algo de circulación residual (Broughton et al., 2009; Jordán et al., 2007; Woodruff et al., 2011).

El bloqueo del flujo sanguíneo al núcleo isquémico conlleva el cese del suministro de energía y de los procesos metabólicos que dependen de ella. De esta forma, se altera la homeostasis iónica y se pierde la integridad celular produciéndose la muerte celular por **necrosis** en cuestión de minutos. En la zona de penumbra también se producen alteraciones del metabolismo y de la homeostasis iónica, sin embargo, en esta área sí se conserva la integridad estructural (Broughton et al., 2009; Jordán et al., 2007; Mergenthaler et al., 2004;

Woodruff et al., 2011). Dado que la depleción energética suele ser más leve en esta zona de penumbra, en última estancia puede conllevar a la apoptosis (que comienza horas después del inicio de la isquemia y dura varios días). Estos procesos apoptóticos determinan el alcance en cuanto a la propagación del daño isquémico (Mergenthaler et al., 2004; Villalonga, 2008; Woodruff et al., 2011). La recuperación y protección de la mayor superficie posible de este área de penumbra es la prioridad de las terapias en el stroke (Broughton et al., 2009; Woodruff et al., 2011).

Debido a la isquemia, el contenido de ATP de las células afectadas se reduce, esto ocasiona que se alteren las bombas intercambiadoras de iones y, por tanto, que la célula sufra despolarizaciones. Esto ocasiona la activación de los canales de calcio voltaje-dependientes y que se liberen al exterior celular **aminoácidos excitotóxicos**, representados principalmente por el glutamato, que no se puede recaptar por el fracaso de las bombas dependientes de ATP. El glutamato activa sus receptores (NMDA), lo cual conlleva un aumento añadido de la concentración de calcio intracelular y una alteración masiva de la homeostasis de iones. Esto genera un flujo pasivo de sodio y agua hacia el interior celular, produciendo un edema celular y tisular. En último término, esto da lugar a la necrosis que tiene lugar principalmente en el núcleo del infarto (Martinez-Biarge et al., 2019; Mergenthaler et al., 2004; Villalonga, 2008; Woodruff et al., 2011).

Cuando se produce la isquemia, ante la falta de oxígeno, la glucosa ha de ser degradada por vía anaeróbica. Esto genera ácido láctico, el cual se acumula reduciendo el pH y, por tanto, generando acidosis. Este mecanismo influye en el incremento de la concentración intracelular de calcio, ya que conlleva que el calcio se desplace de su unión a proteínas intracelulares (Villalonga, 2008).

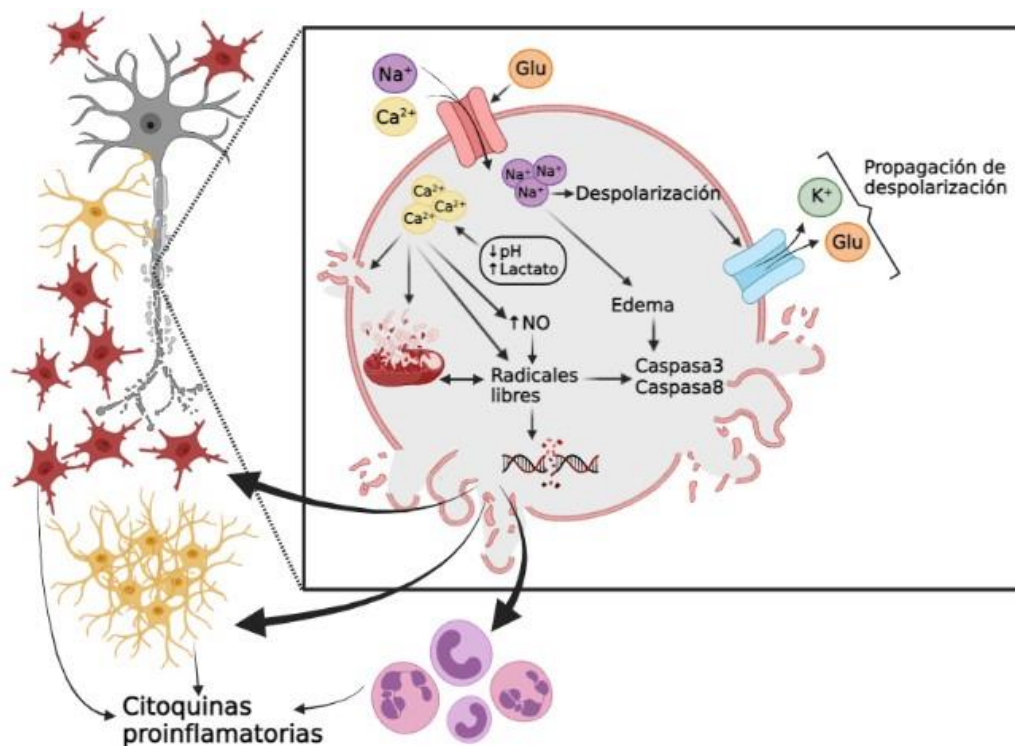
La concentración intracelular de calcio también se incrementa debido a la inhibición de la  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  ATPasa del retículo endoplásmico. Esta determina un flujo de calcio hacia el citosol procedente del retículo endoplásmico. El aumento global de la concentración intracelular de calcio activa enzimas catabólicas, las cuales, en último término, contribuyen a la muerte celular (Villalonga, 2008).

Por otro lado, algunas moléculas como el potasio o el glutamato pueden propagarse hacia las áreas de penumbra, conduciendo a una despolarización de más células, que pueden ser tanto neuronas como glía, y que en consecuencia, también liberan potasio y glutamato, propagando una onda de despolarización más allá del núcleo isquémico; esto conlleva el crecimiento de la lesión desde el núcleo a la penumbra (Mergenthaler et al., 2004; Villalonga, 2008).

Este concepto de excitotoxicidad está ligado al de **estrés oxidativo**, en el cual las concentraciones de radicales libres aumentan de forma perjudicial, como consecuencia del metabolismo oxidativo que se produce en esta situación patológica (Martinez-Biarge et al., 2019). Además, hay varios factores que hacen al cerebro particularmente vulnerable a este daño. Por un lado, se trata de un órgano especialmente rico en ácidos grasos insaturados, los cuales representan dianas para la peroxidación lipídica. Además, las neuronas consumen un elevado porcentaje del oxígeno total utilizado y, en último lugar, posee unas defensas antioxidantes escasas (Martinez-Biarge et al., 2019; Villalonga, 2008).

Como consecuencia de la isquemia y, especialmente, de la reperfusión, se generan radicales libres, que son moléculas con uno o más electrones desapareados y, por tanto, altamente

reactivas. Estos radicales libres son, por ejemplo, el superóxido, el peróxido de hidrógeno, el óxido nítrico (NO) o el radical hidroxilo (Mergenthaler et al., 2004; Villalonga, 2008; Woodruff et al., 2011). Durante la lesión isquémica, la producción de estos radicales libres sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes. El ya mencionado aumento de la concentración de calcio, así como el incremento de los mediadores de la inflamación, ocasionan la sobreproducción de óxido nítrico a través de la sobreactivación de las tres isoformas de la NO sintasa (NOS) (Mergenthaler et al., 2004; Villalonga, 2008). Otra fuente importante de radicales libres son las mitocondrias, ya que producen anión superóxido asociado al transporte de electrones, o el metabolismo del ácido araquidónico que se produce mediante las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa y produce superóxido (Woodruff et al., 2011). El producto de la reacción entre el NO y el superóxido es el radical peroxinitrito, siendo este uno de los principales responsables de la peroxidación lipídica, así como del daño a proteínas y DNA, lo cual conlleva la síntesis de factores proinflamatorios (Mergenthaler et al., 2004; Villalonga, 2008; Woodruff et al., 2011).

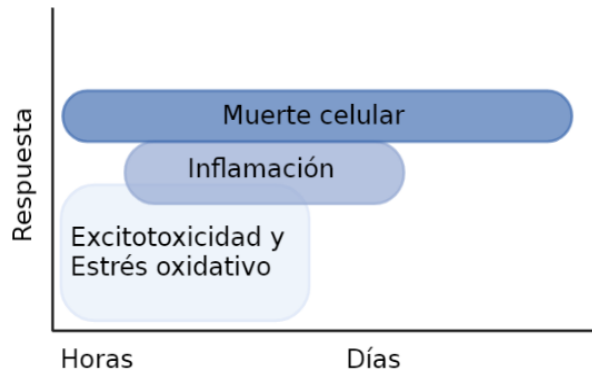


*Figura I. 4. Esquema de la fisiopatología asociada a la isquemia cerebral.*

Por otro lado, además de la propia hipoxia, la elevada concentración intracelular de calcio, así como de radicales libres, interfiere en la función de las mitocondrias. Esto puede desembocar en la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial en las membranas de las mismas. La creación de este poro impide la correcta producción de ATP, y conlleva la hinchazón de la mitocondria, produciéndose a su vez una gran liberación de moléculas proapoptóticas y de radicales libres, ya que cualquier daño que afecte a la maquinaria de producción de energía presente en las mitocondrias, tiene como consecuencia la acumulación de superóxido (Martinez-Biarge et al., 2019; Mergenthaler et al., 2004).

Otro proceso con un rol clave en esta fisiopatología es la **inflamación**, ya que esta puede tener un papel protector, pero también deletéreo (Borjini et al., 2019; Martínez-Biarge et al., 2019; Woodruff et al., 2011). Esta comienza a las pocas horas desde que se produce la isquemia y se caracteriza porque el endotelio vascular expresa moléculas de adhesión. Pero no son solo estas células endoteliales las que son capaces de secretar mediadores proinflamatorios como respuesta a este daño, también lo llevan a cabo la microglía, los astrocitos e incluso las neuronas (Borjini et al., 2019; Martínez-Biarge et al., 2019; Mergenthaler et al., 2004; Woodruff et al., 2011). Los leucocitos circulantes, por tanto, se adhieren al endotelio, transmigrando hacia el parénquima cerebral procedentes de la sangre y colaborando en la producción de citoquinas y quimioquinas. Particularmente las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) cuentan con un papel importante como mediadores de esta fase inflamatoria, ya que participan en la aparición del edema citotóxico, así como en procesos de estrés oxidativo, en la inducción de la expresión de iNOS y en el inicio de los mecanismos de apoptosis (Martínez-Orgado et al., 2007; Mergenthaler et al., 2004).

La microglía juega un papel decisivo en el proceso de inflamación, ya que estas células son las principales encargadas de la respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC). Como consecuencia del daño isquémico se produce una activación de las células microgliales, especialmente en el área de penumbra. Del mismo modo que otras células asociadas al sistema inmune como los leucocitos, esta microglía activada tiene la capacidad de producir una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias y metabolitos tóxicos (como



**Figura I. 5.** Distribución de los procesos fisiopatológicos a lo largo del tiempo. Adaptado de Martínez-Biarge et al.

es el caso de los radicales libres, por ejemplo, peroxinitrito y superóxido) (Mergenthaler et al., 2004; Patel et al., 2013). Sin embargo, esta microglía no solo está implicada en este tipo de respuesta inflamatoria, sino que su participación depende de su estado de activación. Así, la microglía activada en estado M1 estaría principalmente implicada en estos procesos de inflamación, mientras que en el caso de M2 moderaría la muerte celular por

apoptosis eliminando células dañadas (Patel et al., 2013).

Cabe destacar que, a pesar de que la reperusión del tejido tras producirse la isquemia es claramente deseable, en general el daño producido sobre el tejido suele ser consecuencia no solo de esta lesión isquémica transitoria, sino también del proceso de reperusión. Esta reperusión, cuando se produce, induce a su vez una respuesta inflamatoria y exagera el estrés oxidativo. Esto puede ocasionar un daño adicional en la microcirculación cerebral así como en el tejido cerebral adyacente (Martínez-Orgado et al., 2021; Woodruff et al., 2011).

## Cerebro inmaduro

Los procesos fisiopatológicos asociados al accidente cerebrovascular isquémico son similares en el cerebro maduro y en el inmaduro (Martínez-Orgado et al., 2007). Sin embargo, a parte de las diferencias en cuanto a las causas y factores de riesgo entre estos grupos de edad, el cerebro inmaduro posee determinadas particularidades que hacen que tenga una susceptibilidad específica a este tipo de daño, así como diferencias en cuanto a la plasticidad y recuperación (Felling et al., 2020; Martínez-Orgado et al., 2007).

Al cerebro inmaduro se le asocia una mayor plasticidad que al del adulto, lo cual es una característica ventajosa frente a la lesión (Bonfanti & Charvet, 2021). Además, el desarrollo del cerebro prenatal tiene lugar en un ambiente hipóxico, lo que le hace especialmente resistente a la falta de oxígeno que acarrea el bloqueo en el suministro de flujo sanguíneo (Martínez-Orgado et al., 2007). Estas características, a priori beneficiosas, deben competir contra otras que afectan de forma decisiva al desarrollo normal de las redes y conexiones neuronales que tiene lugar en esta etapa (Felling et al., 2020).

A pesar de que muchos de los mecanismos intracelulares asociados a neurodegeneración se encuentran presentes en los diferentes grupos de edad, el cerebro inmaduro, en especial durante el desarrollo postnatal, se ve especialmente afectado por la excitotoxicidad y el estrés oxidativo (Vexler & Yenari, 2009). Además, en contraste con la mayor resistencia a un ambiente carente de oxígeno, el elevado metabolismo que requiere el rápido crecimiento y desarrollo del cerebro durante el periodo perinatal, combinado con la inmadurez de los sistemas de captación de glucosa, hacen que la falta de glucosa que conlleva la isquemia sea especialmente perjudicial a esta edad (Martínez-Orgado et al., 2007).

En cuanto a la mayor sensibilidad a la excitotoxicidad, el cerebro inmaduro cuenta con una sobreexpresión de receptores NMDA, ya que estos están implicados tanto en la maduración como en la plasticidad que el cerebro presenta en esta etapa. Estos receptores, además, son especialmente sensibles al glutamato en el cerebro inmaduro (Martínez-Orgado et al., 2007). Por otro lado, la liberación de GABA, que sería capaz de modular los efectos ya mencionados del exceso de glutamato, sufre un agotamiento más rápido y puede tener un carácter excitatorio en lugar del inhibitorio que se le presupone (Johnston et al., 2011; Martínez-Orgado et al., 2007, 2021).

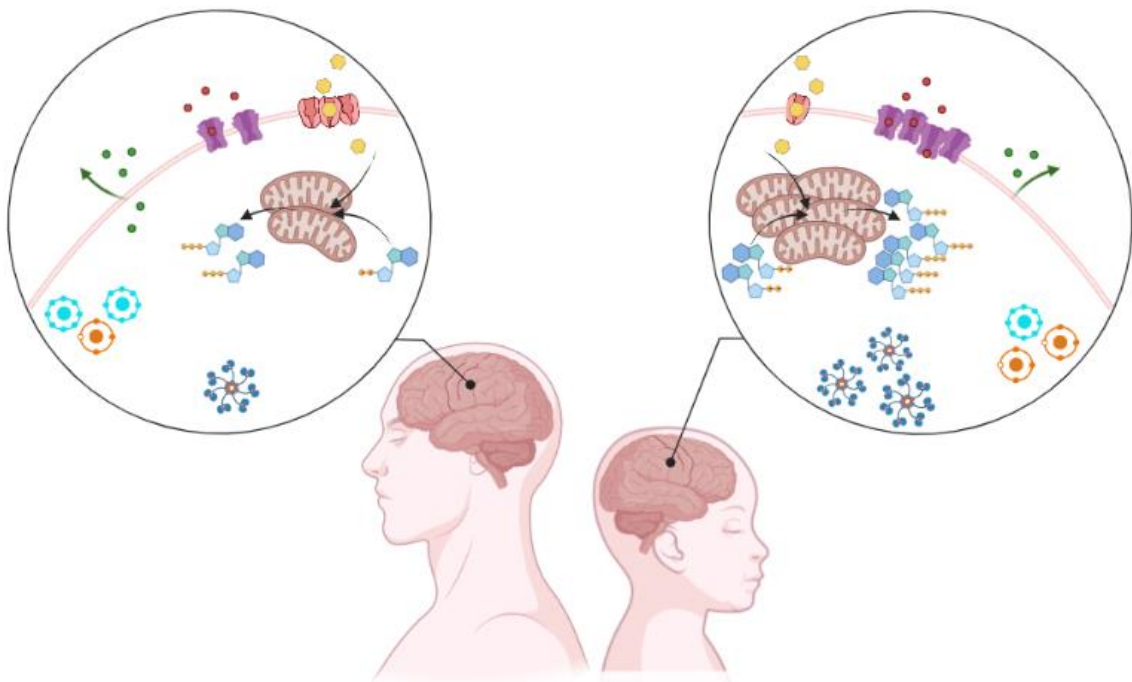
Como ya se ha mencionado, el cerebro presenta una elevada cantidad de ácidos grasos y estos suponen una diana para que el exceso de radicales libres, ocasionado por la isquemia, ejerza su daño mediante la peroxidación lipídica. Este contenido en lípidos es aún mayor en el cerebro inmaduro (Martínez-Orgado et al., 2019). La abundancia de hierro libre, asociada a la proliferación de los oligodendrocitos, es también un factor determinante en la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton (Martínez-Orgado et al., 2007). A todo esto hay que sumarle una deficiencia en cuanto a las defensas antioxidantes, como sería la glutatión peroxidasa, respecto a las presentes en el cerebro maduro, ya que en el momento del nacimiento estas solo están parcialmente desarrolladas (Martínez-Orgado et al., 2019; Martínez-Orgado et al., 2007, 2021).

Con respecto a la respuesta inflamatoria que tiene lugar tras un evento isquémico, en el cerebro inmaduro se produce un mayor aumento de células microgliales, así como una liberación de citoquinas proinflamatorias más intensa por parte de estas células cuando

presentan su fenotipo M1. Por el contrario, los efectos antiinflamatorios asociados al fenotipo M2 también son más relevantes que los del cerebro de adultos (Martínez-Orgado et al., 2021; Steinlin, 2017). En cuanto a las células no residentes en el parénquima cerebral, sino periféricas, los linfocitos T y B son capaces de infiltrarse en el cerebro tras producirse este ictus neonatal, pero presumiblemente esto sucede en menor medida que en el caso del cerebro maduro (Martínez-Biarge et al., 2019).

Probablemente esto sea debido a que, a pesar de la creencia de que en el cerebro inmaduro la barrera hematoencefálica es notablemente más permeable que en el maduro, la realidad es que las uniones estrechas están presentes desde primeras etapas del desarrollo embrionario (Vexler & Yenari, 2009). En el momento del nacimiento, esta barrera ya es funcional y no posee fenestraciones. La maduración de la barrera hematoencefálica, en último término, afecta sustancialmente este paso de los leucocitos de la sangre al tejido cerebral (Steinlin, 2017; Vexler & Yenari, 2009).

Por otro lado, las moléculas proapoptóticas se encuentran sobreexpresadas en el cerebro inmaduro, dado el papel determinante que cumple esta muerte celular en el desarrollo normal del cerebro. Esto hace que los procesos apoptóticos tengan una función mucho más crítica en el caso del cerebro inmaduro que en el maduro (Johnston et al., 2011; Martínez-Orgado et al., 2007; Steinlin, 2017).



**Figura 1. 6.** Esquema de las principales diferencias a nivel celular entre el cerebro inmaduro y el maduro. Adaptado de Martínez-Orgado et al., 2007.

Incluso hablando únicamente de cerebro inmaduro, la lesión asociada a la isquemia difiere en el caso de los recién nacidos a término de la de los recién nacidos de forma prematura, por ejemplo, afectando en mayor o menor medida a distintos tipos celulares. Cuando el daño se produce en prematuros suele tener una repercusión mayor sobre la sustancia blanca, mientras que en el caso de los recién nacidos a término se manifiesta principalmente en la sustancia gris (Fernández-López et al., 2014).

## Presentación clínica

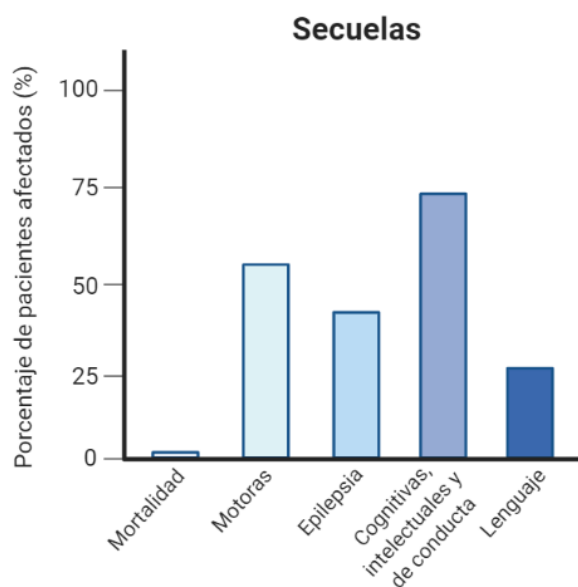
La manifestación clínica más habitual en estos recién nacidos son las **convulsiones**, presentándose como el síntoma inicial, o de presentación, en entre el 70% y el 90% de los casos y generalmente entre las doce primeras horas y los tres primeros días de vida. Sin embargo, este porcentaje es menor en el caso de los recién nacidos de manera prematura, ya que estos suelen ser asintomáticos (Clive et al., 2020; Dunbar & Kirton, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; Martínez-Biarge et al., 2019; Whitaker & Cipolla, 2020). La presentación de estas crisis más allá de las primeras horas de vida puede permitir diferenciar este tipo de patología de otras posibles causas de convulsiones, como por ejemplo la EHI (Dunbar & Kirton, 2019). Estas convulsiones se presentan de una forma muy sutil, que en muchas ocasiones se confunde con movimientos neonatales normales, dificultando su detección (Ferriero et al., 2019; Whitaker & Cipolla, 2020).

Otras manifestaciones propias de esta patología son la encefalopatía, la apnea o dificultades respiratorias, una alimentación anormal, las alteraciones en el nivel de conciencia, las anomalías del tono o la hemiparesia o lateralidad temprana (Dunbar & Kirton, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; Martínez-Biarge et al., 2019; Whitaker & Cipolla, 2020).

Lo sutiles que pueden resultar estos síntomas en comparación con los comportamientos que pueden ser tomados como normales en un recién nacido sano, tiene como consecuencia un infradiagnóstico del stroke perinatal (Whitaker & Cipolla, 2020).

## Secuelas

La mortalidad asociada al PAIS es muy poco frecuente, por ejemplo, cuando este AIS sucede en el período neonatal, la tasa de mortalidad es aproximadamente 0,16 por 100.000 nacidos



**Figura I. 7.** Porcentaje de pacientes con AIS neonatal afectados por las diferentes secuelas. Adaptado de Dunbar y Kirton, 2018.

vivos. Además, la mayoría de las muertes relacionadas con el PAIS están asociadas a complicaciones asociadas, como pueden ser afecciones sistémicas, hemorragias o una hipoxia-isquemia global (Lehman & Rivkin, 2014; Martínez-Biarge et al., 2019).

El infarto cerebral arterial isquémico es una de las principales causas reconocibles de parálisis cerebral, por tanto, las dificultades de tipo motor suponen una de las principales y mejor descritas secuelas del PAIS a largo plazo. Estos déficits aparecen en entre el 48 y el 59% de los neonatos que sufren este daño (Dunbar & Kirton, 2018; Lehman & Rivkin, 2014;

Wagenaar et al., 2018). Generalmente estas dificultades se presentan en forma de hemiparesia, aunque esta puede ser sutil y difícil de detectar, o de afectación de la función

motora gruesa (Dunbar & Kirton, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; Wagenaar et al., 2018; Whitaker & Cipolla, 2020).

Las convulsiones que, como ya se ha mencionado, muchas veces aparecen en la presentación clínica de esta patología, pueden ser repetidas y no responder al tratamiento, al menos inicialmente. A pesar de que, en un gran número de casos, estas remiten y no vuelven a afectar al niño, en otros casos estos neonatos terminan desarrollando epilepsia a largo plazo (Dunbar & Kirton, 2018, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; Wagenaar et al., 2018; Whitaker & Cipolla, 2020).

También se han descrito daños de tipo cognitivo (sin, a priori, afectación de la memoria de trabajo), visuales y asociados al lenguaje (Bosenbark et al., 2018; Dunbar & Kirton, 2018; Lehman & Rivkin, 2014; Wagenaar et al., 2018; Whitaker & Cipolla, 2020).

En general, el pronóstico es tan variable que algunos de los neonatos afectados por este PAIS pueden desarrollarse de forma normal, mientras que hasta un 75% de aquellos con un desarrollo anormal presentan varias de estas condiciones (Whitaker & Cipolla, 2020).

Hay que tener en cuenta que, en ocasiones, los bebés con una valoración favorable son dados de alta en el seguimiento médico, pudiendo infradiagnosticarse algunas de las secuelas mencionadas, especialmente aquellas asociadas al lenguaje, a la conducta o las cognitivas, ya que estas (y en especial las dos últimas) podrían aparecer posteriormente (Dunbar & Kirton, 2018; Wagenaar et al., 2018).

## **Falta de tratamiento óptimo**

El activador del plasminógeno tisular (t-PA por sus siglas en inglés) es el único fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) para el tratamiento del infarto cerebral en adultos, para el cual solo son elegibles entre el 3 y el 5% de los pacientes (Kaushik et al., 2020). En el caso de los neonatos la situación es aún más dramática, ya que no existe ningún tratamiento aprobado en la actualidad y por tanto la terapia es únicamente de soporte (Dunbar & Kirton, 2019; Rutherford et al., 2012; Whitaker & Cipolla, 2020).

Este tratamiento de soporte consiste principalmente en el de cualquier condición asociada a este daño que pueda surgir como consecuencia del mismo e incluso agravarlo, intentando, por tanto, impedir la evolución de la patología o la recurrencia de la misma (Rutherford et al., 2012; Whitaker & Cipolla, 2020). Por tanto, se trata de evitar circunstancias como la hipotensión, la hipoglucemia o la hipertermia, así como de lograr un equilibrio ácido-base y corregir anomalías electrolíticas (Rutherford et al., 2012; Whitaker & Cipolla, 2020). Mantener una correcta oxigenación, alimentación e hidratación, tratar una posible infección bacteriana con antibióticos o antivirales si esta es vírica y tratar una posible anemia son también medidas habituales (Cnossen et al., 2009; Whitaker & Cipolla, 2020). Frente a las convulsiones con las que habitualmente cursa este daño la terapia anticonvulsivante es un pilar de este tratamiento (Cnossen et al., 2009; Dunbar & Kirton, 2019; Whitaker & Cipolla, 2020).

El uso del t-PA u otros fármacos de carácter trombolítico, de hecho, está desaconsejado en neonatos, probablemente debido a la gran concentración de t-PA de la que ya se dispone en el período neonatal y una posible implicación del mismo de forma negativa en la

fisiopatología previamente descrita (Cnossen et al., 2009; Henry et al., 2013; Ishii et al., 1992; Whitaker & Cipolla, 2020). Las terapias anticoagulantes también está desaconsejada debido al riesgo de hemorragia que estas conllevan, salvo en determinados casos, como un origen cardioembólico documentado o riesgo de infarto cerebral recurrente, en los que se recomienda tratar con aspirina o heparina (Cnossen et al., 2009; Rutherford et al., 2012; Whitaker & Cipolla, 2020).

Se han testado tratamientos muy prometedores, como es el caso de la eritropoyetina o la melatonina, pero sin llegar a haber mostrado la eficacia esperada a nivel clínico (Gonzalez et al., 2013; Villapol et al., 2011). La hipotermia terapéutica, único tratamiento aprobado hasta la fecha para la EHI, no está indicada en el caso del PAIS, ya que hasta la fecha ha mostrado resultados contradictorios (Martínez-Orgado et al., 2021).

Cabe destacar que, en muchas ocasiones, cuando el PAIS se detecta el daño ya está bien establecido, dificultando la eficacia de distintos tratamientos y haciendo de vital importancia establecer el tiempo de ventana terapéutica de los mismos (Armstrong-Wells & Ferriero, 2014; Dunbar & Kirton, 2019; Rutherford et al., 2012).

Teniendo en cuenta la elevada incidencia con la que cuenta el PAIS, así como la pronta edad en la que esta tiene lugar y, por tanto, toda la vida que estos pacientes tienen por delante, parece necesario encontrar estrategias terapéuticas apropiadas que mejoren la calidad de vida de estos niños (Fernández-López et al., 2013).

## El CBD como opción de tratamiento en el PAIS

### Cannabinoides y Sistema Cannabinoide Endógeno

En este contexto de falta de tratamiento óptimo y necesidad de un fármaco que muestre una amplia ventana terapéutica, los **cannabinoides** aparecen como una opción muy prometedora (Ceprián et al., 2017; Fernández-López et al., 2013; Martínez-Orgado et al., 2007).

Inicialmente el término “cannabinoides” se limitaba a aquellas moléculas compuestas de 21 carbonos y generalmente con tres anillos ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno, procedentes de la planta *Cannabis sativa* (fitocannabinoides), principalmente el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) y el CBD, los cuales fueron caracterizados en la década de los 60 por Mechoulam y Gaoni (Cristino et al., 2020; Fraguas-Sánchez & Torres-Suárez, 2018; Mechoulam & Gaoni, 1967; Pertwee, 2005). Sin embargo, en la actualidad este término engloba todos los compuestos, tanto **naturales** como **sintéticos**, con estructuras similares a estos originales y/o que pueden imitar las acciones de estos, actuando sobre algunos de los receptores para los que los cannabinoides son agonistas (Pertwee, 2005).

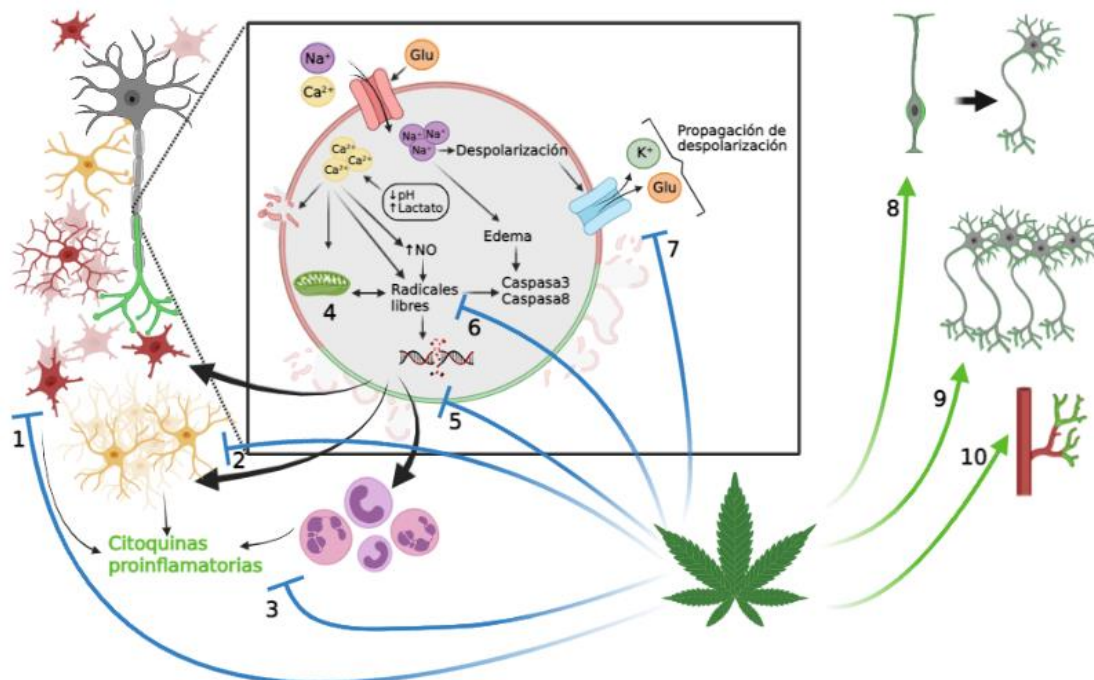
Entre estos receptores cannabinoides, los específicos y actualmente clonados son clásicamente conocidos como CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. Se trata de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Di Marzo & Piscitelli, 2015; Fernández-López et al., 2013; Howlett, 2005). CB<sub>1</sub> se localiza de forma predominante en el sistema nervioso central, aunque tiene una amplia distribución en diferentes órganos; mientras que la distribución de CB<sub>2</sub> es más limitada y se asocia a tejido y células inmunes, por lo que su presencia en el sistema nervioso, al menos en forma constitutiva, se restringe generalmente a la glía (Cristino et al., 2020; Fraguas-Sánchez & Torres-Suárez, 2018; Howlett, 2005). La actividad de los cannabinoides no se limita únicamente a estos receptores, ya que también pueden tener actividad sobre otros acoplados a proteínas G (como GPR55), receptores de potencial transitorio vaniloides (TRPV1), receptores activados por proliferador del peroxisoma (PPAR) o el receptor de 5-HT<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1A</sub>) (Bisogno et al., 2001; Cristino et al., 2020; Fraguas-Sánchez & Torres-Suárez, 2018; Franco et al., 2019; Hayakawa et al., 2009).

Los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, junto a sus principales ligandos endógenos, la anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), conocidos como endocannabinoides, así como a las moléculas encargadas de la síntesis y degradación de estos, forman el Sistema Cannabinoide Endógeno o **Sistema Endocannabinoide** (SEC) (Cristino et al., 2020; Fernández-López et al., 2013; Pertwee, 2005). Este sistema se encuentra alterado en una elevada cantidad de patologías neurológicas, lo que aumenta la susceptibilidad a dichas patologías. Esto hace que modular el Sistema Endocannabinoide se presente como una estrategia terapéutica muy prometedora (Cristino et al., 2020).

Los cannabinoides cuentan con la capacidad de actuar a la vez contra los diferentes efectos perjudiciales asociados al daño cerebral, como son la excitotoxicidad, el estrés oxidativo o la inflamación. Pero también ejercen sus propiedades sobre el fallo energético, la supervivencia neuronal, la proliferación y diferenciación de células progenitoras o la disfunción mitocondrial (Fernández-López et al., 2013; Ramos Atance, 2017). Este **carácter de amplio espectro** que muestran los cannabinoides los convierten en moléculas de un

gran interés y potencial terapéutico, ya que un gran número de estrategias terapéuticas pueden haber fracasado previamente por no tener una acción de amplio espectro y actuar solo sobre un único proceso perjudicial de los previamente mencionados (Martínez-Orgado et al., 2021; Ramos Atance, 2017).

Otra característica beneficiosa asociada a los cannabinoides es su capacidad de mantener y restaurar la **homeostasis** de las células cuando esta se ve alterada por algún daño. Este rasgo es característico e inherente al SEC y la administración exógena de cannabinoides es capaz de imitarlo, hecho que contribuye a considerarlos una estrategia terapéutica muy prometedora (Lowe et al., 2021; Ramos Atance, 2017). La alteración del SEC que se produce en diferentes patologías podría deberse a una respuesta de este para limitar el daño asociado a las mismas, por ejemplo, la concentración de CB<sub>2</sub> en cerebro aumenta (especialmente en las células gliales) ante una situación patológica y como parte de la respuesta protectora ante esta. Sin embargo, la regulación anómala de este sistema podría contribuir a empeorar estos procesos lesivos. La actuación sobre esta alteración mediante compuestos capaces de corregirla resultaría beneficioso para la homeostasis y, por tanto, protegería del daño (Ramos Atance, 2017).

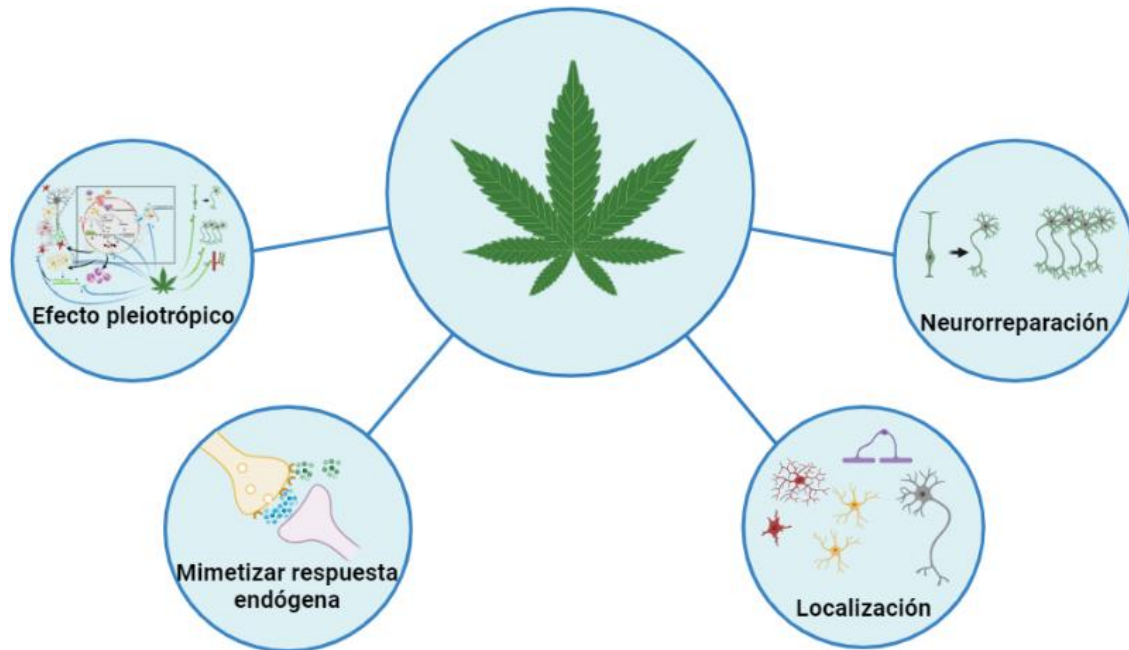


**Figura I. 9.** Actuación de los cannabinoides sobre la fisiopatología del PAIS. **1.** Reducción de la microglía activa. **2.** Reducción de la astrogliosis. **3.** Reducción de las citoquinas proinflamatorias y de la infiltración leucocitaria. **4.** Protección de mitocondrias. **5.** Mantenimiento de la integridad celular. **6.** Reducción del estrés oxidativo. **7.** Reducción de la excitotoxicidad. **8.** Diferenciación neuronal. **9.** Proliferación. **10.** Vasculogénesis.

La **ubicación**, dentro del tejido cerebral, de los receptores sobre los que pueden actuar los cannabinoides hace posible sus propiedades terapéuticas. Estos no solo se encuentran presentes en las neuronas, sino también en las células gliales (microglía, astrocitos u oligodendrocitos), en células progenitoras y en la barrera hematoencefálica, todas ellas tienen un papel crucial en la homeostasis ya mencionada, así como en la integridad y funcionalidad del tejido. La presencia del SEC en la barrera hematoencefálica interviene en la integridad de las uniones estrechas propias de esta, inhibe por tanto la infiltración de

leucocitos, regulando de esta forma la respuesta inmune característica del daño cerebral adquirido (Lowe et al., 2021; Lu & Mackie, 2021; Ramos Atance, 2017).

Finalmente, el hecho de que algunos componentes del SEC se localicen en precursores neurales o progenitores oligodendrogliales parece implicar a este sistema en los procesos de proliferación, diferenciación y maduración tan importantes para que se dé la **reparación del tejido** y el reemplazo de células afectadas. En el caso del PAIS esta característica es especialmente beneficiosa, ya que en un gran número de ocasiones cuando este se



**Figura 1. 10.** Beneficios de la utilización de moduladores del Sistema Endocannabinoide. Adaptado de Ramos-Atance I.A., 2017.

diagnostica ya se ha producido la pérdida de un elevado número de células, por lo que la neurorreparación del tejido (y no únicamente la protección de las células que permanecen sin afectar) es especialmente beneficiosa (Cristino et al., 2020; Lu & Mackie, 2021; Palazuelos et al., 2012; Ramos Atance, 2017; Zou & Kumar, 2018).

Sin embargo, el problema del uso terapéutico de cannabinoides en el daño cerebral adquirido en recién nacidos estriba en que se ha descrito que la sobreactivación de receptores CB<sub>1</sub>, por ejemplo empleando THC, induce efectos proapoptóticos en el cerebro de ratas recién nacidas, lo que se une a los efectos deletéreos sobre el neurodesarrollo que induce la administración de THC prenatalmente (Ceprián et al., 2017; Fernández-López et al., 2013; Martínez-Orgado et al., 2021; Mechoulam et al., 2007). Por ello es importante la búsqueda de eficacia terapéutica de agonistas cannabinoides que no ejerzan su acción a través de la activación de CB<sub>1</sub>.

## Cannabidiol

En este contexto, en el que los cannabinoides se muestran como una estrategia terapéutica potencialmente idónea, destaca concretamente el cannabidiol CBD. Esta molécula no posee efectos psicoestimulantes, lo cual es especialmente interesante en este caso, en el cual se trata con niños recién nacidos, para los cuales los efectos propios del THC podrían ser perjudiciales (Ceprián et al., 2017; Fernández-López et al., 2013; Martínez-Orgado et al.,

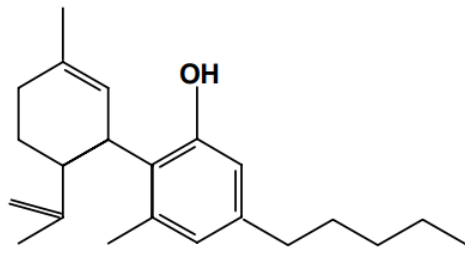


Figura 1. 11. Molécula del CBD.

de la excitotoxicidad y, en general, neuroprotector. Además, reduce la gliosis reactiva, promueve la neurogénesis, interviene en la homeostasis del calcio, tiene efectos anticonvulsivantes, ansiolíticos, antieméticos o antipsicóticos y estabiliza la membrana de las mitocondrias (Martínez-Orgado et al., 2021; Mechoulam et al., 2007; Pellati et al., 2018; Ramos Atance, 2017).

El mecanismo de acción del CBD aún no está completamente definido. De manera general, se ha establecido que esta molécula tiene una afinidad muy baja por CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, por lo que clásicamente se ha asociado e investigado su efecto sobre otros receptores (Mechoulam et al., 2007; Pertwee, 2008). Sin embargo, el CBD sí se puede unir a estos receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, ya que es capaz de antagonizar a los agonistas de estos receptores a concentraciones relativamente bajas. Puede comportarse, además, como un agonista inverso tanto de CB<sub>1</sub> como de CB<sub>2</sub>. El agonismo inverso sobre este último podría explicar, al menos en parte, las propiedades antiinflamatorias asociadas al CBD, ya que este efecto se asocia, por ejemplo, con una reducción de la migración celular, capacidad también asociada a los efectos del CBD (Franco et al., 2019; McPartland et al., 2015; Mechoulam et al., 2007; Pertwee, 2008).

Concretamente en el caso del daño cerebral perinatal, el CBD ya ha mostrado su eficacia en diferentes modelos preclínicos y actualmente se está probando su idoneidad en la clínica para tratar la EHI (Castillo et al., 2010; Ceprián et al., 2017; Martínez-Orgado et al., 2021; Pazos et al., 2013). Curiosamente, este efecto terapéutico y neuroprotector del CBD en el daño perinatal se revierte con antagonistas del receptor CB<sub>2</sub> (Martínez-Orgado et al., 2021). Los últimos estudios al respecto describen la presencia de heterodímeros funcionales en el SNC formados por CB<sub>2</sub> y 5-HT<sub>1A</sub> que parece ser clave para el efecto del CBD y pueden explicar la participación de CB<sub>2</sub> en éste (Castillo et al., 2010; Franco et al., 2019; Pazos et al., 2013). De hecho, el antagonismo de cualquiera de estos dos receptores bloquea el efecto protector del CBD (Franco et al., 2019; Pazos et al., 2013). La cantidad y la actividad de estos receptores varía a lo largo de la maduración, siendo mayor en el período fetal y disminuyendo su densidad a lo largo del desarrollo, pero también cambia en respuesta a un daño cerebral agudo (Franco et al., 2019).

El CBD es considerado un agonista del receptor de 5-HT 5-HT<sub>1A</sub> (Franco et al., 2019; Ramos Atance, 2017). La activación de este también está relacionada con la neuroprotección propia del CBD en estos modelos de daño cerebral, ya que se asocia, principalmente, con un incremento del flujo sanguíneo cerebral posterior al infarto, además de modular la inflamación, la excitotoxicidad y el efecto ansiolítico típico de este cannabinoide (Ceprián et al., 2017; Franco et al., 2019; Hayakawa et al., 2009; Ramos Atance, 2017).

Además de estos receptores, el CBD tiene efecto sobre otros, como sería el caso de PPAR $\gamma$ , que juega un papel clave en los efectos antiinflamatorios de este fármaco, o TRPV1,

2021; Mechoulam et al., 2007). Además, no conlleva un riesgo de convertirse en sustancia de abuso (García-Gutiérrez et al., 2020). Sin embargo, sí cuenta con diversidad de propiedades terapéuticas, como por ejemplo su carácter antiinflamatorio o inmunomodulador, antioxidante (rasgo clásico de los fenoles como el CBD), reductor

responsable de gran parte de la transmisión del impulso nervioso, explicando sus propiedades analgésicas, y los efectos vasculares del CBD (Bisogno et al., 2001; Franco et al., 2019; Martínez-Orgado et al., 2007, 2021). El efecto sobre esta cantidad de receptores diferentes aumenta la complejidad para determinar los mecanismos de acción específicos del CBD, pero por otro lado añade valor y diferentes posibilidades a sus propiedades terapéuticas (Ramos Atance, 2017).

Los beneficios del CBD como fármaco han sido comprobados hasta el punto de que ya se utiliza como estrategia terapéutica, principalmente para epilepsias infantiles refractarias, comercializado bajo el nombre Epidiolex® (Arzimanoglou et al., 2020; Devinsky et al., 2014; Ramos Atance, 2017). Además, este fármaco también ha demostrado su efectividad en una gran cantidad de modelos preclínicos, concretamente en modelos de daño cerebral perinatal como sería la EHI, daño para el cual el CBD ya está siendo utilizado en ensayos clínicos (Castillo et al., 2010; Martínez-Orgado et al., 2021; Pazos et al., 2013). En el caso del PAIS, el CBD también ha mostrado su eficacia en modelos preclínicos, así como en modelos de infarto arterial isquémico en adultos, confirmándose por tanto como una estrategia farmacológica prometedora contra este tipo de daño, especialmente en el caso de los neonatos, ya que como se ha descrito, es capaz de actuar sobre procesos especialmente lesivos en el caso del cerebro inmaduro (Ceprián et al., 2017; Hayakawa et al., 2009).

Además de su eficacia como tratamiento del daño adquirido perinatal, el CBD se ha mostrado de igual forma eficaz en el tratamiento de diferentes trastornos psiquiátricos o del estado de ánimo, los cuales, como ya se ha mencionado, pueden aparecer como secuelas que pueden ser determinante para la correcta recuperación y la calidad de vida de los recién nacidos afectados por un PAIS (Álvarez-García et al., 2022; Blessing et al., 2015; Campos et al., 2012; Devinsky et al., 2014). Principalmente se ha demostrado el efecto beneficioso del CBD actuando sobre la depresión, la ansiedad (ambos mayormente asociados a la actividad sobre el receptor 5-HT<sub>1A</sub>), la psicosis (relacionada generalmente con el receptor TRPV1), la compulsividad (asociado al efecto sobre la neurotransmisión mediada por anandamida) o el comportamiento adictivo (Campos et al., 2012; Devinsky et al., 2014).

Hasta la fecha, no se ha estudiado la eficacia del CBD como tratamiento de estas secuelas asociadas al infarto arterial isquémico perinatal, a pesar de haber demostrado su eficacia sobre estas enfermedades por separado y de la importancia de actuar sobre estas cuando tienen lugar, así como la seguridad asociada a la aplicación terapéutica del CBD (Blessing et al., 2015; Campos et al., 2012; Ceprián et al., 2017; Devinsky et al., 2014).

### VCE-004.8

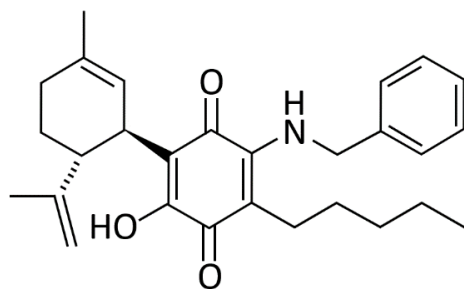


Figura 1. 12. Molécula del VCE-004.8.

El VCE-004.8 es un cannabinoide semisintético, ya que es un derivado del CBD, diseñado por Emerald Health Pharmaceuticals, para mejorar la actividad y farmacología de este (Burgaz et al., 2021; C. Navarrete et al., 2018). Se trata de una aminoquinona, agonista de los receptores PPAR $\gamma$  y CB<sub>2</sub>, que por tanto tiene una potente

actividad antiinflamatoria, por ejemplo, atenuando la polarización de la microglía a su fenotipo M1 o inhibiendo la expresión de COX-2 (C. Navarrete et al., 2018). Además, es capaz de activar el factor inducible por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés), por tanto, aparte de esta actividad antiinflamatoria, este fármaco tiene la capacidad de inducir la angiogénesis, así como de promover la migración de los oligodendrocitos (C. Navarrete et al., 2018; Palomares et al., 2018). De esta forma, en general, el VCE 004.8 reduce la infiltración de células inmunitarias y previene el daño axonal y la desmielinización (Burgaz et al., 2021; C. Navarrete et al., 2018; Palomares et al., 2018).

Este fármaco ya ha demostrado, en modelos preclínicos, que sus efectos pueden ser beneficiosos para el tratamiento de diferentes enfermedades degenerativas asociadas al sistema nervioso, como es el caso de la Esclerosis Múltiple o la Enfermedad de Parkinson (Burgaz et al., 2021; C. Navarrete et al., 2018, 2020). Teniendo en cuenta sus propiedades previamente mencionadas, las cuales están muy relacionadas con la fisiopatología del PAIS, así como esta eficacia mostrada en modelos preclínicos de otras enfermedades del Sistema Nervioso, es interesante evaluar la eficacia de este fármaco en el caso del PAIS. En especial, su efecto en la Enfermedad de Parkinson, en la cual es capaz de reducir la pérdida de neuronas dopaminérgicas, que como ya se ha mencionado son especialmente vulnerables al daño isquémico perinatal y cumplen un papel muy importante en las secuelas derivadas de este y asociadas al estado de ánimo, hacen del VCE-004.8 un candidato muy prometedor para el tratamiento del PAIS y sus diferentes consecuencias (Burgaz et al., 2021).

# Trastornos del estado de ánimo tras infarto cerebral

## Relación con el infarto cerebral isquémico arterial

La relación de los accidentes cerebrovasculares con los trastornos del estado de ánimo se centra principalmente en la depresión subsecuente al stroke, pero también incluyen ansiedad, apatía, manía (que implica un incremento de la actividad) o psicosis (Dafer et al., 2008; Dubovsky, 2015; Robinson & Jorge, 2016). Sin embargo, y principalmente teniendo en cuenta el infarto cerebral isquémico en recién nacidos, también se ha descrito como secuela el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Bosenbark et al., 2018; Williams et al., 2018).

## Depresión post-stroke

Definir la depresión puede ser controvertido, sin embargo, los rasgos que suelen caracterizarla este trastorno del estado de ánimo son un sentimiento general de tristeza, anhedonia o desesperanza, así como irritabilidad o cambios somáticos o cognitivos, como la disminución de la memoria o en la capacidad de concentración, que en última instancia alteran la funcionalidad del individuo (Pandarakalam, 2018; Ribeiro et al., 2017).

Una de las principales secuelas de tipo psiquiátrico asociadas al infarto cerebral en adultos es la depresión. Esta depresión post-stroke (PSD, por sus siglas en inglés) tiene lugar aproximadamente en entre el 33% y el 61% de los pacientes afectados por un ictus, aunque este porcentaje podría estar infradiagnosticado. Cabe destacar que esta secuela se asocia con una **peor recuperación funcional**, un riesgo más elevado de deterioro cognitivo y motor, graves problemas en cuanto a las interacciones sociales y, por tanto y de manera general, con una peor calidad de vida y una **mayor mortalidad** (Dafer et al., 2008; Das & G K, 2018; Dong et al., 2022; G. Li et al., 2021; Robinson & Jorge, 2016). Además, hay que recalcar el desgaste que una secuela de este tipo supone también para los familiares y cuidadores de los pacientes afectados (Das & G K, 2018).

La localización de la lesión isquémica tiene relación con la probabilidad de sufrir depresión subsecuente al infarto. Por ejemplo, se ha demostrado en diferentes estudios clínicos que existe una mayor incidencia de PSD cuando el daño se produce en el hemisferio izquierdo (Dafer et al., 2008; Das & G K, 2018).

A pesar de que la relación entre estas patologías ha sido ampliamente descrita, los mecanismos fisiopatológicos que subyacen la conexión entre ambas no están aclarados completamente (Das & G K, 2018; G. Li et al., 2021). Se ha propuesto que el inicio de esta PSD puede ser multifactorial, implicando factores biológicos como la inflamación, la neurogénesis o la alteración de factores tróficos y de las vías catecolaminérgica y serotoninérgica, pero también implicando factores psicosociales (Dafer et al., 2008; Das & G K, 2018; Robinson & Jorge, 2016). Es importante definir estos mecanismos de manera más concreta, ya que conocer biomarcadores que puedan ser medibles de forma fácil y rápida permitiendo predecir la PSD sería de vital importancia para la asignación y optimización de una atención sanitaria apropiada, además de permitir desarrollar una estrategia terapéutica

adecuada para prevenir o subsanar estos procesos patológicos (Das & G K, 2018; G. Li et al., 2021).

Generalmente, la aparición de esta PSD se produce durante los primeros meses o hasta el primer año tras sufrir el infarto cerebral, posteriormente su incidencia disminuye (Das & G K, 2018; G. Li et al., 2021). En ocasiones, se produce una remisión de esta PSD durante los primeros meses tras su establecimiento; conseguir esta remisión de la depresión es de vital importancia, ya que se ha demostrado que cuando esto sucede, especialmente durante los primeros meses, se consigue una mejor recuperación funcional del paciente (Chemerinski et al., 2001; G. Li et al., 2021).

## **Problemas de conducta y del estado de ánimo después de PAIS**

Los problemas con la conducta, son secuelas frecuentes del PAIS, apareciendo hasta en un 11% de los casos (Dunbar & Kirton, 2018, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; Wagenaar et al., 2018). Principalmente estos aparecen en forma de déficit de atención e hiperactividad (Bosenbark et al., 2018; Dunbar & Kirton, 2018; Lehman & Rivkin, 2014). La incidencia de esta hiperactividad aumenta con la edad (Bosenbark et al., 2018).

A pesar de que la depresión posterior al infarto está ampliamente descrita en el caso del stroke en adultos, los estudios referidos a este trastorno del estado de ánimo en cuanto a los neonatos son escasos, no habiéndose analizado tampoco en modelos animales (Das & G K, 2018; Dong et al., 2022; Gower & Tiberi, 2018). Recientemente, se ha demostrado la presencia de esta secuela en niños que sufrieron una EHI neonatal, patología muy similar al PAIS (Álvarez-García et al., 2022). Es importante determinar la posible presencia de esta secuela, ya que como se ha explicado, de forma general está ampliamente relacionada con una mayor morbilidad y mortalidad en adultos, afectando negativamente a una posible recuperación (Álvarez-García et al., 2022; Das & G K, 2018; Dong et al., 2022). Concretamente, la depresión infantil se asocia con una elevada recurrencia, un alto riesgo de suicidio, comorbilidad con otros problemas de salud mental o con dificultades tanto a nivel escolar como en las relaciones sociales, secuelas que pueden prolongarse durante toda la vida del paciente, condicionando la misma desde una edad muy temprana (Forman-Hoffman & Viswanathan, 2018). Por tanto, es esencial prevenir esta depresión en la infancia para mejorar la salud y reducir los costes asociados (Mendelson & Tandon, 2016).

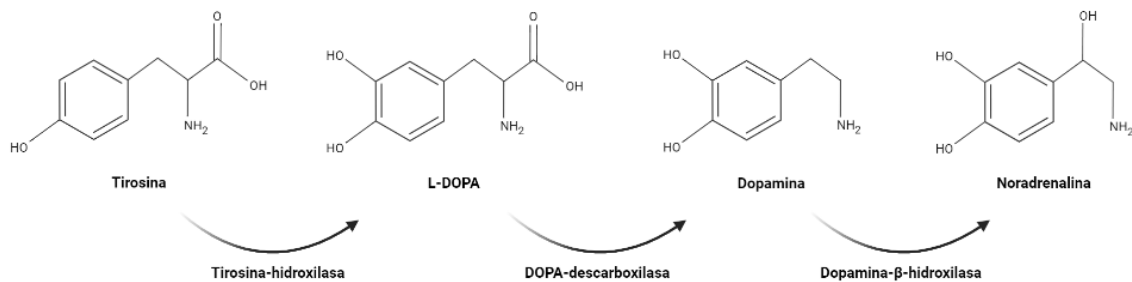
Por tanto, establecer si una depresión tras el PAIS remite o se cronifica, teniendo en cuenta que los neonatos tienen toda una vida por delante, también parece un parámetro decisivo que se debe estudiar para valorar su implicación en la recuperación funcional de estos niños (Chemerinski et al., 2001; G. Li et al., 2021).

## **Monoaminas e infarto cerebral isquémico arterial**

Poniendo el foco en las secuelas referidas al estado de ánimo, como la depresión o la hiperactividad, está ampliamente descrita la importancia de los circuitos cerebrales monoaminérgicos, es decir noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico (Cabana-Domínguez et al., 2022; Pytka et al., 2016). Sin embargo, recientemente ha crecido la importancia que se otorga concretamente al sistema dopaminérgico asociada al stroke

isquémico y su posible relación con las posibles secuelas sobre el estado de ánimo (Kaushik et al., 2020).

La DA es el principal neurotransmisor catecolaminérgico presente en el cerebro. Se sintetiza partiendo del aminoácido L-Tirosina, el cual mediante la enzima tirosina-hidroxilasa (TH) se transforma en L-DOPA, que posteriormente, por la actuación de la DOPA-descarboxilasa, da lugar a la DA (Turk et al., 2021). Esta, a su vez, puede continuar la ruta catecolaminérgica, transformándose en NA a través de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (Qi et al., 2008).



**Figura I. 8.** Ruta de síntesis de las catecolaminas.

La DA está implicada en un gran número de procesos e influye en multitud de capacidades funcionales, por ejemplo, de tipo motor, cognitivo, motivación, aprendizaje o el habla. Por tanto su alteración puede implicar diferentes trastornos, que pueden incluir tanto depresión como hiperactividad (Schultz, 2007; Turk et al., 2021).

Estas neuronas encargadas de la síntesis de DA (dopaminérgicas) son especialmente sensibles al daño provocado por el estrés oxidativo, ya que consumen un alto grado de oxígeno, contienen pocas defensas antioxidantes y un elevado porcentaje de hierro y lípidos peroxidables (Kaushik et al., 2020).

Además, la importancia de la DA en esta patología se puede demostrar mediante algunos estudios que demuestran que un tratamiento que aumente los niveles de la misma es, en muchos casos, beneficioso para los pacientes (Gower & Tiberi, 2018; Obi et al., 2018; Talhada et al., 2021). De hecho, actuar sobre el sistema dopaminérgico se ha postulado como uno de los candidatos más prometedores para promover la recuperación funcional sobre un accidente cerebral isquémico (Gower & Tiberi, 2018; Kaushik et al., 2020; Obi et al., 2018; Talhada et al., 2021). El efecto preciso que el stroke tiene sobre el sistema dopaminérgico podría alterar este de diversas maneras, por lo que parece requerir un tratamiento adecuado, por tanto se hace preciso comprender de la mejor manera posible este daño concreto para determinar la mejor estrategia terapéutica (Gower & Tiberi, 2018).

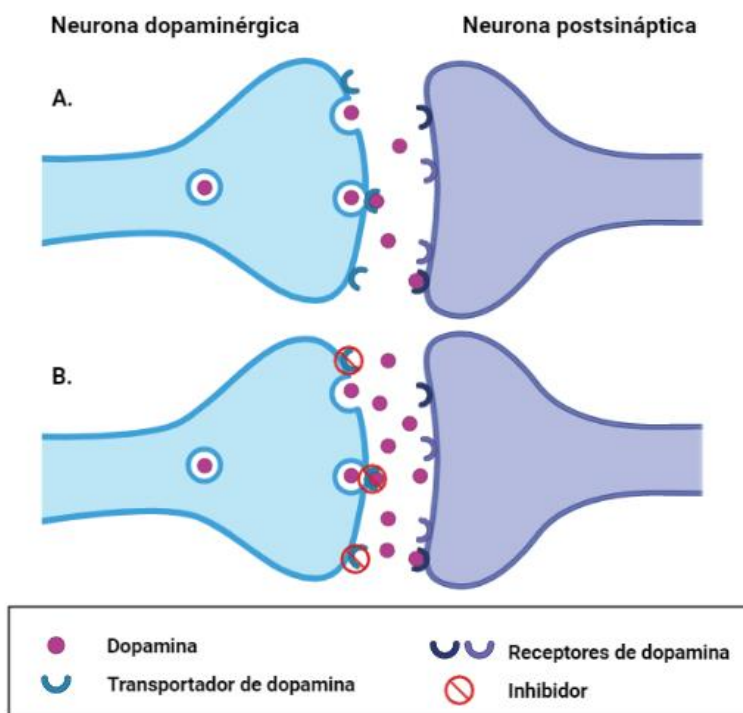
## Dopamina y depresión

Como ya se ha indicado, la alteración de la vía catecolaminérgica, y concretamente en la DA, es uno de los factores implicados en la aparición de la depresión; de hecho, un descenso en la disponibilidad de las aminas es la principal hipótesis para explicar esta patología (Das & G K, 2018; Kronenberg et al., 2012; Loubinoux et al., 2012; Schultz, 2007). En el caso del sistema dopaminérgico, se ha descrito que una alteración del circuito de recompensa

asociado al mismo puede resultar en anhedonia, típica de la depresión (Loubinoux et al., 2012).

Así, la inhibición de la recaptación de DA (la cual se produce a través del DAT), para aumentar la biodisponibilidad de esta en el cerebro, es una de las terapias utilizadas para tratar la depresión. Es más, en el caso del desarrollo fetal, pueden ser más beneficiosos estos que los inhibidores de la recaptación de 5-HT, ya que esta última juega un papel crucial en el desarrollo del cerebro y se ha descrito, por ejemplo, una relación entre niveles elevados de 5-HT en esta etapa y el desarrollo de autismo (Hendrick et al., 2017; Ng, 2017; Sommer et al., 2014).

Por otro lado, también se ha indicado que el sistema dopaminérgico es uno de los afectados por el infarto arterial isquémico, por tanto, se puede establecer una conexión entre esta alteración con el comportamiento tipo depresivo que se puede apreciar como consecuencia del stroke. Sin embargo, para lograr definir de forma clara la etiología de la PSD, dada la falta de estudios al respecto, es necesario seguir realizando investigaciones, tanto a nivel preclínico como clínico (Loubinoux et al., 2012).



**Figura I. 13.** Funcionamiento de los inhibidores de la recaptación de dopamina. A. Representa un estado de baja concentración de dopamina. B. Representa el aumento de la concentración de dopamina subsecuente al tratamiento con el inhibidor de la recaptación de esta.

En este sentido, se ha demostrado que, al ocluir la arteria cerebral media, concretamente en el hemisferio izquierdo, produce una degeneración de las neuronas dopaminérgicas presentes en el VTA ipsilateral a la lesión y por tanto una reducción en la concentración de la DA en el estriado (Kronenberg et al., 2012). Esta alteración se correspondió con cambios comportamentales, concretamente anhedonia y comportamiento tipo depresivo, evaluados tanto por el consumo de sacarosa como por la prueba de natación forzada (Kronenberg et al., 2012).

## Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) se caracteriza por una baja capacidad de atención, impulsividad y exceso de actividad motora de manera persistente y patológica. Se han descrito también alteraciones en cuanto a la motivación de estos pacientes, especialmente en relación al sistema de aprendizaje por refuerzo (en el cual está implicado la DA), ya que se caracteriza por una menor habilidad para posponer la gratificación e incapacidad para responder a la disciplina (DiMaio et al., 2003; Glimcher, 2011; Tripp & Wickens, 2009). El diagnóstico de este trastorno se basa principalmente en la presencia de determinados síntomas de tipo conductual (Tripp & Wickens, 2009).

En relación al PAIS, no existen muchos estudios que se centren en la función ejecutiva y la atención de los niños afectados por este daño perinatal, Sin embargo, se han descrito alteraciones del comportamiento que, en un gran número de casos, son compatibles con un diagnóstico de TDAH, llegando a describirse como el principal trastorno psiquiátrico secundario al stroke pediátrico, afectando hasta a la mitad de estos pacientes (Bosenbark et al., 2018; Williams et al., 2018).

Es importante tener en cuenta el momento en el que se establece esta secuela, ya que se ha descrito que la edad de evaluación de los pacientes que han sufrido un PAIS influye en el diagnóstico de TDAH, mostrando una sintomatología más agravada aquellos sujetos que contaban con una mayor edad (Bosenbark et al., 2018).

Esta secuela del stroke perinatal, a su vez, genera dificultades a nivel intelectual, académico y en la capacidad de adaptación de los niños que lo padecen. Dichas alteraciones, en última instancia, definen de forma decisiva la calidad de vida de los niños que las padecen en un momento determinante del desarrollo de los mismos como es, principalmente la infancia y el comienzo de la adolescencia, las cuales principales etapas para el diagnóstico del TDAH (Bosenbark et al., 2018; DiMaio et al., 2003; Williams et al., 2018).

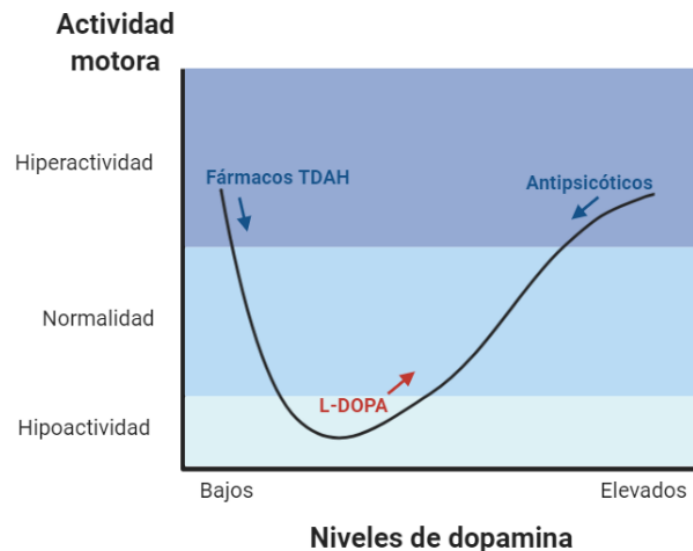
Es clave definir la aparición del TDAH como secuela del PAIS, ya que esto puede ayudar a la comprensión, por parte de los padres y educadores, de las dificultades y barreras con las que tendrían que luchar estos niños (Williams et al., 2018). Todas estas limitaciones asociadas al TDAH que condicionarían la vida de los pacientes, deberían ser razón suficiente para intentar definir el momento de aparición de este trastorno, así como para buscar una estrategia terapéutica adecuada, que permita mejorar la calidad de vida de estos niños (Bosenbark et al., 2018; Williams et al., 2018).

## Dopamina y TDAH

Inicialmente los estudios sobre la etiología de este trastorno se basaban en estudios de imagen o genéticos, dando poca importancia a los neurotransmisores que pudiesen estar implicados en la fisiopatología a nivel celular. En este sentido, posteriormente, las investigaciones han otorgado un papel importante al sistema dopaminérgico, proponiendo que una alteración del mismo es causa de muchos de los síntomas relacionados con el TDAH, como los asociados a la motivación y el refuerzo, muy ligados a la neurotransmisión de la DA (Russell et al., 2005; Tripp & Wickens, 2009). Concretamente la relación de la DA con el sistema de refuerzo se relaciona con la vía mesolímbica de esta, que se proyecta desde el VTA al sistema límbico (Russell et al., 2005).

Sin embargo, esta no es la única implicación de la DA en los síntomas del TDAH. Por otro lado, la vía mesocortical, que es aquella que tiene su origen en el VTA y se proyecta a diferentes zonas de la corteza, está implicada en diversas funciones, como el control motor, la inhibición de determinados comportamientos, la atención o la memoria (Russell et al., 2005; Tripp & Wickens, 2009). Además, se han identificado varios genes relacionados con el sistema dopaminérgico asociados al desarrollo de TDAH (DiMaio et al., 2003; Russell et al., 2005; Tripp & Wickens, 2009).

Clásicamente un déficit de DA se asocia con una locomoción disminuida; por el contrario, niveles elevados de este neurotransmisor corresponden con hiperlocomoción (Hagino et al., 2015; Masini & Kiehn, 2022). Teniendo esto en cuenta, el TDAH debería relacionarse con una elevada concentración extracelular de esta DA. Sin embargo, generalmente este trastorno se asocia con una disminución en la concentración de DA y en la transmisión de la misma (Hagino et al., 2015; Russell et al., 2005). De hecho, algunos de los principales tratamientos utilizados en la actualidad, como el metilfenidato o la dextroanfetamina, se caracterizan por aumentar los



**Figura 1. 14.** Esquema resumen de la relación entre la cantidad de dopamina y la actividad motora. Adaptado de Hagino et al., 2015.

niveles de DA extrasináptica, lo cual es un factor más a favor de considerar el déficit de este neurotransmisor como al menos una posible causa de este trastorno (Del Campo et al., 2011; Russell et al., 2005; Sharma & Couture, 2014; Tripp & Wickens, 2009).

Más concretamente, se ha demostrado a nivel preclínico que una depleción de DA en ratas neonatas ocasionaba un incremento en la actividad motora, reduciendo además el comportamiento relativo a la ansiedad, a largo plazo (Ogata et al., 2019). Esto es de interés teniendo en cuenta que una depleción parcial, que provoque una actividad hipodopaminérgica, pero no una falta completa de esta, se relaciona con la fisiopatología del TDAH (Lai et al., 2018).

## Falta de estudios en PAIS

Existen evidencias, tanto a nivel preclínico como clínico, que ponen de manifiesto que la edad prenatal, así como la edad postnatal temprana, son claves en el origen de muchas enfermedades de tipo neuropsiquiátrico (Ardalan et al., 2019).

Además, y como ya se ha mencionado, las alteraciones de la conducta son frecuentes en los niños que han sufrido un PAIS y generalmente se asocian con hiperactividad y déficits de atención (Dunbar & Kirton, 2019; Lehman & Rivkin, 2014; Williams et al., 2018). Sin

embargo, la afectación funcional a este nivel de los niños afectados no está tan estudiada como otras, como por ejemplo podría ser aquella a nivel motor, y es importante tener en cuenta que este daño puede variar a lo largo del tiempo, por tanto el diagnóstico dependerá también de lo que dure el seguimiento al paciente (Chabrier et al., 2011). De hecho, como ya se ha indicado, en una patología similar a esta, como es la EHI, se ha descrito un comportamiento tipo depresivo en los primeros años posteriores a sufrir dicho daño (Álvarez-García et al., 2022).

Estas diferencias en cuanto a la hiper o hipoactividad asociada al daño adquirido neonatal se han comprobado también a nivel preclínico, donde en modelos animales de EHI se han descrito ambos tipos de comportamiento (Borjini et al., 2019; Brima et al., 2013; Miguel et al., 2015; E. F. Sanches et al., 2019). También se han encontrado diferencias en cuanto al comportamiento tipo ansiedad que mostraban estos animales, relacionándose con la edad a la que este se evalúa, dando a entender, una vez más, la importancia de contextualizar los trastornos en el momento concreto de su aparición (Borjini et al., 2019).

El hecho de que existan estas diferencias a nivel clínico entre daños neonatales similares puede deberse a dificultades en el diagnóstico de estos trastornos y en el seguimiento de estos pacientes, que hace que la aparición de este tipo de trastornos no haya sido correctamente estudiada. Por su parte, los diferentes comportamientos en cuanto a hiper e hipoactividad dentro del propio modelo de EHI, sugiere que hacen falta más estudios preclínicos en este sentido, a fin de definir la existencia de estos trastornos y el momento de aparición de los mismos. Describir y tratar los trastornos psiquiátricos asociados al PAIS puede ser determinante para mejorar el aprendizaje y el desarrollo de estos niños (Dunbar & Kirton, 2019).

Se hace necesario, por tanto, un estudio más exhaustivo de estos trastornos, de su momento de aparición y de los procesos fisiológicos subyacentes, a fin de poder definir biomarcadores que faciliten la detección de estos, así como para poder establecer una estrategia terapéutica apropiada (Borjini et al., 2019).

## Modelos animales

### Modelo animal de PAIS

A fin de poder estudiar en un modelo preclínico, concretamente desarrollado en rata, todo lo referido el infarto cerebral arterial perinatal, Derugin y colaboradores describieron en 1998, y posteriormente modificaron en 2005, un modelo de stroke neonatal transitorio. Este modelo consiste en la oclusión de la arteria cerebral media izquierda, durante un período de 3 horas, en ratas de entre 7 y 10 días de edad (Derugin et al., 1998, 2005).

La oclusión se produce en la arteria cerebral media debido a que es la arteria más frecuentemente afectada en los casos de PAIS (87,5% de las veces) (Munoz et al., 2018; Wagenaar et al., 2018). Concretamente, en el neonato las lesiones suelen ser unilaterales y afectan preferentemente al hemisferio izquierdo (en más del 60% de los casos totales y en torno al 80% de los infartos unilaterales) (Dunbar & Kirton, 2019; Ferriero et al., 2019; Grunt et al., 2015; Munoz et al., 2018; Wagenaar et al., 2018). La configuración anatómica de los vasos sanguíneos, que conduce la circulación sistémica desde el corazón hacia la arteria cerebral media izquierda, por ser la vía más directa, ya que las carótida izquierda se bifurca del arco aórtico más directamente que la derecha, así como la presencia de un ductus arterioso permeable que desemboca en la aorta antes de la salida de la carótida común izquierda, pueden explicar que la mayoría de las lesiones se produzcan en el territorio de esta arteria (Biswas et al., 2020; Grunt et al., 2015; Martinez-Biarge et al., 2019).

El hecho de que se produzca la reperusión también confirma la validez del modelo para reproducir la realidad y la fisiopatología de una forma más fiable. Es importante tener en cuenta esta reperusión, ya que, a pesar de que generalmente es deseable que dicha reperusión se produzca, una parte del daño asociado al PAIS corresponde a esta y no solo a la propia isquemia (Woodruff et al., 2011). No tener en cuenta este proceso de reperusión significaría no reproducir correctamente el daño asociado a este accidente cerebrovascular.

La edad de las ratas utilizadas en el modelo se sitúa entre los días postnatales 7 y 10, ya que se ha demostrado que en estos días el grado de desarrollo del cerebro del animal es similar al de un recién nacido a término humano (Semple et al., 2013). Una vez más esto demuestra la gran reproducción de la realidad por parte de este modelo, ya que más de la mitad de los niños que sufren un infarto en el territorio de la arteria cerebral media nacen a término, incluso en ocasiones a una edad más tardía que otros subtipos (Fernández-López et al., 2014; Titomanlio et al., 2015; Wagenaar et al., 2018).

### Modelos preclínicos de trastornos del estado de ánimo

El estudio de los trastornos psiquiátricos en modelos animales siempre ha sido controvertido. Esto es debido, principalmente, a las dificultades que presenta describir estas alteraciones en otras especies distintas al humano, por las grandes variaciones en cuanto a la forma de mostrarse estos trastornos entre las distintas especies (Ménard et al., 2016; Nestler & Hyman, 2010). Sin embargo, estas conductas se han descrito, tanto en la especie humana como fuera de esta, permitiendo proponer diferentes pruebas de comportamiento a fin de detectar actitudes similares a las que encontraríamos en nuestros

conespecíficos (M. E. Fox & Lobo, 2019; Ménard et al., 2016; Nestler & Hyman, 2010; Thierry et al., 1984).

El Test de Suspensión Caudal (**Tail Suspension Test, TST**) fue descrito inicialmente por Steru y colaboradores en 1985. Se trata de una herramienta muy utilizada en la búsqueda de tratamientos antidepresivos, principalmente en ratones y ratas. Consiste en colgar al animal de la cola, alejado de superficies en las que se pueda apoyar, durante 6 minutos, evaluando el tiempo que permanece inmóvil, ya que este se asocia con un comportamiento tipo depresivo (Arauchi et al., 2018; Can et al., 2012; Steru et al., 1985).

Esta prueba se basa en la “*estrategia de búsqueda-espera*”. Según esta, los individuos, ante una prueba de supervivencia que no es capaz de resolver, tiene que decidir buscar una solución (actividad) o esperar a que esta aparezca (inmovilidad, relacionada con depresión). Generalmente, cuanto mayor dificultad implica la resolución de un problema, más se favorece el comportamiento tipo espera. Se ha demostrado que los fármacos antidepresivos son capaces de inclinar esta estrategia hacia el comportamiento de búsqueda de una solución (Steru et al., 1985; Thierry et al., 1984).

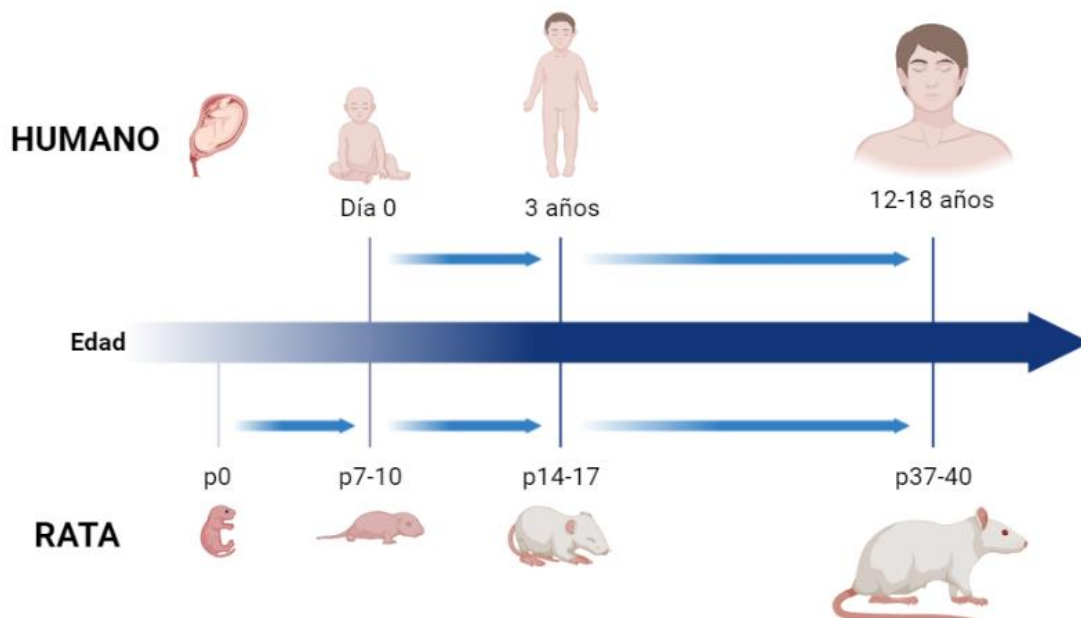
Por otro lado, el Test de Natación Forzada (**Forced Swimming Test, FST**) es una de las pruebas más utilizadas para estudiar la depresión, así como diferentes fármacos antidepresivos. Fue inicialmente descrito por Porsolt y colaboradores y evalúa el comportamiento instintivo de los roedores de escapar del agua (Kraeuter et al., 2019a; Porsolt et al., 1977; Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Para ello, el protocolo consiste en introducir al animal en un cilindro lleno de agua, del cual no puede escapar, durante 5 minutos. Durante este tiempo y principalmente en los primeros momentos, mostrará un comportamiento relacionado con un intento de huida (nadar o trepar), hasta que más adelante, el comportamiento pasa a ser de inmovilidad (flotar) (Yankelevitch-Yahav et al., 2015). En general, los animales que muestren un comportamiento tipo depresivo dejarán de moverse antes y contarán con un mayor tiempo de inmovilidad (Kraeuter et al., 2019a). Además, esta prueba expone al animal a elevados niveles de estrés, lo cual está relacionado con la aparición de depresión (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

Otra ventaja que supone este test se debe a la relación que se puede establecer entre el comportamiento de movilidad observado con las distintas vías sobre las que pueden actuar los fármacos antidepresivos. De esta forma, se ha determinado que los tratamientos que actúan sobre la vía dopaminérgica aumentarán el comportamiento de tipo trepar, mientras que aquellos con actividad sobre la vía serotoninérgica promueven la natación de estos animales (Slattery & Cryan, 2012).

El Test de Campo Abierto (**Open Field Test, OFT**) puede utilizarse para medir la actividad locomotora, así como el comportamiento de tipo ansioso. Se describió por primera vez por parte de Hall y Ballachey, en 1932 y consiste en emplazar al animal en un espacio o campo abierto, generalmente durante 10 minutos, a fin de evaluar principalmente la distancia recorrida, así como el número de cruces por la zona central (Hall & Ballachey, 1932; Kraeuter et al., 2019b). Generalmente, los roedores tienden a quedarse cerca de las paredes del campo debido a su ftofobia y su tigmotaxis (moverse pegados a la pared), conducta que se acentúa aún más si presentan un comportamiento ansioso (Choleris et al., 2001; Kraeuter et al., 2019b).

## Implicación en el PAIS

Es de gran importancia poder contar con estos modelos animales para el estudio del PAIS, sus secuelas y posibles tratamientos. Sin embargo, también es importante tener en cuenta las diferencias entre la maduración de los animales de experimentación y los humanos. Por ejemplo, como ya se ha mencionado, los días postnatales de 7 a 10 (p7-p10) de desarrollo en la rata equivalen a un recién nacido a término humano. Pero también cabe destacar que una semana después de este daño, entre los días 14 y 17 postnatales (p14-p17), la equivalencia en la edad humana, por ejemplo en el establecimiento completo de la función motora, estaría en torno a los tres años (Semple et al., 2013). Esta edad en los humanos adquiere aún más importancia si tenemos en cuenta que coincide con el inicio de la escolarización o de las interacciones sociales, así como con el inicio de algunos síntomas depresivos descritos en asociación al daño cerebral adquirido (Álvarez-García et al., 2022). Por este motivo, a nivel preclínico es muy interesante realizar pruebas conductuales una semana después de que se produzca el daño, a fin de intentar detectar la aparición de trastornos de tipo psiquiátrico lo antes posible. Hay que tener en cuenta las posibles limitaciones que se podrían encontrar a esta edad, en la que solo se pueden evaluar reflejos, como el hecho de que estos animales fuesen aún muy pequeños como para realizarles una prueba tan estresante como el FST, o para tener una motilidad representativa como para ser evaluada en el OFT (Ceprián Costoso, 2019; Yankelevitch-Yahav et al., 2015). Sin embargo, en el caso del TST, el hecho de realizarlo a esta edad podría ayudar a esquivar una de las principales limitaciones para realizar esta prueba en ratas como es el peso de estas en la edad adulta, ya que alrededor de los 15 días de edad, tienen un tamaño equiparable al de un ratón adulto (Jost, 1985; Schreuder et al., 2006).



*Figura I. 15. Comparativa de las diferentes edades del desarrollo del humano y la rata.*

Por otro lado, en este modelo preclínico de PAIS, un mes después del daño los animales se encontrarían entre los días 37 y 40 postnatal (p37-p40). Esta edad del roedor se asemejaría a una edad entre los 12 y los 18 años en el humano (Semple et al., 2013). Esta edad es

principalmente determinante en el establecimiento de trastornos de tipo TDAH, cuya incidencia asociada al PAIS aumenta según avanza la edad de diagnóstico (Bosenbark et al., 2018; Drechsler et al., 2020). En este caso y para definir la aparición de trastornos psiquiátricos asociados a este daño, así como el momento de aparición y/o la duración de los mismos, aparece como una opción interesante realizar pruebas como el FST y el OFT. De esta forma se podrá evaluar tanto el estado neuropsiquiátrico de los animales como su actividad motora (Kraeuter et al., 2019a, 2019b).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





El modelo de oclusión de la arteria cerebral media, en rata neonata, reproducirá las características clásicas del PAIS en recién nacidos humanos. Provocará, por tanto, tanto a corto como a largo plazo, secuelas a nivel motor, así como trastornos del estado de ánimo, los cuales estarán debidos a alteraciones en los principales neurotransmisores implicados en estos procesos. El tratamiento con CBD o uno de sus derivados, posteriormente a la inducción de la lesión, será capaz de mejorar todas estas secuelas debidas al daño isquémico, dado su carácter neuroprotector.

Para comprobar la hipótesis propuesta, se plantearon los siguientes objetivos:

- Reproducir un modelo de infarto isquémico arterial perinatal en rata neonata, que represente las secuelas típicas de este daño en neonatos humanos.
- Comprobar la presencia de alteraciones del estado de ánimo asociadas al infarto isquémico arterial perinatal en el modelo planteado, tanto a corto como a largo plazo.
- Caracterizar los mecanismos por los que se producen estas alteraciones del estado de ánimo asociadas al infarto isquémico arterial perinatal.
- Determinar los efectos del cannabinoide CBD sobre las alteraciones del estado de ánimo asociadas al stroke perinatal.
- Caracterizar los mecanismos por los que el CBD produce efecto sobre las alteraciones del estado de ánimo.
- Determinar los efectos del derivado cannabinoide VCE-004.8 sobre las alteraciones funcionales del estado de ánimo asociadas al stroke perinatal.

A fin de alcanzar los objetivos propuestos, se realizaron las técnicas experimentales descritas en el siguiente apartado.



# MATERIAL Y MÉTODOS

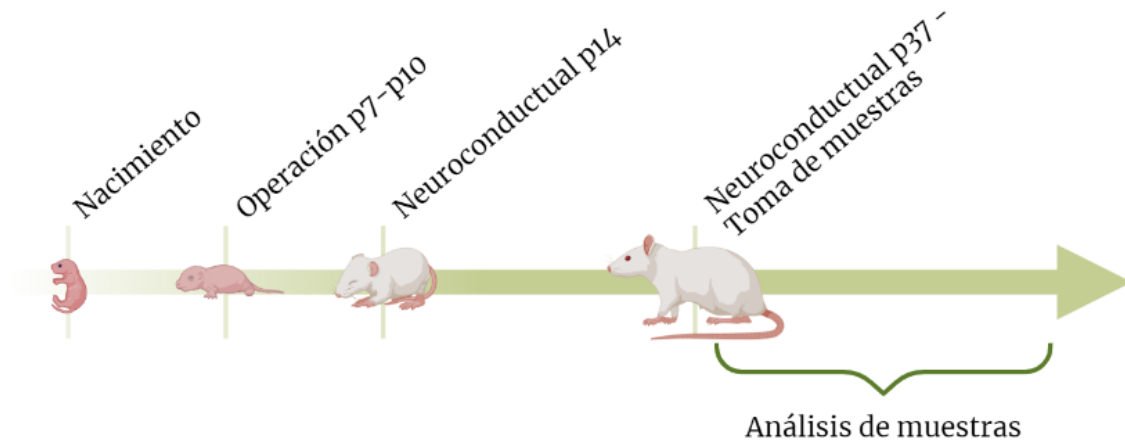




## Diseños experimentales

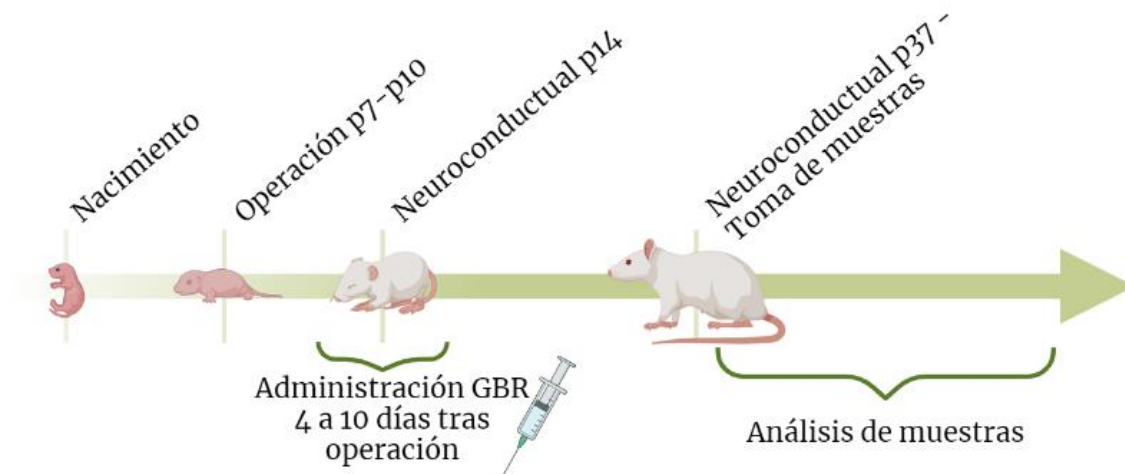
### Diseño experimental 1

Comprobación del correcto desarrollo del modelo y de la aparición de trastornos del estado de ánimo en relación al mismo.



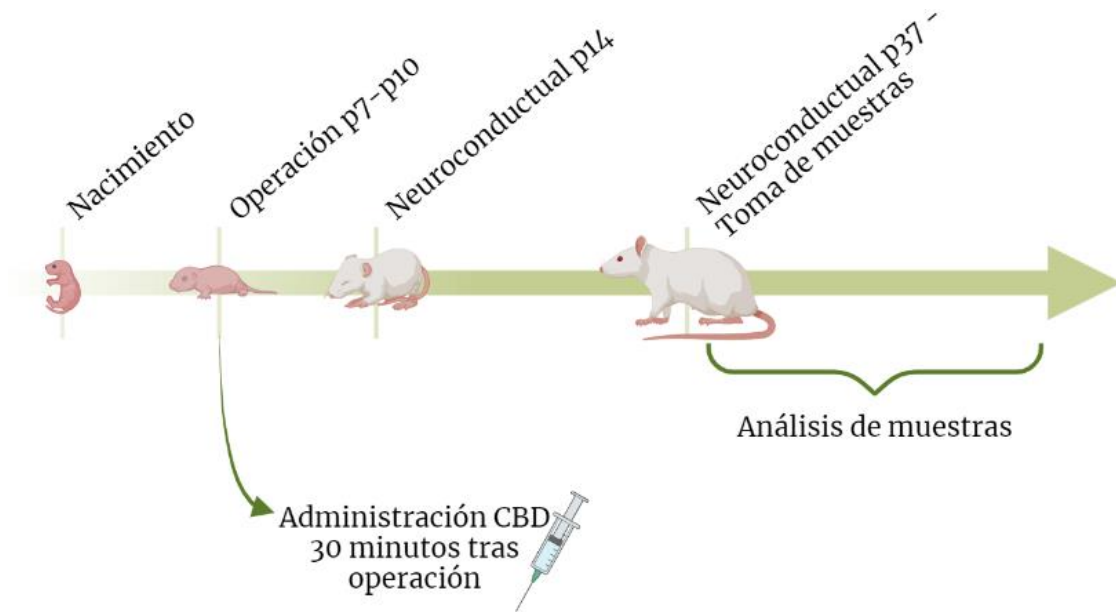
### Diseño experimental 2

Determinación de la implicación de los niveles de DA en las alteraciones del estado de ánimo encontradas, mediante un inhibidor de la recaptación de este inhibidor.



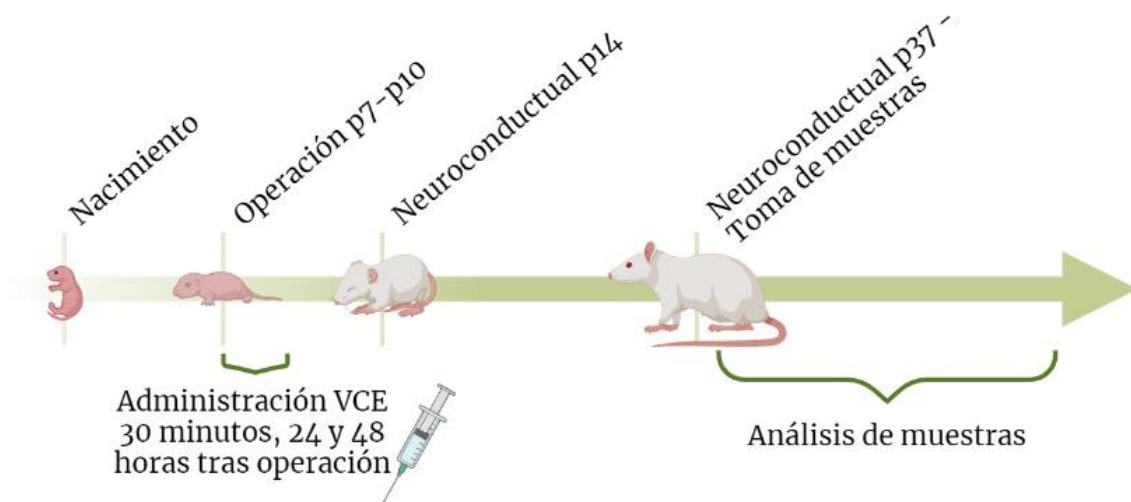
### Diseño experimental 3

Demostración de la eficacia terapéutica del CBD sobre el daño clásico de la isquemia y sobre las alteraciones del estado de ánimo.



### Diseño experimental 4

Comprobación de la eficacia terapéutica del VCE-004.8 sobre el daño isquémico clásico y sobre las alteraciones del estado de ánimo.



## Animales de experimentación

El protocolo experimental cumplió con la normativa europea y española de protección de animales de experimentación (2010/63/UE y RD 53/2013, así como la modificación de este según el RD 118/2021) y fue aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Clínico San Carlos (Madrid, España).

Los animales utilizados fueron *Rattus norvegicus* tipo Wistar. A lo largo de la estancia de los animales en su estabulario se respetaron los requisitos ambientales precisos. La temperatura se mantuvo entre los 20° y los 24° centígrados y la humedad relativa en torno al 60%. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12h/12h. El agua y la comida se administraron *ad libitum*. Se respetaron las medidas de superficie y altura por animal establecidas para los habitáculos. Se hizo todo lo posible para minimizar el número y el sufrimiento de los animales.

## Inducción del PAIS

La camada completa de ratas Wistar, de entre 7 y 10 días de edad (p7-p10), equivalente en términos de desarrollo a un recién nacido humano, fue separada de la madre durante todo el proceso quirúrgico. Se anestesió a los animales, por vía inhalada, durante la cirugía con sevoflurano (5% de inducción, 3% de mantenimiento), a la vez que se les aportó oxígeno y aire medicinal por la misma vía.

Se reprodujo el modelo descrito previamente por Ceprián y colaboradores (Ceprián et al., 2017). Para ello, con el animal situado en posición decúbito supino y previa aplicación de clorhexidina en la zona, se realizó una incisión en su cuello, a la altura de la bifurcación de la carótida común izquierda. Se aisló la carótida interna y, a fin de evitar hemorragias, se cortó el flujo de la misma. Se realizó una pequeña cisura en dicha carótida interna y se introdujo por la misma un filamento de nylon, engrosado en uno de sus extremos con silicona, *occluder*, (Doccol Corporation, MA, EE.UU). Se orientó y dirigió este *occluder* hacia la arteria cerebral media izquierda, el avance del mismo se detuvo al alcanzar una distancia previamente conocida según el peso del animal e indicada en la Tabla M. 1.). Una vez introducido esta distancia

**Tabla M. 1.** Distancia de introducción del *occluder* según el peso.

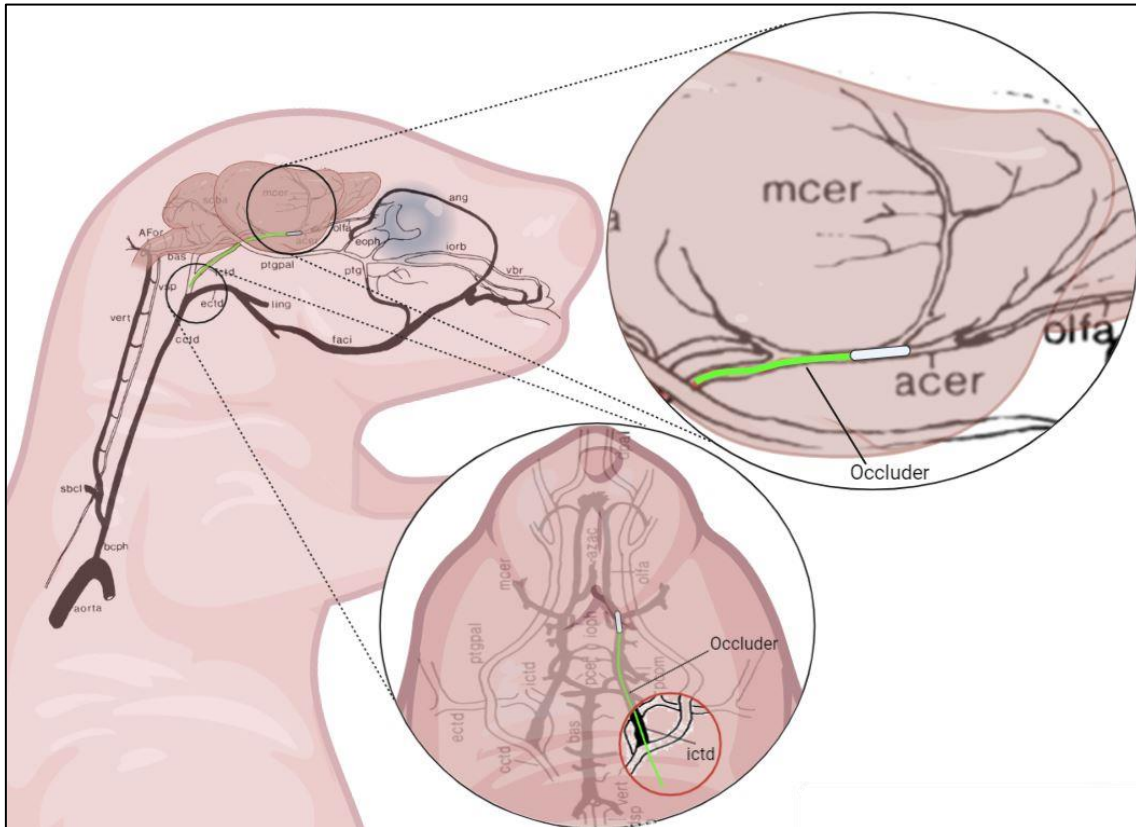
PESO (g)	DISTANCIA (mm)
14	8,5
16	9
18	9,5
20	10
22	10,5

determinada, se fijó la posición del *occluder* para evitar un posible desplazamiento del mismo. Se cerró la incisión producida en el cuello con puntos de sutura y se despertó a la rata de la anestesia. Durante todo este proceso la temperatura corporal de los animales permaneció constante. Se mantuvo la oclusión de la arteria cerebral media izquierda durante 3 horas. Una vez cumplido este tiempo, se anestesió de nuevo al animal, bajo las condiciones descritas previamente, y se procedió a retirar el *occluder*. Tras comprobar la correcta reperusión del flujo sanguíneo a través de la carótida interna, así como el bloqueo o la no aparición de posibles hemorragias, se cerró de nuevo la incisión del cuello y se despertó al animal de la anestesia. Una vez más se aplicó clorhexidina en la zona afectada.

De nuevo, durante este procedimiento se mantuvo controlada la temperatura corporal. Se marcó al animal en la oreja para su futura identificación, se aplicó también aquí clorhexidina.

Para comprobar los efectos de la anestesia y la incisión, se contó con un grupo control (SHAM) al cual se le realizó exactamente el mismo procedimiento, a excepción de la introducción del occluder a través de la carótida interna.

El tiempo de operación para cada animal no fue superior a los 20 minutos y la temperatura de los animales se mantuvo controlada durante todo el procedimiento. Una vez terminadas todas las cirugías, los animales fueron devueltos a su madre.



**Figura M. 1.** Representación del modelo de oclusión temporal de la arteria cerebral media.

## Distribución de grupos experimentales

Los animales se asignaron siempre de forma aleatoria a cada grupo experimental, tratando de que el tamaño de los grupos fuese lo más similar posible.

En el caso del **diseño experimental número 1**, el día de la operación, los animales se distribuyeron entre los grupos **SHAM** (aquellos a los que no se les realizó la oclusión de la arteria cerebral media, aunque si se simuló el resto del proceso quirúrgico) y **MCAO** (animales a los cuales sí se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media).

Para el **diseño experimental número 2** se utilizó un inhibidor de la recaptación de la DA, el GBR 12909, o vanoxerina, dihidrocloruro (TOCRIS, Bristol, Reino Unido), sobre algunos de los animales MCAO, seleccionados de manera aleatoria. Este fármaco se inyectó diariamente entre los días 4 y 10 después de la lesión, vía subcutánea, a una dosis de

5mg/Kg, dosis y tiempos que han mostrado ser eficaces y seguros en estudios previos y en edades similares (Reynolds et al., 2011; J. Wang et al., 2020), y en un volumen de 100µL, o bien vehículo, el cual se preparó de la misma manera que el fármaco, a excepción de la adición del mismo. Se inyectó a los animales SHAM con este mismo vehículo. Por tanto, para este estudio, se añadió el siguiente grupo:

**MCAOI:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con vehículo en el momento de la operación y con GBR 12909 posteriormente.

En el **diseño experimental número 3**, en el que se comprobó el efecto del fitocannabinoide CBD, 30 minutos después de la operación de cada animal. Tanto en el caso de los SHAM como en el de los MCAO, se trató con CBD (TOCRIS, Bristol, Reino Unido) vía intraperitoneal, a una dosis de 5mg/Kg y en un volumen de 100µL; o bien con vehículo (VEH) preparado e inoculado de la misma manera que el CBD, a excepción de la adición del propio fármaco. Todos ellos fueron designados de manera aleatoria. Cabe destacar que el tiempo de ventana terapéutica, así como la dosis utilizada, se basaron en ensayos previamente realizados por nuestro grupo (Ceprián et al., 2017). Por tanto, los grupos utilizados fueron:

**SHAMC:** Animales no ocluidos tratados con CBD.

**MCAOC:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media tratados con CBD.

Tras comprobar la falta de diferencias entre los grupos SHAM tratados con vehículo y aquellos SHAM tratados con CBD, y a fin de respetar el principio de “*Las Tres Rs*” (reducir, refinar y reemplazar) ahorrando por tanto en cuanto al número de animales utilizados, así como para conseguir una mayor potencia estadística, se eliminó el grupo SHAMC del estudio, contando únicamente con el grupo SHAM.

En el **diseño experimental número 4**, se comprobó de manera preliminar la efectividad del cannabinoide sintético VCE-004.8 (Emerald Health Pharmaceuticals, CA, EE.UU). Para ello se determinó una dosis de 5mg/Kg, con la que se trató a un grupo de animales, tanto SHAM como MCAO, seleccionados de manera aleatoria. Este fármaco se administró en un volumen de 100µL vía intraperitoneal, 30 minutos, 24 y 48 horas después de la reperusión. Esta dosis fue determinada según estudios previos del grupo. Al mismo tiempo se inyectó a determinados animales, tanto SHAM como MCAO, un vehículo preparado de igual forma que el fármaco, exceptuando la adición del mismo. Por tanto, para este estudio, se añadió el siguiente grupo:

**MCAOV:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con VCE-004.8.

## Preparación de los fármacos

### Cannabidiol

10mg de CBD se disolvieron en 1mL de etanol absoluto (quedando a una concentración de 10mg/mL), se alicuotó, se gaseó con nitrógeno a fin de reducir los niveles de oxígeno y favorecer la preservación de las alícuotas y se almacenó a -20°C para asegurar su correcta conservación hasta el momento del uso.

Para su preparación y su dilución en suero salino, siempre se mantuvo una proporción 1:1:18 respectivamente de etanol:disolvente orgánico:suero salino asegurando que el cannabinoide se mezclase de manera correcta sin precipitar. En este sentido, en el momento de la operación se partió de una alícuota de 100µL (y por tanto 1mg). Esta se evaporó hasta obtener un volumen de 10µL al que se añadieron otros 10µL del disolvente orgánico, en este caso Kolliphor® (Sigma Aldrich, MO, EE.UU), tras lo cual se agitó la mezcla durante 2 minutos. Una vez hecho esto, se añadieron 180µL de suero salino al 0,9%, gota a gota y agitando entre cada una de estas. Se obtuvo por tanto un volumen final de 200µL, que respetaba esta proporción mencionada previamente (1:1:18). En estos 200µL se conservaba 1mg de CBD, quedando por tanto a una concentración de 5mg/mL.

Esta solución se diluyó en suero salino hasta alcanzar la concentración indicada para asegurar la dosis de 5mg/Kg en 100µL por animal.

### **GBR 12909 dihidrocloruro**

50mg de GBR 12909 se disolvieron en 2mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, MO, EE.UU). Esta solución fue mezclada con Captisol® (Abmole Bioscience, TX, EE.UU) al 20% en una proporción de 1mL de DMSO por cada 9mL de Captisol, siendo por tanto en este momento la concentración de GBR 12909 de 2,5mg/mL. El volumen resultante fue alicuotado en volúmenes menores y almacenado a -20°C, para asegurar así su correcta preservación en el tiempo que duró el experimento.

En el día de su uso, se descongeló una alícuota y se diluyó en suero salino al 0,9% hasta alcanzar la concentración deseada para, en último término, inyectar una dosis de 5mg/Kg en 100µL para cada rata.

### **VCE-004.8**

Inicialmente se pesaron 50mg del fármaco VCE-004.8 y se disolvieron en 1,5mL de DMSO, añadidos lentamente y en constante agitación. Una vez añadido este volumen de DMSO, se incorporaron a la mezcla 1,5mL de Tween-20 (Scytek, UT, EE.UU), también lentamente y en constante agitación. Finalmente se añadieron en agitación 7mL de Captisol al 14,28% a fin de que en el volumen final de 10mL este Captisol se encontrase al 10%. Este volumen final se alicuotó, se gaseó y se conservó a -20°C para su correcta preservación hasta el momento del uso.

En el día de su utilización se descongeló una alícuota y se diluyó en suero salino al 0,9% hasta alcanzar la concentración deseada para garantizar una dosis de 5mg/Kg en 100µL para cada animal.

## **Imágenes de resonancia magnética**

Las exploraciones mediante imágenes de resonancia magnética (MRI) de los animales pertenecientes a los diferentes grupos MCAO *in vivo* se realizaron en la Unidad de Resonancia Magnética del Instituto Pluridisciplinar, (Universidad Complutense, Madrid, España) en un equipo de Imagen de Resonancia Magnética (MRI) ICON-1T (Bruker-Medical, Ettlingen, Alemania). Este equipo cuenta con una intensidad de campo de 1 Tesla y una

intensidad del gradiente de 450 mT/m. Se realizó un estudio T2WI2D, con unas dimensiones de adquisición de 157x157x20.

Esta evaluación se realizó 6 días después del daño y, en el caso de los animales tratados con vehículo, de nuevo 30 días después. Durante la toma de imágenes los animales se mantuvieron anestesiados mediante isoflurano, con las constantes vitales monitorizadas y la temperatura corporal controlada. Ya que anteriormente en nuestro grupo se ha evaluado la no presencia de área hiperintensa, así como de diferencia interhemisférica, en aquellos animales SHAM, las resonancias solo se realizaron a los animales pertenecientes a los diferentes grupos MCAO.

Para cada animal, el área hiperintensa y las diferencias de tamaño entre los hemisferios se calcularon a partir de una muestra representativa de las imágenes adquiridas. Esta muestra representativa de imágenes fue la comprendida entre las imágenes mostradas en la *Figura M. 2*. El valor de área hiperintensa y el de diferencia interhemisférica se sumaron en cada imagen, obteniendo así el área total de lesión de dicha imagen. Posteriormente se sumaron las áreas de lesión de todas las imágenes analizadas, obteniendo así el volumen de lesión. El porcentaje de volumen de lesión se calculó dividiendo el volumen de lesión entre el volumen de los hemisferios sanos multiplicados por dos (lo cual determinaría el volumen esperado para un cerebro sano). Los datos, por tanto, siguieron la fórmula detallada a continuación:

$$\frac{\Sigma(\text{Diferencia entre hemisferios} + \text{Área hiperintensa})}{\Sigma(\text{Hemisferio sano} \times 2)} \times 100$$

IMAGEN INICIAL

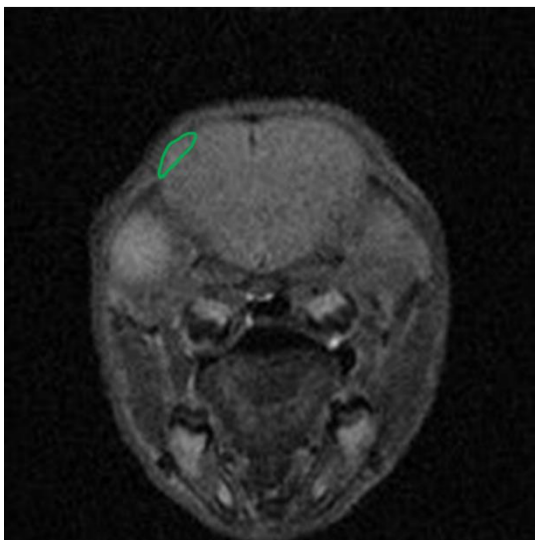
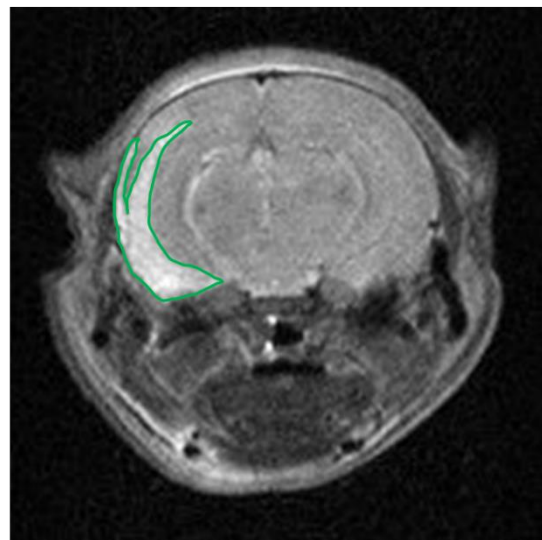


IMAGEN FINAL



*Figura M. 2.* Imágenes inicial y final de la muestra representativa de láminas examinadas para el estudio de MRI. En verde se muestra el área hiperintensa analizado en las mismas.

Para realizar estas estimaciones previamente mencionadas se utilizó el software ImageJ 1.52a (NIH, Bethesda, USA).

## Pruebas neuroconductuales

Se realizaron pruebas neuroconductuales tanto una semana (aproximadamente en el día postnatal 14, o p14) como un mes (aproximadamente el día postnatal 37, o p37) después

del daño. Estas pruebas tuvieron como finalidad evaluar el estado funcional de los animales tras el daño, principalmente tanto a nivel motor como del estado de ánimo, pero también a nivel cognitivo cuando fue posible. Estos estudios neuroconductuales fueron realizados en una sala acondicionada a tal efecto y siempre en un horario comprendido entre las 11:00 y las 14:00. Cada día de prueba, las ratas fueron previamente acondicionadas a la sala a fin de reducir los niveles de estrés de los animales a la hora del test.

### **Pruebas neuroconductuales a corto plazo (p14)**

A esta edad los animales son aún pequeños y no tienen todas sus capacidades funcionales desarrolladas, por lo que generalmente se evalúan reflejos ya presentes desde esta edad.

**Geotaxia inversa:** Se impulsó al animal por un plano inclinado 45°, con la cabeza orientada hacia la parte inferior del plano, y se evaluó el tiempo que tardó en girar 180° sobre sí mismo, hasta colocarse con la cabeza orientada hacia la parte superior del plano. Este giro representa un reflejo inherente al animal y evalúa su coordinación motora. Los animales que tengan alterada dicha coordinación motora, hecho esperable en los individuos lesionados, tardarán más tiempo en realizar este giro que los que no sufran esta alteración.

**Reflejo de agarre palmar (o test de agarre):** Se aproximó una varilla fina a la palma de cada una de las extremidades de la rata y se comprobó el agarre que esta ofreció al percibirla. De esta forma se midió el estado sensoriomotor del animal, ya que al notar esta varilla su reflejo debería suponer el cierre de dicha extremidad en torno a este objeto, a fin de agarrarla. Se evaluó este agarre en una escala del 0 al 2, siendo 0 la ausencia de agarre y 2 un agarre firme y completo, se sumaron los resultados de las cuatro patas.

**Reflejo de presión:** Se acercó una varilla fina a las palmas de las dos patas traseras de la rata, impulsando ambas a la vez, haciendo que estas se flexionasen. Se evaluó en una escala de 0 a 2 la fuerza con la que el animal fue capaz de empujar esta varilla en dirección contraria, estirando para ello las patas, siendo 0 la ausencia de empuje y 2 una oposición fuerte. De esta forma se determinó el estado del motor grueso del animal.

**Test de suspensión de la cola (TST):** Basado en el ya mencionado y descrito por primera vez por Steru y colaboradores (Steru et al., 1985). Se colgó a la rata por la cola, impidiendo que esta pudiese agarrarse a ningún objeto, durante 6 minutos. La prueba fue grabada a fin de poder medir posteriormente el tiempo de inmovilidad que presentó el animal a lo largo de esos 6 minutos. Se evaluó de esta forma el comportamiento tipo depresivo que presentaban las ratas.

### **Pruebas neuroconductuales a largo plazo (p37)**

**Test del cilindro (Cylinder Rearing Test, CRT):** Se colocó a la rata, durante 5 minutos, en un cilindro transparente de metacrilato de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Se evaluó la primera pata delantera apoyada en la pared del cilindro (diferenciando entre izquierda, derecha o ambas) cada vez que la rata se levantó sobre sus dos patas traseras. Se calculó la preferencia por la pata ipsilateral a la lesión, asociada con una alteración de tipo hemiparético, debida al daño, en la función motora del animal. Se descartaron los resultados de aquellos animales que se levantaron menos de 5 veces. La ratio de la preferencia por la pata ipsilateral sobre la contralateral a la lesión se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

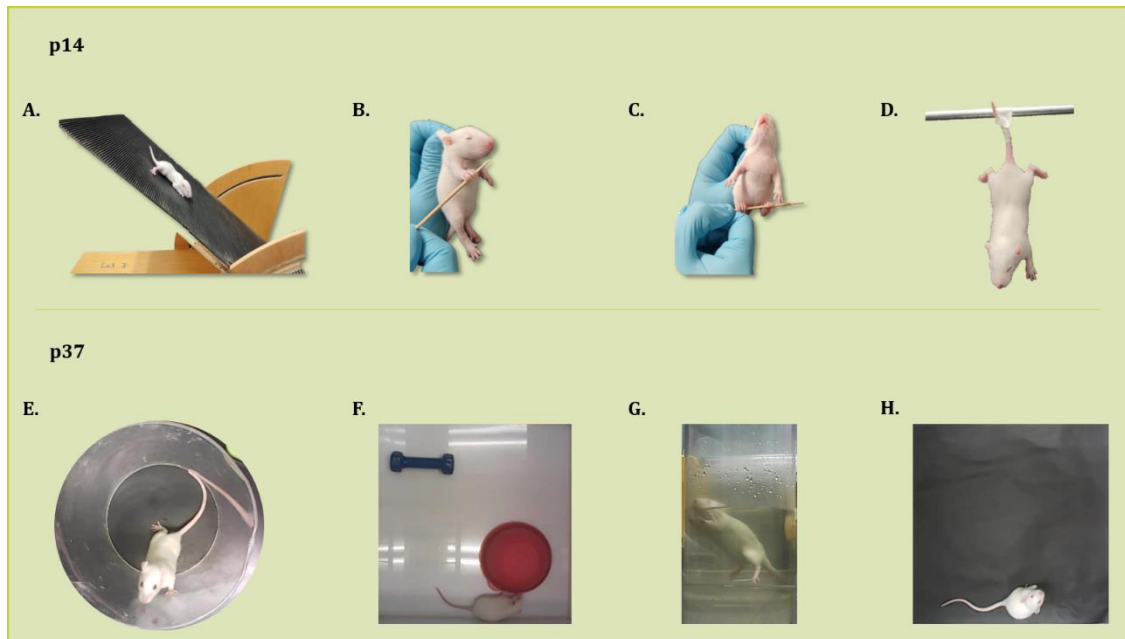
(Apoyos izquierda – Apoyos derecha)  
*Apoyos totales*

**Test del reconocimiento de objeto nuevo (Novel Object Recognition, NOR):** Esta prueba se realizó para evaluar el estado cognitivo del animal, concretamente la memoria de trabajo a corto plazo. El primer día de test se acondicionó, durante 5 minutos, al animal introduciéndolo en la caja de metacrilato en la que posteriormente se realizó el mismo, para que esta no fuese novedosa para el animal en el momento de la prueba, evitando así elevados niveles de estrés y un comportamiento de exploración de la propia arena en el momento de estudiar su comportamiento. 24 horas después se volvió a introducir a la rata en la caja, esta vez con dos objetos exactamente iguales colocados en lugares opuestos de la arena. Se permitió a la rata interactuar con estos objetos libremente durante 5 minutos. Una hora después se sustituyó uno de estos objetos por otro nuevo y completamente distinto de los anteriores y se volvió a dejar a la rata interactuar con estos durante 5 minutos. Estos últimos fueron grabados para analizar el tiempo de interacción del animal con cada uno de los objetos. Posteriormente y con estos datos, se calculó la preferencia que presentaba la rata por explorar el objeto novedoso, comportamiento que indicaría que recuerda el objeto que ya conocía con anterioridad. Dicha preferencia se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Tiempo objeto nuevo} - \text{Tiempo objeto familiar})}{\text{Tiempo total de interacción}}$$

**Test de la natación forzada (Forced Swimming Test, FST):** A fin de evaluar el comportamiento tipo depresivo, se introdujo a las ratas en un cilindro de metacrilato transparente, de 20 cm de diámetro y 50 cm de altura, lleno de agua, a una temperatura controlada de 24°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), hasta una altura de 30 cm. El primer día se acondicionó a los animales a esta situación estresante. Para ello los animales se mantuvieron en este cilindro durante 15 minutos para la fase de familiarización. Al día siguiente se les realizó el propio test, para lo cual se introdujo a la rata durante 5 minutos en el agua, grabando este test para evaluar posteriormente el comportamiento del animal. Para analizar esta prueba, cada 5 segundos se determinó el comportamiento predominante dentro de ese tiempo, diferenciando entre flotar (**floating**, ausencia total de movimiento), nadar (**swimming**, movimiento tipo horizontal) y trepar (**climbing**, movimiento en vertical en torno a la pared del cilindro) y se calculó el ratio de cada uno de estos respecto del total. El agua se cambió entre cada animal, tanto en la fase de familiarización como en la de prueba. Generalmente, un mayor porcentaje correspondiente al comportamiento de tipo flotar se relacionaría con un comportamiento tipo depresivo.

**Test de campo abierto (Open Field Test, OFT):** Se colocó a las ratas en una caja de metacrilato opaco, con unas medidas de 40 cm x 40 cm y con el suelo negro, durante 10 minutos. Se contaron las entradas al centro del campo y se analizó la distancia recorrida por cada animal mediante el software EthoWatcher® (UFSC, Brasil). Esta prueba se realizó para evaluar un posible comportamiento compatible con ansiedad, así como la actividad motora de los animales.



**Figura M. 3.** Pruebas neuroconductuales realizadas. **A.** Geotaxia inversa. **B.** Reflejo de agarre. **C.** Reflejo de presión. **D.** TST. **E.** CRT. **F.** NOR. **G.** FST. **H.** OFT.

## Medida de neurotransmisores

### Obtención de muestras

Tanto una semana como un mes después del daño y tras la realización de las diferentes pruebas neuroconductuales se determinó la concentración de diversos neurotransmisores relacionados con los estados de ánimo, como es el caso de la **DA**, la **NA** o la **5-HT**.

Para ello, tanto a la edad de p14 como a la de p37, los animales fueron perfundidos con solución salina al 0,9%. Posteriormente se extrajo el cerebro, se dividió en sus dos hemisferios y se almacenó a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para garantizar el correcto mantenimiento de las muestras hasta el momento de la determinación de los neurotransmisores.

### Determinación de neurotransmisores

Para realizar la medición de los neurotransmisores mencionados se trabajó en colaboración con el grupo de la Dra. María José Casarejos en el laboratorio de Neurobiología del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, localizado en el departamento de Investigación Neurobiológica del Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España).

Esta determinación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución, también llamada cromatografía líquida de alta presión (**HPLC**) acoplada a un detector ESA coulochem. Durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en frío (hielo a  $4^{\circ}\text{C}$ ) a fin de evitar procesos de oxidación. Inicialmente se pesó el tejido, teniendo en cuenta este peso, se añadió ácido perclórico 0,4N en una proporción mg de tejido: $\mu\text{L}$  de ácido de 1:6. Posteriormente se sonicó esta mezcla para su correcta homogeneización. El sonicado obtenido se centrifugó a 11.000g, una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  y por un tiempo de 20 minutos.

Se recogió el sobrenadante y se filtró por filtros de 0,45µm de poro para evitar la presencia de partículas que pudiesen obstruir la columna del HPLC. Este sobrenadante ya filtrado se almacenó a -80°C hasta el momento de ser pasado por el HPLC. Se utilizaron las condiciones cromatográficas que se detallan a continuación: una columna (Nucleosil 5C18); la fase móvil, un tampón citrato/acetato 0,1 M, pH 3,9 con 10% de metanol, 1 mM de EDTA y 1,2 mM de ácido heptano sulfónico; y las condiciones de tensión del detector: D1 (+0,05), D2 (-0,39) y la célula de guarda (+0,40). Se analizaron los niveles relativos al hemisferio ipsilateral a la lesión. Los resultados obtenidos se expresaron en nmol/g de tejido según el pesaje inicial.

## Estado histológico a nivel microscópico

### Obtención y preparación de muestras

Para evaluar el estado histológico del tejido a nivel microscópico, los animales fueron perfundidos inicialmente con suero salino al 0,9% y posteriormente con paraformaldehído al 4% para la fijación de los tejidos. Una vez perfundido, se extrajo el cerebro de los animales y se almacenó en formaldehído al 4%, a una temperatura de 4°C y durante al menos 24 horas para asegurar la correcta fijación del mismo.

Posteriormente, el tejido se deshidrató mediante su inmersión en una batería de alcoholes de concentración creciente, comenzando con una concentración del 30% y llegando al 100% para, posteriormente, pasar a xilol y finalmente ser embebidos en parafina. Tras este último paso, se realizaron bloques de parafina con estos tejidos, los cuales fueron almacenados a temperatura ambiente hasta ser cortados al microtomo (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania).

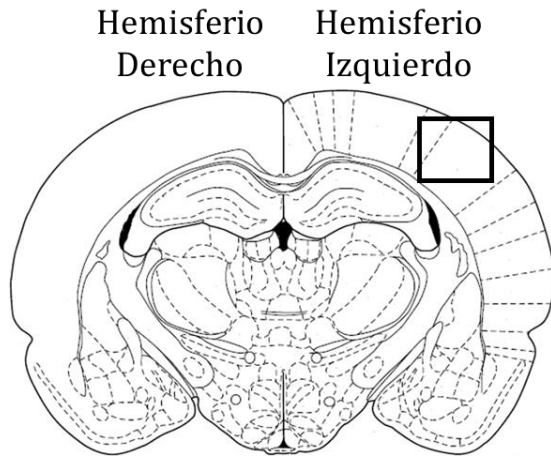
Una vez alcanzada la zona donde se localiza el de interés, los cortes al microtomo se realizaron con un grosor de 4µm. Para ello, estos bloques se mantuvieron en frío (una temperatura de no más de 4°C) hasta el momento de ser cortados. Posteriormente los cortes se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de llevar a cabo la inmunohistoquímica o la técnica de TUNEL.

### TUNEL

La técnica de marcado de final de corte por desoxiuridina trifosfato (dUTP) y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), también conocida como técnica de TUNEL por sus siglas en inglés, permitió la detección de DNA fragmentado, indicando por tanto muerte celular. Esta técnica se llevó a cabo mediante un kit comercial (Promega, WI, EE.UU) en los tejidos correspondientes a la edad p14.

Inicialmente, los cortes seleccionados fueron desparafinados dejándolos en una estufa a 60°C durante toda la noche. Una vez fundida la parafina, los tejidos se sometieron a una batería de alcoholes de concentraciones decrecientes hasta finalizar en suero salino al 0,9%, logrando así la rehidratación de las muestras. Posteriormente, los tejidos se sometieron a proteinasa K (incluida en el kit), para lograr la lisis del mismo y evitar la degradación del DNA. El marcaje se realiza utilizando la enzima TdT, así como nucleótidos marcados con un

fluoróforo, que se disuelven en un tampón de equilibrado para garantizar que la reacción se lleve a cabo de manera correcta (todos ellos presentes en el kit), estos reactivos se mantuvieron durante 1 hora a 37<sup>o</sup> sobre los tejidos. Una vez finalizado este tiempo, se paró esta reacción por inmersión en 20xSSC (presente en el kit), se realizaron lavados de los



**Figura M. 3.** Lámina representativa de los cortes utilizados para realizar la técnica de TUNEL. Recuadrada aparece la zona en la que se realizó la toma de las imágenes. Paxinos y Watson, 2013.

tejidos para eliminar el excedente y se marcaron los núcleos con TO-PRO<sup>®</sup>-3 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU). Por último, los tejidos se montaron en medio acuoso, utilizando para ello un medio de montaje comercial destinado a tal fin (Sigma Aldrich, MO, EE.UU).

Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000 versión 3.1.1.9, a un aumento de 20X y con una resolución de 1600x1600 píxeles. La toma de imágenes se realizó en la corteza parietotemporal del hemisferio izquierdo, tomando como referencia la lámina 31 del Atlas Paxinos (Paxinos & Watson, 2013) (Fig. M.3).

## Inmunohistoquímica

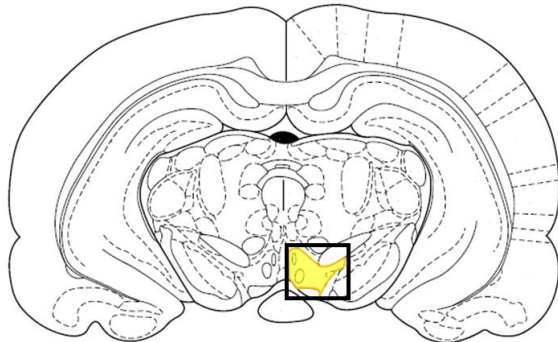
Tanto a p14 como a p37 se inmunodetectaron las células dopaminérgicas del VTA. Inicialmente los tejidos se desparafinaron dejándolos en una estufa a 60°C durante toda la noche. Al día siguiente, dichos tejidos se rehidrataron utilizando en esta ocasión una batería de alcoholes de concentraciones decrecientes. Posteriormente, se desenmascararon los epítomos mediante inmersión en tampón citrato de pH=6, en condiciones de máxima presión y temperatura, utilizando para ello una olla a presión. A fin de evitar ruido de fondo en el resultado, se realizó un bloqueo de las peroxidases endógenas utilizando una solución preparada de la siguiente manera:

<b>V final</b>	<b>5mL</b>
Metanol 100% (Merck, Darmstadt, Alemania)	500µL
Agua oxigenada 30% (ITW Reagents, IL, EE.UU)	375µL
Tampón fosfato salino (PBS) 1X	1,25mL
Agua destilada	2,875mL

Cubriendo el tejido y manteniéndolo en oscuridad durante 1 hora. Para bloquear las uniones a epítomos inespecíficos se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich, MO, EE.UU) al 5% y 0,4% de tritón (Sigma Aldrich, MO, EE.UU), cubriendo el tejido durante 30

minutos. Las neuronas dopaminérgicas se marcaron con un anticuerpo primario anti-TH (SantaCruz Biotechnology, TX, EE.UU), a una dilución 1:500 en BSA 1% al 0,4% de tritón, manteniéndolo durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

Al día siguiente, se añadió el reactivo ImmPRESS Universal Antibody Polymer Reagent (Vector Laboratories, CA, EE.UU) durante 30 minutos para marcar el anticuerpo primario con peroxidasa de rábano picante (HRP). Posteriormente, se reveló la presencia de células dopaminérgicas mediante el uso de diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories, CA, EE.UU), al reaccionar con la HRP allí donde esta se había unido.



**Figura M. 4.** Lámina representativa de los cortes utilizados para realizar la inmunohistoquímica. En amarillo se indica el VTA y recuadrada aparece la zona en la que se realizó la toma de las imágenes. Paxinos y Watson, 2013.

Se realizó una contratinción con Nissl, por inmersión en azul de toluidina al 0,5% (Sigma Aldrich, MO, EE.UU) a fin de localizar los núcleos celulares, y se deshidrató el tejido para su montaje con resina acrílica con base de xileno (DPX) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Las imágenes de estas muestras fueron obtenidas en un microscopio óptico (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania), a 10X aumentos, en el VTA izquierdo tomando como referencia la lámina 38 del Atlas Paxinos (Paxinos & Watson, 2013) (Fig. M. 4).

Se contó el número de células positivas para el anticuerpo anti-TH presentes dentro de los límites del VTA, expresándose los resultados como **células positivas/área**.

## Expresión de receptores dopaminérgicos

### Obtención y procesamiento de muestras

Tanto una semana (p14) como un mes (p37) después del daño, se obtuvieron muestras para determinar la expresión de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> y DAT. Para ello, los animales fueron perfundidos únicamente con una solución salina al 0,9%. Se extrajo el cerebro y se dividió en sus dos hemisferios, almacenándose a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

A partir de este momento, se trabajó con el hemisferio lesionado. Para procesar las muestras fue necesario realizar todo el proceso en frío, a fin de evitar el deterioro de las mismas. Inicialmente, estas fueron pesadas y se les añadieron 10mL del tampón de lisis Tissue Protein Extraction Reagent, T-PER, (BioVision, CA, EE.UU) por cada gramo de tejido. A continuación, se añadieron 10µL de inhibidor de proteasas (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU) por cada mL de T-PER. Se homogeneizó la muestra de manera mecánica y se centrifugó a 4000rpm durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Se recogió y alicuotó el sobrenadante obtenido y se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

Para realizar la cuantificación de proteínas presentes en cada muestra se realizó una recta patrón con diluciones de BSA procedente de un kit comercial destinado a tal fin (Thermo

Fisher Scientific, MA, EE.UU), a concentraciones conocidas comprendidas entre 0µg/mL y 80µg/mL. Las muestras se analizaron con su concentración real, así como diluidas 10 veces, a fin de asegurar que al menos uno de los valores se encontrara dentro de los rangos de la recta patrón. Se realizaron duplicados tanto de la recta patrón como las muestras para asegurar la validez de las mediciones. Para determinar la concentración proteica de todo esto mediante colorimetría, se añadió una solución de ácido bicinónico (BCA Working Reagent) presente en el mismo kit que la BSA, dejándolo reaccionar con la muestra, bien 30 minutos a 37°C o bien 2 horas a temperatura ambiente y en agitación, hasta obtener un color morado cuantificable como producto de esta reacción. Para dicha cuantificación, se utilizó la absorbancia de las muestras a 560nm, determinando la concentración proteica de cada muestra en función de los datos obtenidos en la recta patrón y la ecuación tipo  $y=mx+n$  asociada a la misma.

## Western blot

Se prepararon siempre 25µL de muestra por cada pocillo a cargar con la misma, a una concentración de proteínas de 1µg/µL. Para ello, partiendo de la concentración determinada de cada muestra, se calculó el volumen a coger de esta para alcanzar la concentración de 1µg/µL en el volumen final de 25µL según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración inicial} \times \text{Volumen inicial} = \text{Concentración final} \times \text{Volumen final}$$

Donde el volumen inicial es aquel que se debe coger de muestra. Una vez conocido este valor, se debe añadir TBS 1X (BioWorld, OH, EE.UU) hasta llegar a 12,5µL, ya que los otros 12,5µL restantes (hasta llegar a los 25µL deseados) deben añadirse de tampón de carga, compuesto por 50µL de β-mercaptoetanol por cada 950µL de Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, CA, EE.UU). Las muestras deben mantenerse siempre en frío excepto en el momento de su desnaturalización, que se realiza aplicándoles una temperatura de 95°C durante 10 minutos, pasándolas posteriormente de nuevo a una temperatura de 4°C.

Una vez desnaturalizadas, las muestras fueron cargadas en un gel de acrilamida al 10% (Bio-Rad, CA, EE. UU). Se añadieron también, en un pocillo de cada gel, 5µL un patrón de peso molecular (Invitrogen, MA, EE.UU). Esto se realizó en el interior de la cubeta de electroforesis, la cual estaba rellena de tampón de electroforesis 1X (Bio-Rad, CA, EE.UU). Tras finalizar de cargar las muestras se comenzó a correr la electroforesis, para conseguir la separación de las proteínas según su peso molecular, a un voltaje fijo (200v), permitiendo un amperaje variable hasta que se dejó de ver el frente de electroforesis.

Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas presentes en el gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) marca Amersham (Amersham, Reino Unido). Para ello se utilizó un sistema de transferencia trans-blot (Bio-Rad, CA, EE.UU) en presencia de tampón de transferencia 1X (Bio-Rad, CA, EE.UU). Tras realizar la transferencia, la membrana se incubó durante 1 hora con solución de bloqueo, consistente en leche al 5% en TBS-T (TBS con Tween-20 al 0,1%), a fin de bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-DAT o anti-D<sub>2</sub> ya marcados con HRP (SantaCruz Biotechnology, TX, EE.UU), ambos a una dilución 1:200 disueltos en la solución de bloqueo previamente mencionada, durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Finalizado este proceso, se realizaron lavados para limpiar el excedente de anticuerpo y se reveló la membrana usando un reactivo de quimioluminiscencia

mejorada (ECL) (Abbkine, Wuhan, China) en un revelador Syngene GBOX Chemi-XX6 (Fisher Scientific, NH, EE.UU).

Tras revelar la membrana y guardar los resultados, se levantó el anticuerpo analizado y se reincubó la membrana con un anticuerpo primario anti- $\beta$ -Actina (Sigma Aldrich, MO, EE.UU), marcador que se utilizó como control de carga de cada uno de los pocillos, ya que la expresión de esta no varía con la lesión ni con el tratamiento. Esta incubación se realizó, como en el caso de los anteriores anticuerpos, durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente y de nuevo se reveló la membrana, en el revelador previamente mencionado, obteniendo también estas imágenes.

Se analizó la intensidad de señal de cada uno de los pocillos, tanto de la proteína de interés, como de la  $\beta$ -Actina. La proteína de interés se expresó en función de la cantidad total de carga, indicada por el valor de la  $\beta$ -Actina.

## Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el software estadístico GraphPad (GraphPad Prism versión 8.0.1, GraphPad Software, CA, USA,). Los valores atípicos se identificaron mediante el método ROUD, utilizando un  $Q=1\%$ . Se utilizó la prueba de normalidad de *D'Agostino & Pearson* cuando el tamaño muestral ( $n$ ) fue igual o superior a 8 y la prueba *Shapiro-Wilk* cuando esta  $n$  fue inferior a 8, a fin comprobar la distribución gaussiana de las muestras.

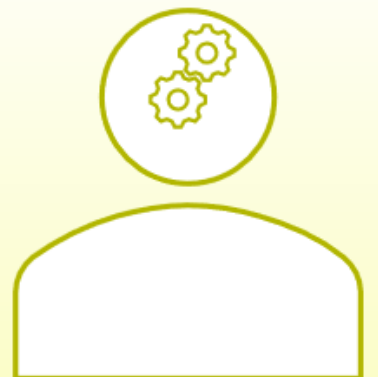
En el diseño experimental 1, al tratar únicamente con dos grupos experimentales, cuando los datos superaron la prueba de normalidad, se utilizó un *t test no pareado*, al cual se le añadió la *corrección de Welch* cuando las desviaciones estándar entre los grupos no fueron iguales, a fin de comprobar la significancia de las diferencias entre los grupos. En los casos en los cuales los datos no siguieron una distribución normal, se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* para comprobar las diferencias significativas entre los grupos. Los parámetros cualitativos se analizaron mediante la prueba de la  $\chi^2$ . Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

En el resto de los diseños experimentales, en los cuales se contaba con más de dos grupos, en los casos en los que los datos siguieron una distribución normal, los resultados se analizaron mediante una *ANOVA ordinaria de una vía* cuando las desviaciones estándar fueron similares entre los grupos, analizando las comparaciones múltiples mediante el *test de Turkey*; en caso contrario se utilizó la *ANOVA de Brown-Forsythe y Welch* y el *test de Games-Howell* para las comparaciones múltiples. Cuando los resultados no siguieron una distribución normal se utilizó el *test Kruskal-Wallis* y las comparaciones múltiples se analizaron mediante el *test de Dunn*.

Los resultados se mostraron mediante una gráfica de cajas y bigotes como mediana  $\pm$  rango intercuartílico a modo de cajas y percentiles 5 a 95 en forma de bigotes.



# RESULTADOS





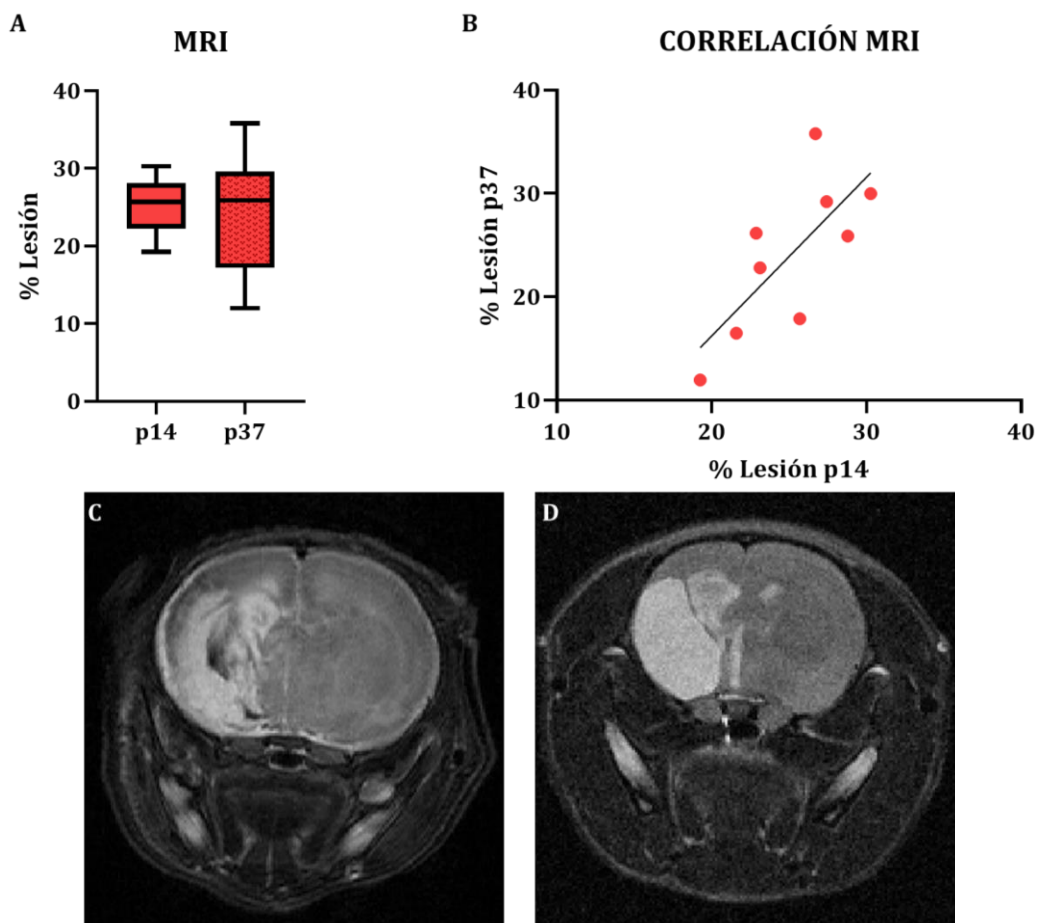
## Aclaraciones iniciales

No se observaron diferencias entre los diferentes grupos **SHAM**, por lo que, a fin de reducir el número de animales utilizados, de ganar potencia estadística y de mejorar la claridad en la presentación de los resultados, solo se muestran los datos del grupo **SHAM** tratado con vehículo, el cual fue utilizado como grupo control. Lo mismo sucedió con los grupos **VEH**.

## Reproducción del modelo de MCAO

### Determinación del daño por MRI

En primer lugar, se comprobó el establecimiento de la lesión debida a la oclusión de la arteria cerebral media, en el grupo **MCAO**, mediante imagen de resonancia magnética. Dado que previamente se ha demostrado que en el grupo **SHAM** no existen diferencias entre hemisferios ni presenta área hiperintensa, y a fin de respetar el refinamiento, ahorrando a estos animales procedimientos innecesarios, no se realizaron imágenes de resonancia magnética a este grupo **SHAM**. Se determinó la variación del porcentaje de volumen de esta lesión entre p14 y p37 (*Fig. R. 1*).

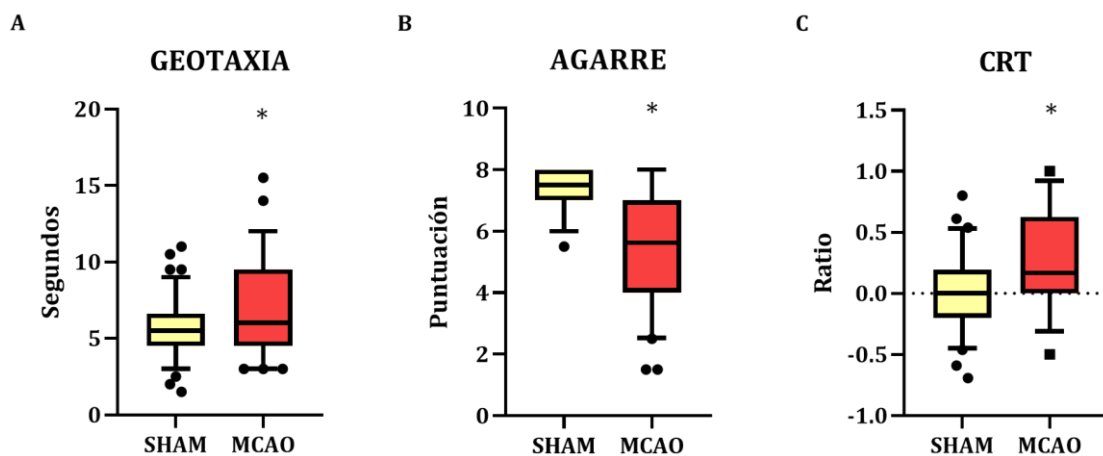


**Figura R. 1.** Determinación del daño por MRI. **A.** Diferencias en cuanto al porcentaje de volumen de lesión entre p14 y p37. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \*  $p > 0.05$ . **B.** Regresión lineal entre el porcentaje de volumen de lesión a p14 y p37,  $r$  de Pearson = 0,7377,  $p < 0.05$ . **C.** Imagen representativa de lesión a p14. **D.** Imagen representativa de lesión a p37. ( $n = 9$ ).

No se encontraron diferencias en cuanto al **porcentaje de volumen de lesión entre ambas edades**, ya que al realizar el test estadístico de *t de Student pareado* (por la distribución normal de los valores) se obtuvo un *valor de p* superior a 0,05. Este porcentaje de lesión quedó establecido entorno a un 25% del volumen de cerebro sano. Se comprobó una correlación entre el porcentaje de lesión a **p14** y aquel a **p37**, ya que el *valor de p* calculado fue inferior a 0,05. En este caso, dado que las muestras seguían una distribución normal, se calculó un *valor de r de Pearson* de 0,7377.

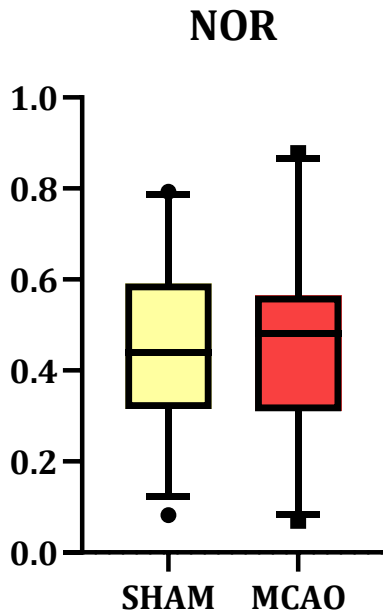
## Determinación del daño funcional

A continuación, se comprobó el alcance del daño ocasionado por el infarto en el estado funcional (*Fig. R. 2*), tanto a nivel motor como cognitivo (*Fig. R. 3*).



**Figura R. 2.** Determinación del daño funcional a nivel motor. **A.** Diferencias en el test de geotaxia inversa. **B.** Diferencias en el test de agarre. **C.** Diferencias en el test del cilindro. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \*  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n = 12-23$ ).

El grupo **MCAO** mostró un peor rendimiento cuando se evaluó su estado funcional a nivel motor comparado con el grupo **SHAM**, tanto una semana como un mes después del daño. **Una semana después** del daño los animales **MCAO** tenían afectada la coordinación motora, ya que requirieron más tiempo para darse la vuelta en el test de la **geotaxia inversa** que los animales **SHAM**, demostrado a nivel estadístico al obtener un *valor de p* inferior a 0,05 al realizar el test de *Mann-Whitney* (*Fig. R. 2. A*). A esta misma edad, el **agarre** del grupo **MCAO** también se encontraba alterado respecto al grupo **SHAM**, ya que el primero obtuvo un valor significativamente inferior que este último, comprobado mediante el test de *Mann-Whitney* y obteniendo un *valor de p* inferior a 0,05 (*Fig. R. 2. B*). **Un mes después** del infarto los animales **MCAO** mostraron la presencia de hemiparesia, con una mayor preferencia por usar la pata ipsilateral en comparación con los animales del grupo control en el **test del cilindro**, obteniendo un *valor de p* inferior a 0,05 en la prueba de la *t de Student* (*Fig. R. 2. C*).

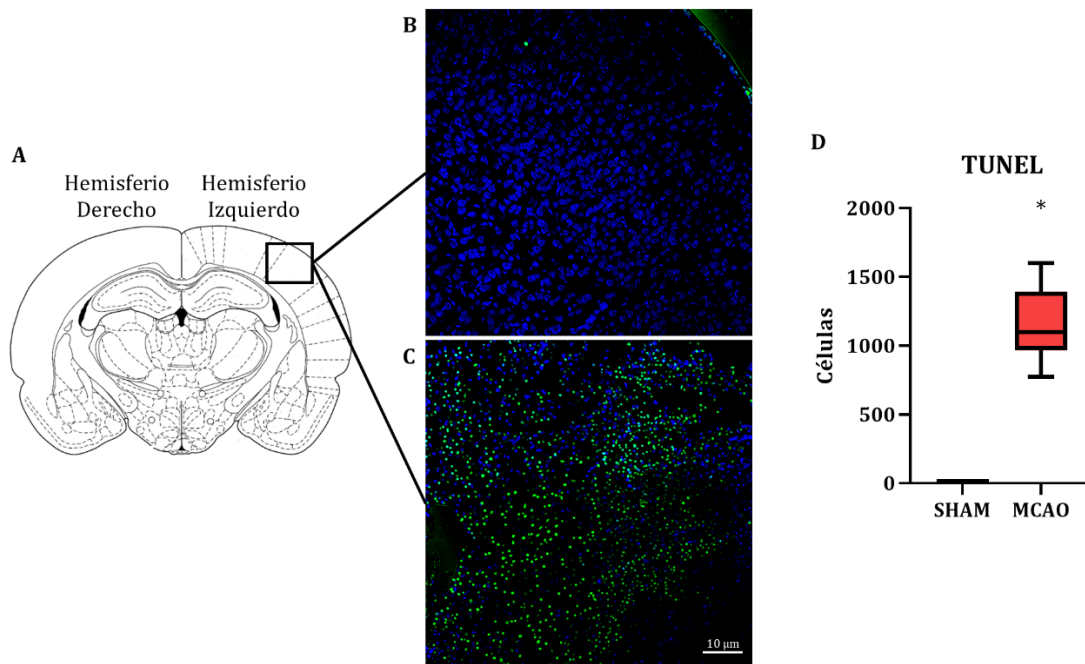


En el test **NOR**, no se encontró ninguna alteración cognitiva referida a la memoria a corto plazo en el grupo **MCAO** comparado con el grupo **SHAM**, ya que se obtuvo un *valor de p* superior a 0,05 al realizar el test estadístico de la *t de student* (Fig. R. 3).

*Figura R. 3. Determinación del daño funcional a nivel cognitivo. Resultados del test de reconocimiento de objeto nuevo. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. (n=8-11).*

### Determinación de la muerte celular mediante TUNEL

El daño histológico se confirmó mediante la técnica de TUNEL, que permitió comprobar la muerte celular en el tejido siete días después del daño isquémico (Fig. R. 4).



*Figura R. 4. Determinación del daño a nivel de muerte celular mediante la técnica de TUNEL. A. Zona del cerebro en la que se realizó la toma de las imágenes. B. Imagen representativa de las células positivas en el grupo SHAM. C. Imagen representativa de las células positivas en el grupo MCAO. D. Representación gráfica de las diferencias entre los grupos SHAM y MCAO. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. (n=6-8).*

Se comprobó un aumento de la celularidad **TUNEL** positiva una semana después del daño, en el grupo **MCAO**, en comparación con la encontrada en el grupo control. Las imágenes se realizaron en la zona de perilesión encontrada en la corteza parietotemporal de la lámina

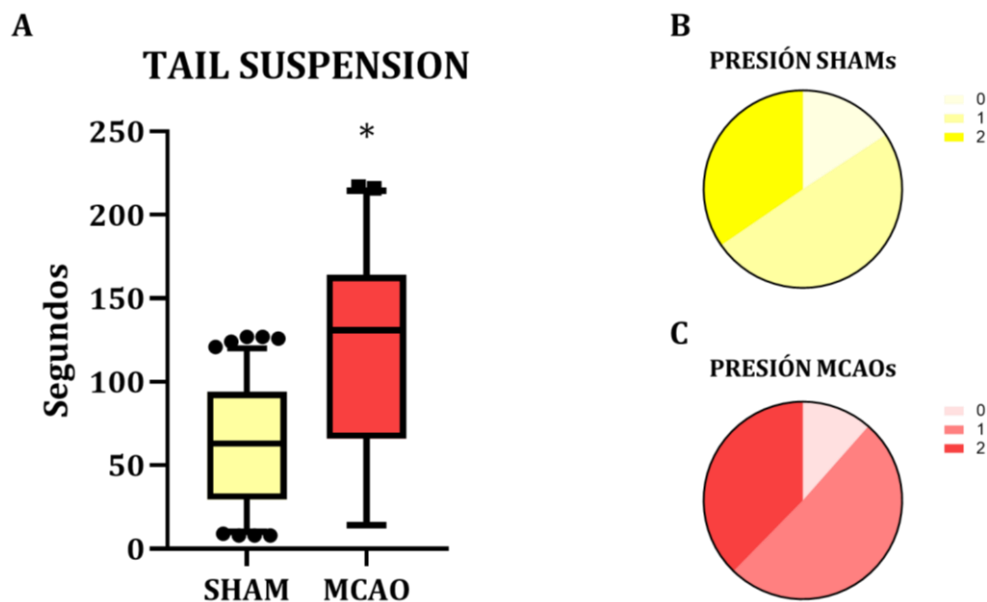
31 del Paxinos (Fig. R. 4. A.). El resultado del grupo **MCAO** fue significativamente superior que el del grupo **SHAM**, arrojando un *valor de p* inferior a 0,05 en el test estadístico de *Mann-Whitney* (Fig. 4. D).

Se demostró, por tanto, la correcta reproducción del modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas de entre 7 y 10 días de edad. Se demostró también la aparición de los daños característicos asociados a este modelo. Este daño se comprobó al comparar los resultados del grupo **MCAO** con el grupo **SHAM** a distintos niveles. A nivel macroscópico, mediante MRI, tanto una semana como un mes después de la lesión. Se demostró también como el porcentaje de lesión ya había quedado establecido una semana después de producirse la oclusión de la arteria, sin existir variaciones en dicho porcentaje un mes después del daño. Estas alteraciones se comprobaron también a nivel funcional, ya que se encontraron déficits motores tanto una semana como un mes después de la lesión. Sin embargo, no se encontraron alteraciones cognitivas referidas a la memoria a corto plazo. Finalmente, el daño quedó demostrado a nivel celular, donde se observó un aumento en la muerte de estas células una semana después de la lesión.

## Alteraciones del estado de ánimo

### Alteraciones neuroconductuales

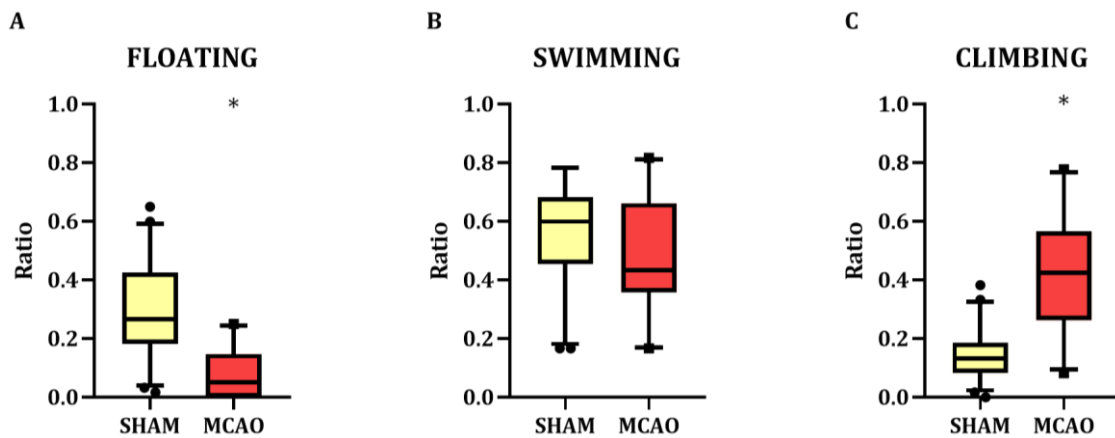
Se comprobó la presencia de alteraciones neuroconductuales asociadas al estado de ánimo tanto una semana (Fig. R. 5) como un mes después del infarto (Fig. R. 6 y Fig. R. 7).



**Figura R. 5.** Determinación de las alteraciones neuroconductuales del estado de ánimo. **A.** Representación gráfica del tiempo de inmovilidad en el TST. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* *valor de p* < 0,05 respecto al grupo SHAM. **B.** Distribución de los resultados del grupo SHAM en el test de presión. **C.** Distribución de los resultados del grupo MCAO en el test de presión. (n=18-23).

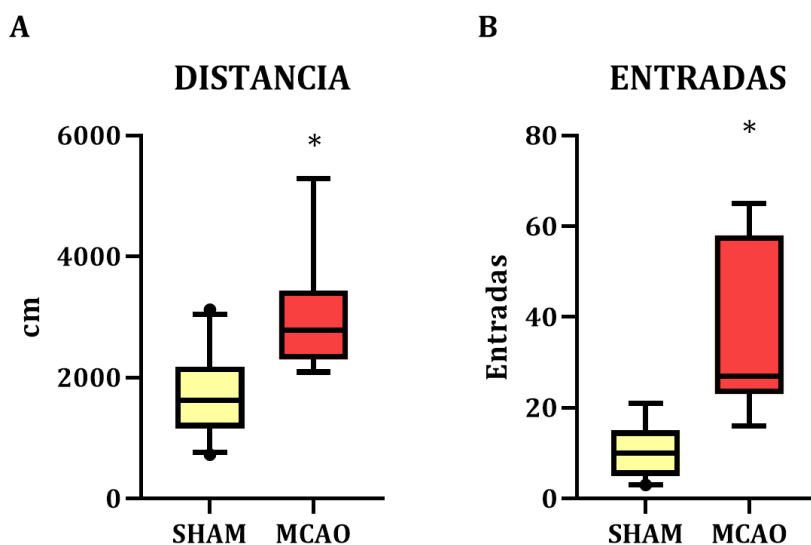
Una semana después del daño los animales lesionados mostraron un comportamiento tipo depresivo en el TST, ya que el grupo **MCAO** obtuvo un resultado de mayor tiempo de

inmovilidad que el grupo **SHAM**, demostrado al arrojar un *valor de p* inferior a 0,05 al realizar el test de *Mann-Whitney* (Fig. R. 5. A). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre ambos grupos en la prueba de **presión**, al ser evaluada de forma estadística mediante el test  $\chi^2$ , lo cual indicaría la no afectación del motor grueso (Fig. R. 5. B y Fig. R. 5. C).



**Figura R. 6.** Resultados de los diferentes tipos de comportamiento mostrados en el FST. **A.** Resultados relativos al comportamiento de tipo flotar. **B.** Resultados relativos al comportamiento de tipo nadar. **C.** Resultados relativos al comportamiento de tipo trepar. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=12-15$ ).

Un mes después de la lesión no se observó un comportamiento tipo depresivo en los animales **MCAO** asociado al FST, ya que este grupo **MCAO** no obtuvo una mayor ratio de **flotación** que el grupo **SHAM**, sino que, por el contrario, esta ratio fue significativamente menor en los animales lesionados que en los controles, confirmado por un *valor de p* inferior a 0,05 en la prueba *t de Welch* (Fig. R. 6. A). Por otro lado, no se encontraron diferencias entre grupos en cuanto al comportamiento de tipo **nadar**, arrojando un *valor de p* superior a 0,05 al ser comparados mediante el estadístico *t de Student* (Fig. R. 6. B). Finalmente, respecto al comportamiento de tipo **trepar**, se observó una mayor actividad de este tipo en los animales del grupo **MCAO** que en aquellos del grupo **SHAM**, confirmada por un *valor de p* inferior a 0,05 al analizar estas diferencias mediante el test *t de Welch* (Fig. R. 6. C).



**Figura R. 7.** Resultados relativos al OFT. **A.** Distancia recorrida durante la prueba. **B.** Número de entradas al centro de la arena a lo largo de la prueba. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=12-15$ ).

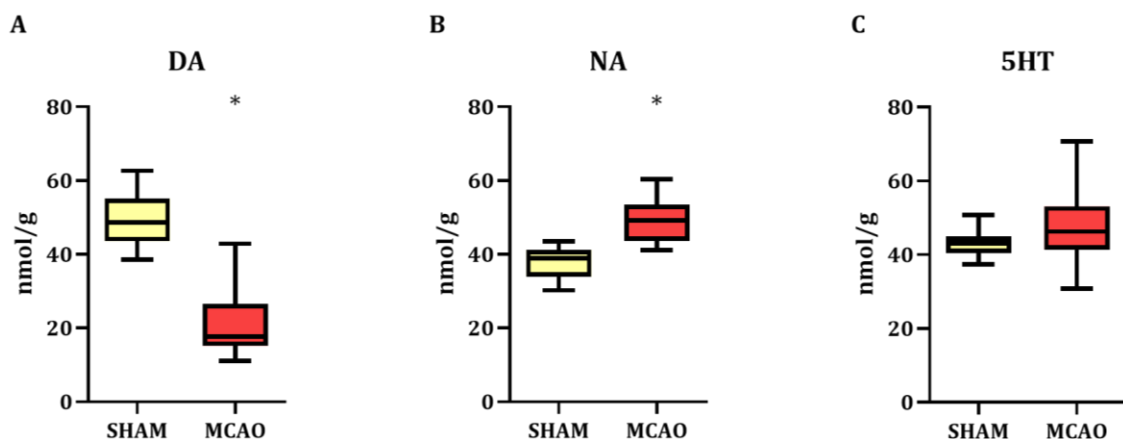
En cuanto al OFT, realizado un mes después del infarto, se obtuvo una movilidad aumentada por parte de los animales pertenecientes al grupo **MCAO** con respecto a aquellos del grupo **SHAM**, ya que este primer grupo presentó una mayor **distancia** recorrida, confirmada por un *valor de p* superior a 0,05 al analizar las diferencias mediante el test de *Mann-Whitney* (Fig. R. 7. A).

Por otro lado, en este **OFT**, se comprobó un mayor **número de entradas** al centro de la arena por parte del grupo **MCAO** en comparación con el grupo **SHAM**. Por tanto, el grupo **MCAO** no presentó un comportamiento acorde a un estado de ansiedad, el cual estaría relacionado con un menor número de entradas al centro de la arena que el grupo control. Los resultados fueron comprobados estadísticamente mediante el test *t de Welch*, arrojando un *valor de p* inferior a 0,05 al comparar ambos grupos (Fig. R. 7. B).

En resumen, se encontraron alteraciones del estado anímico a ambas edades, siendo estas en forma de comportamiento tipo depresivo a p14, y tipo hiperactivo a p37.

## Alteraciones moleculares

Los niveles de los neurotransmisores principalmente implicados en los trastornos de los estados de ánimo (DA, NA y 5-HT), del se analizaron en el hemisferio ipsilateral a la lesión mediante HPLC tanto una semana (Fig. R. 8) como un mes (Fig. R. 9) después del infarto.

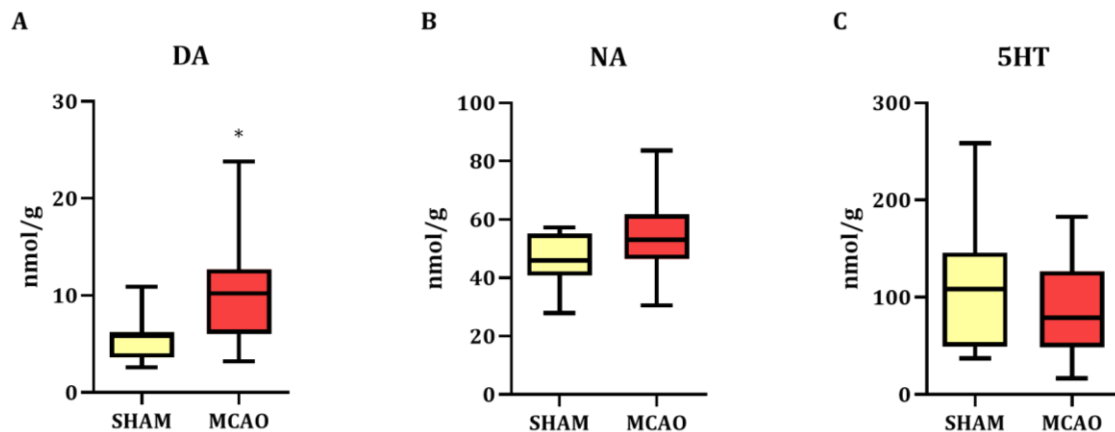


**Figura R. 8.** Niveles de neurotransmisores a p14. **A.** Niveles de DA. **B.** Niveles de NA. **C.** Niveles de 5-HT. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* *valor de p* < 0,05 respecto al grupo SHAM. (*n*=14).

**Una semana después del daño**, los niveles de **DA** estaban significativamente reducidos en el hemisferio izquierdo de los animales pertenecientes al grupo **MCAO** respecto a aquellos del grupo **SHAM** (Fig. R. 8. A), comprobándose al obtener un *valor de p* inferior a 0,05 en el test estadístico de *Mann-Whitney*. Por su parte, la **NA** mostró unos niveles aumentados en los animales pertenecientes al grupo **MCAO** (Fig. R. 8. B), siendo el *valor de p* obtenido al realizar el estadístico *t de Welch* inferior a 0,05. No se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de **5-HT** entre ambos grupos analizados, arrojando un *valor de p* superior a 0,05 al realizar en análisis de la *t de Welch* (Fig. R. 8. C).

**Un mes después de la lesión**, el grupo **MCAO** presentó unos niveles de **DA** en el hemisferio izquierdo superiores a los del grupo **SHAM**, diferencias consideradas significativas al obtener un *valor de p* inferior a 0,05 cuando fueron comparadas estadísticamente mediante

el test *t de Welch* (Fig. R. 9. A). Este neurotransmisor fue el único que se encontró alterado a p37, ya que no se obtuvieron diferencias significativas relativas a la **NA** ni a la **5-HT** cuando los resultados de los grupos **MCAO** y **SHAM** fueron comparados (Fig. R. 9. B y Fig. R. 9. C). Estos resultados fueron analizados mediante el test de la *t de Student*, obteniendo en ambos casos un *valor de p* superior a 0,05.



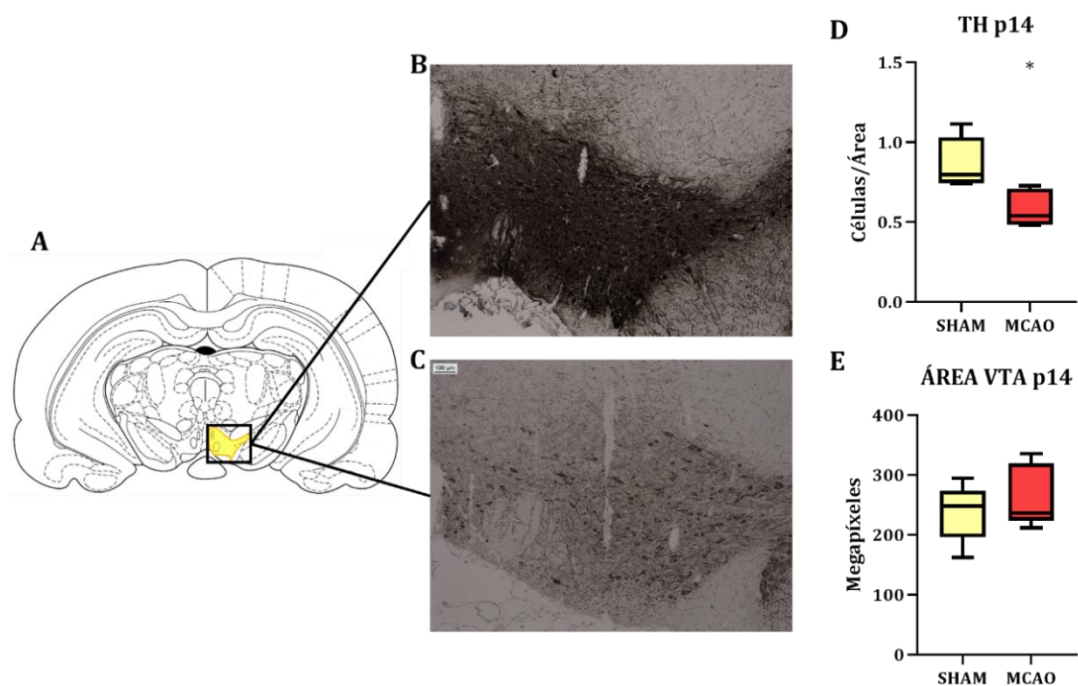
**Figura R. 9.** Niveles de neurotransmisores a p37. **A.** Niveles de DA. **B.** Niveles de NA. **C.** Niveles de 5-HT. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* *valor de p* < 0,05 respecto al grupo SHAM. (n=10-15).

Por tanto, se encontró una alteración de la DA a ambas edades, hallándose disminuida una semana después del infarto, pero aumentada un mes después del mismo en el grupo lesionado respecto al grupo control. La NA solo se encontró alterada una semana después del daño, apareciendo los niveles de la misma aumentados en el grupo **MCAO** con respecto al grupo **SHAM**. Por último, la 5-HT no se encontró alterada por el infarto en ninguno de los dos tiempos analizados, ya que no se hallaron diferencias significativas respecto a este neurotransmisor en el grupo **MCAO** comparado con el **SHAM**.

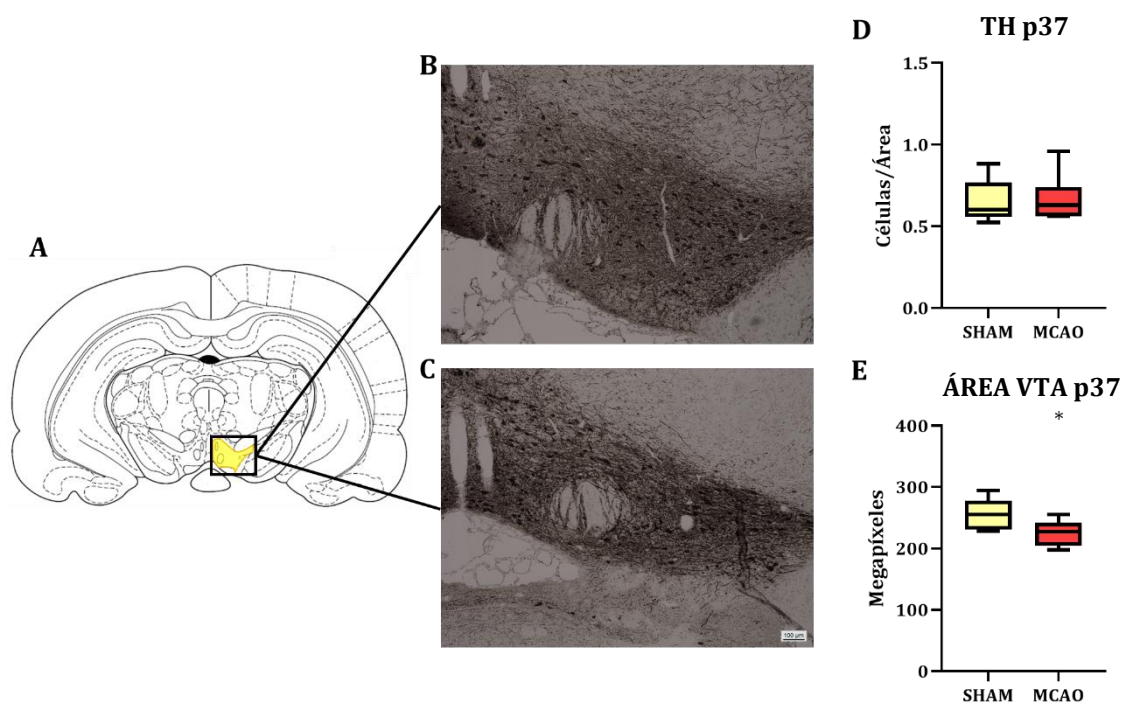
## Alteraciones histológicas

A fin de comprobar el estado del tejido, concretamente de un núcleo determinante en la síntesis de DA, neurotransmisor afectado en esta patología, se realizó un marcaje de las neuronas dopaminérgicas. Concretamente, este análisis se realizó en el VTA del hemisferio izquierdo, aproximadamente en el corte correspondiente a la lámina 38 del Paxinos, mediante un anticuerpo anti-TH (enzima implicada en la síntesis de dicha DA). Este estudio, de nuevo, se realizó tanto una semana (Fig. R. 10) como un mes (Fig. R. 11) después del infarto.

**Una semana después** del daño, se observó una reducción en la **densidad de neuronas dopaminérgicas** en el grupo **MCAO** respecto a la encontrada en el grupo **SHAM**, como se comprobó tras el conteo de células positivas para TH en el VTA del hemisferio izquierdo. Estos resultados fueron corroborados por un *valor de p* inferior a 0,05 según el estadístico *t de Student* (Fig. R. 10. D). Sin embargo, en este mismo punto temporal, no se comprobaron diferencias en cuanto al **tamaño** del VTA entre grupos (Fig. R. 10. E), el *valor de p* asociado al test *t de Student* fue superior a 0,05.



**Figura R. 10.** Análisis histológico mediante inmunohistoquímica a p14. **A.** Zona en la que se realizó la toma de las imágenes. **B.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo SHAM. **C.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo MCAO. **D.** Diferencias entre SHAM y MCAO en cuanto a la densidad de neuronas dopaminérgicas. **E.** Diferencias en cuanto al área del VTA entre grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=5$ ).



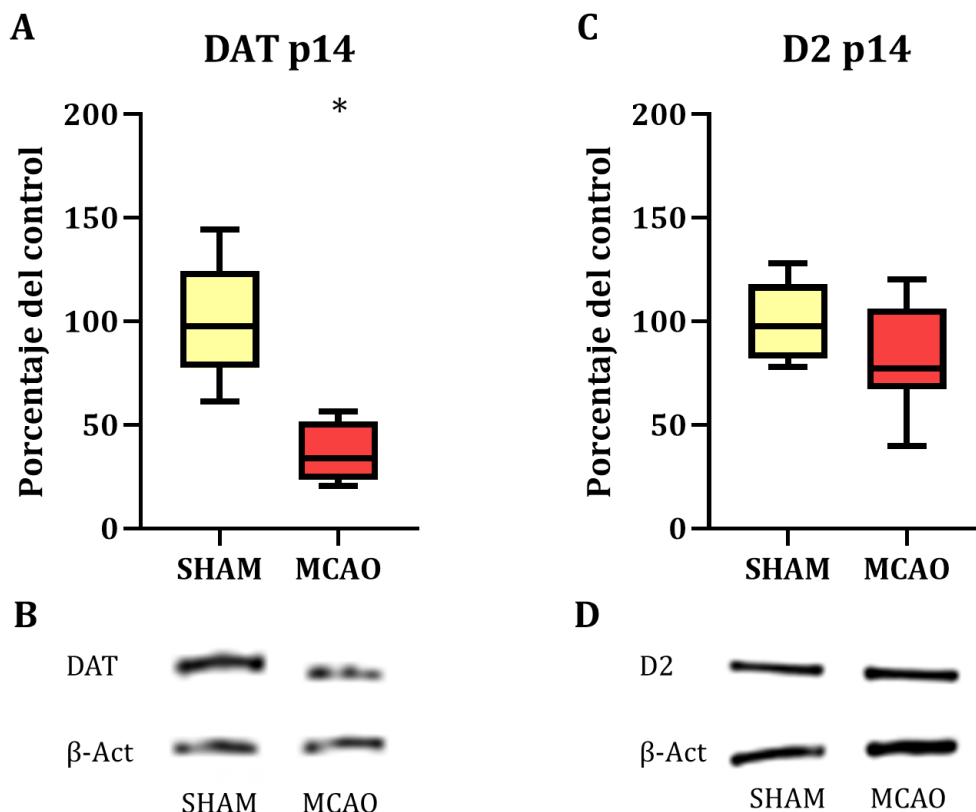
**Figura R. 11.** Análisis histológico mediante inmunohistoquímica a p37. **A.** Zona en la que se realizó la toma de las imágenes. **B.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo SHAM. **C.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo MCAO. **D.** Diferencias entre SHAM y MCAO en cuanto a la densidad de neuronas dopaminérgicas. **E.** Diferencias en cuanto al área del VTA entre grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=6-9$ ).

Un mes después de la lesión no se encontraron diferencias entre los grupos **MCAO** y **SHAM** en cuanto a la **densidad de neuronas dopaminérgicas** en el VTA. Estos datos se analizaron mediante el test estadístico de *Mann-Whitney* arrojando un *valor de p* superior a 0,05 (*Fig. R. 11. D*). Respecto al **tamaño** del núcleo, se observó un menor tamaño del VTA en el grupo **MCAO** respecto al del grupo **SHAM**, siendo inferior a 0,05 el resultado del *valor de p* obtenido en la prueba estadística *t de Student* (*Fig. R. 11. E*).

En resumen, en el análisis histológico mediante inmunohistoquímica se observó una reducción en la densidad de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental del hemisferio izquierdo asociada a la lesión una semana después de esta, ya que los resultados del grupo **MCAO** fueron menores que los del grupo **SHAM**. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia en cuanto a la densidad de estas neuronas dopaminérgicas cuando el estudio se realizó un mes después del infarto. En cuanto a lo relativo al tamaño del VTA del hemisferio izquierdo, no se encontraron diferencias entre grupos una semana después del daño, pero estas sí fueron apreciables un mes después del daño, momento en el que el grupo **MCAO** mostró un tamaño inferior de este núcleo que el grupo **SHAM**.

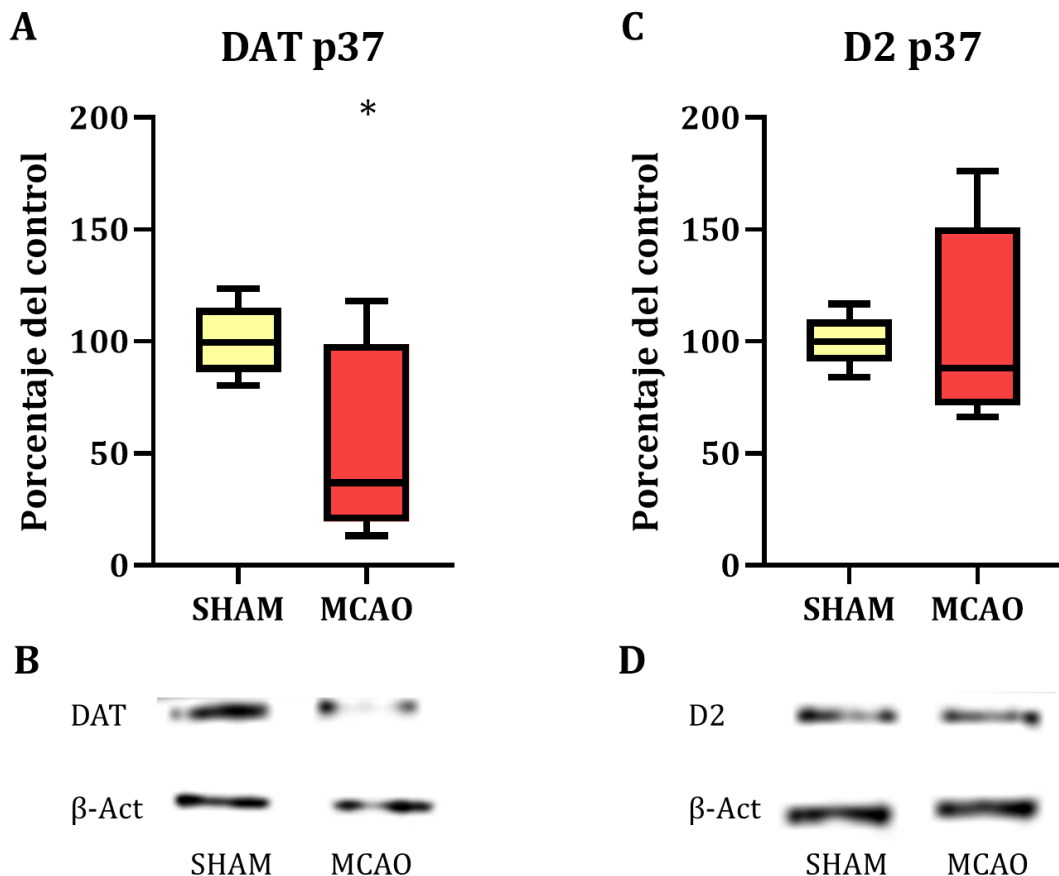
### Alteración de receptores

Se cuantificó la expresión de los receptores dopaminérgicos DAT y D<sub>2</sub> tanto a p14 (*Fig. R. 12*) como a p37 (*Fig. R. 13*).



**Figura R. 12.** Análisis de la expresión de los receptores mediante WB a p14. **A.** Diferencias entre SHAM y MCAO en cuanto a la expresión de DAT. **B.** Imagen representativa de la expresión de DAT y  $\beta$ -Actina en ambos grupos. **C.** Diferencias entre SHAM y MCAO en cuanto a la expresión de D2. **D.** Imagen representativa de la expresión de D2 y  $\beta$ -Actina en ambos grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=7-8$ ).

Una semana después del daño se halló una alteración en la expresión del receptor **DAT** asociada a la lesión. El grupo **MCAO** mostró una disminución significativa respecto al grupo **SHAM** en la expresión del DAT, analizado mediante la técnica de western blot (WB) (Fig. R. 12. A). Las diferencias entre ambos grupos se analizaron mediante una prueba *t de Student* despareada, siendo significativas al alcanzar un *valor de p* inferior a 0,05. Por su parte, la expresión del receptor de DA **D<sub>2</sub>** no se encontró alterada, ya que no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos analizados al ser comparados estadísticamente mediante *t de Student* y obtener un *valor de p* mayor que 0,05 (Fig. R. 12. C).



**Figura R. 13.** Análisis de la expresión de los receptores mediante WB a p37. **A.** Diferencias entre SHAM y MCAO en cuanto a la expresión de DAT. **B.** Imagen representativa de la expresión de DAT y  $\beta$ -Actina en ambos grupos. **C.** Diferencias entre SHAM y MCAO en cuanto a la expresión de D2. **D.** Imagen representativa de la expresión de D2 y  $\beta$ -Actina en ambos grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=7-10$ ).

Un mes después de la lesión también se comprobaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a la expresión del receptor **DAT**, obteniendo los animales **MCAO** valores de nuevo inferiores a aquellos pertenecientes al grupo **SHAM**. La comparación mediante el estadístico *t de Student* arrojó un *valor de p* inferior a 0,05 (Fig. R. 13. A). En lo relativo a la expresión del receptor de DA **D<sub>2</sub>** a esta edad, tampoco se hallaron diferencias entre el grupo **MCAO** y el grupo **SHAM**, ya que al analizar estas estadísticamente mediante *t de Student* el *valor de p* obtenido fue superior a 0,05 (Fig. R. 13. C).

Por tanto, en cuanto a la expresión de estos receptores implicados en la vía dopaminérgica, se encontró una alteración relativa a DAT una semana después del infarto isquémico, edad

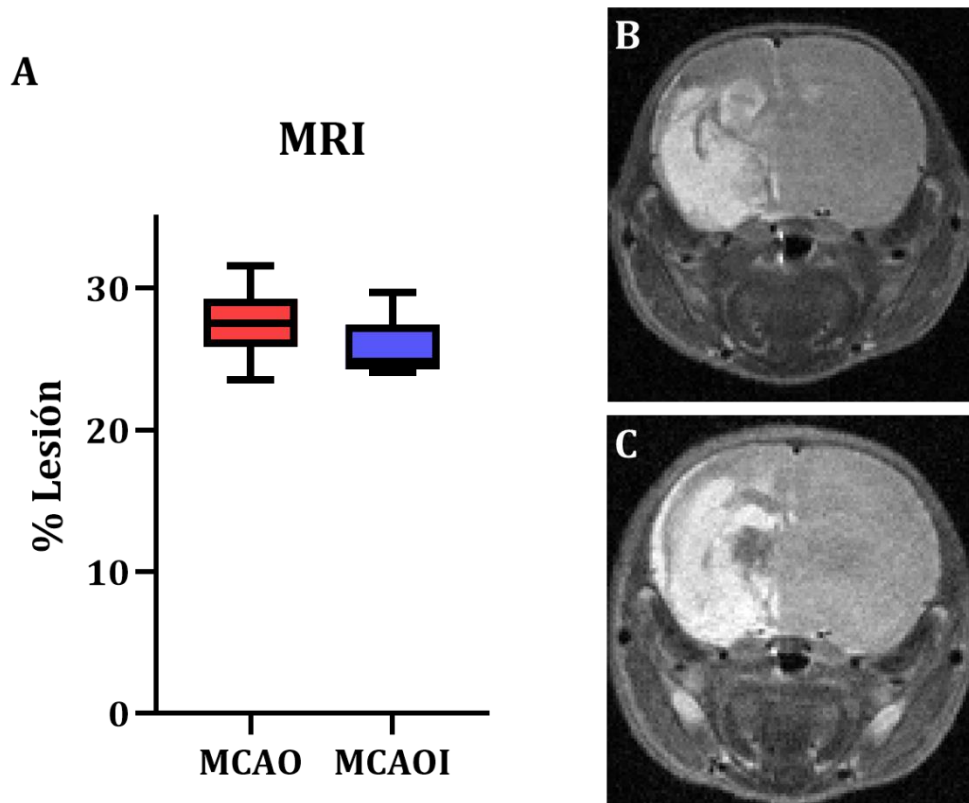
en la que la expresión de este receptor apareció disminuida en el grupo lesionado respecto al grupo control. Un mes después del daño, esta alteración en cuanto al receptor DAT continuó siendo apreciable entre ambos grupos, encontrando los niveles de expresión de este transportador nuevamente reducidos en relación al infarto. La expresión de D<sub>2</sub> no apareció alterada en ninguno de los puntos temporales estudiados.

Por tanto, de manera general, una semana después de la lesión se encontraron alteraciones neuroconductuales compatibles con un estado depresivo, así como una reducción en los niveles de DA y en la densidad de neuronas dopaminérgicas en el VTA, sin verse alterado el tamaño de este núcleo, así como un descenso de la expresión del DAT, pero no de D<sub>2</sub>. Por otro lado, a esta edad también se encontró un aumento en los niveles de NA y ninguna alteración relativa a la 5-HT. En cuanto a estos mismos parámetros un mes después de la lesión, se encontró un cuadro de hiperactividad en las pruebas neuroconductuales, un aumento en los niveles de DA y un descenso en el tamaño del VTA sin verse comprometida la densidad de neuronas dopaminérgicas en el mismo. De nuevo, se encontró una disminución en la expresión de DAT, pero ninguna diferencia en cuanto a D<sub>2</sub>. Finalmente, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de NA y 5-HT analizados.

## Efecto de un inhibidor de la recaptación de DA en el daño isquémico

### Efecto sobre el daño a nivel macroscópico

Se evaluó el posible efecto del inhibidor de la recaptación de DA, GBR 12909 dihidrocloruro, sobre el daño provocado por la lesión a nivel macroscópico. Para ello se realizó a estos animales la técnica de MRI una semana después del daño (*Fig. R. 14*).



**Figura R. 14.** Efecto del cannabidiol en el daño macroscópico por MRI. **A.** Diferencias entre los grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. **B.** Imagen representativa de la lesión del grupo MCAO. **C.** Imagen representativa de la lesión del grupo MCAOI. (n=5-14).

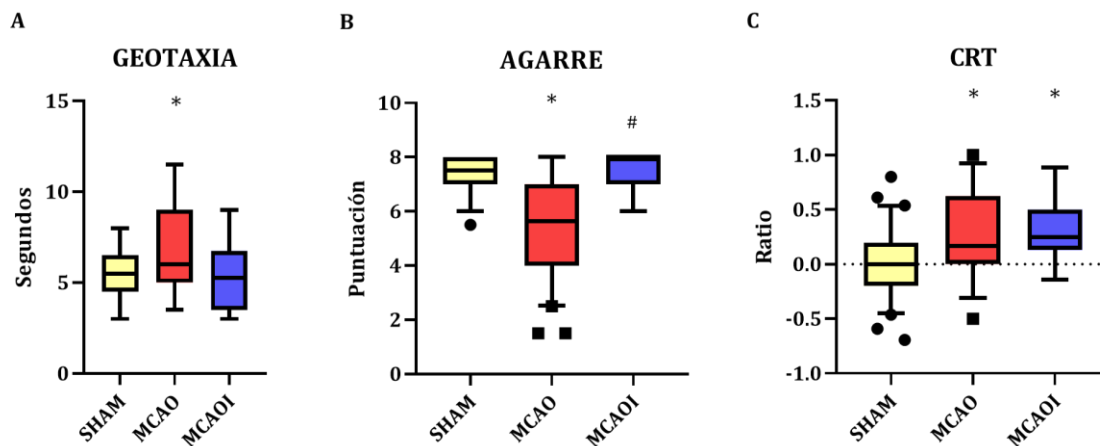
El grupo tratado con GBR 12909 (**MCAOI**) no mostró diferencias respecto al grupo al que exclusivamente se le administró vehículo (*Fig. R. 14. A*) en el volumen de lesión valorado por MRI. Las diferencias entre grupos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de *Mann-Whitney*, siendo significativas aquellas comparaciones con un *valor de p* superior a 0,05.

### Efecto sobre el daño funcional

A continuación, se evaluó el efecto del inhibidor GBR 12909 sobre el daño provocado por el infarto isquémico a nivel funcional, tanto una semana (*Fig. R. 15. A* y *Fig. R. 15. B*) como un mes después de la lesión (*Fig. R. 15. C*).

**Una semana después** del daño se evaluó el efecto sobre el daño a nivel motor mediante el test de la **geotaxia inversa**, en el que el GBR 12909 evitó la alteración de coordinación

observada en los animales MCAO tratados con vehículo. Por tanto, en esta prueba, el grupo **MCAO** fue el único que tardó más tiempo que el control en darse la vuelta, mostrando una peor coordinación motora. Estas diferencias fueron analizadas según el test de *Kruskal-Wallis*, siendo significativas al obtener un *valor de p* inferior a 0,05 (*Fig. R. 15. A*). En cuanto al test de **agarre**, al aplicar GBR 12909 se obtuvo una reversión completa de la alteración en esta prueba, puesto que estos animales mostraron valores superiores al grupo **MCAO**, pero no mostraron diferencias respecto al grupo **SHAM**. De nuevo, estas diferencias fueron analizadas mediante un test de *Kruskal-Wallis*, aceptando como significativas aquellas comparaciones entre grupos que obtuvieron un *valor de p* inferior a 0,05 (*Fig. R. 15. B*).



**Figura R. 15.** Efecto de los distintos tratamientos sobre el daño funcional a nivel motor. **A.** Diferencias en el test de geotaxia inversa. **B.** Diferencias en el test de agarre. **C.** Diferencias en el test del cilindro. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. ( $n=8-23$ ).

**Un mes después del daño**, en cuanto a la hemiparesia provocada por la lesión y comprobada en la **prueba del cilindro**, se observó que el grupo tratado con el inhibidor de la recaptación de DA (**MCAOI**) obtuvo unos resultados similares a los del grupo **MCAO**, sin mostrar diferencias con el grupo **SHAM**, indicando la ineficacia de este tratamiento en cuanto a la hemiparesia asociada al infarto isquémico. Dada la distribución normal de los resultados de los diferentes grupos, se utilizó una *ANOVA de una vía* para analizar las diferencias entre los mismos, aceptando aquellas con un *valor de p* inferior a 0,05 (*Fig. R. 15. C*).

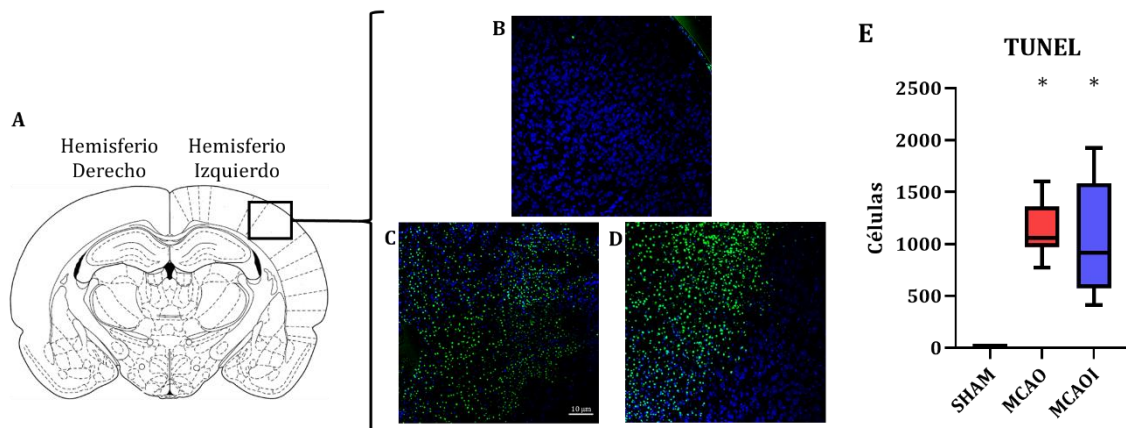
Por tanto, el tratamiento con GBR 12909 mostró eficacia en ambas pruebas neuroconductuales motoras realizadas a p14, principalmente en cuanto al agarre, sin lograr ningún efecto en cuanto a la hemiparesia asociada a la lesión a la edad de p37.

## Efecto sobre la muerte celular

Finalmente, el papel de este inhibidor sobre el daño isquémico se determinó observando su efecto sobre la muerte celular, mediante la técnica de TUNEL, una semana después de la oclusión (*Fig. R. 16*).

Mediante esta técnica de **TUNEL una semana después** del daño, se comprobó que el grupo tratado con GBR12909, **MCAOI**, no mostró diferencias respecto al grupo **MCAO**, y sí mostró una cantidad aumentada de células positivas para este indicador de muerte celular respecto

al grupo **SHAM**, dando a entender, por tanto, que el tratamiento con GBR 12909 no propició ningún efecto en cuanto a este daño (*Fig. R. 16. E*). Los datos se analizaron mediante el test de *Kruskal-Wallis* y solo aquellas diferencias con un *valor de p* inferior a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

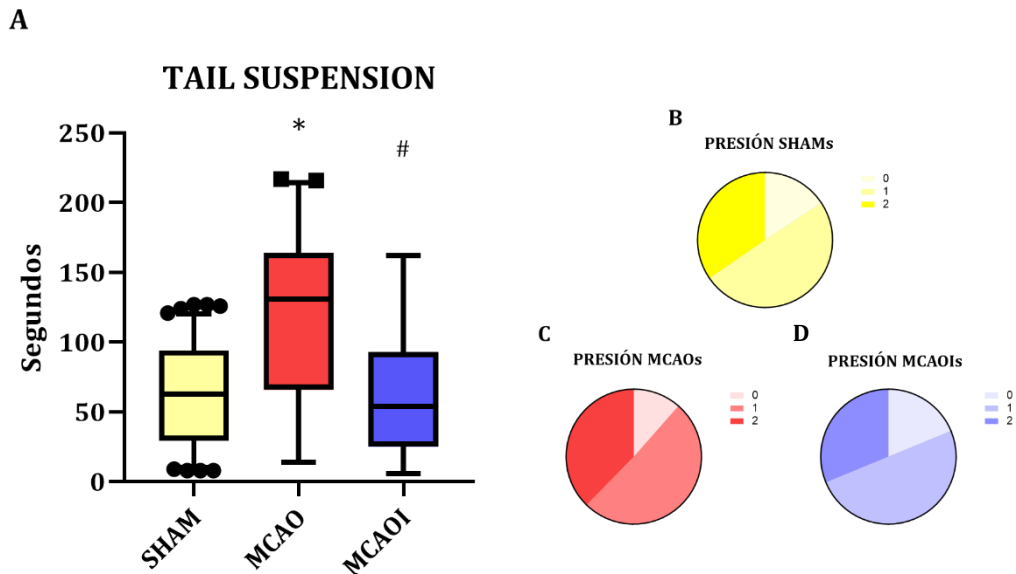


Por tanto, de manera general, la administración exclusivamente con GBR 12909 solo mostró un efecto sobre el daño secundario al infarto cerebral al analizar el comportamiento motor a la edad de p14, pero no lo hizo en el resto de las características evaluadas.

## Efecto de un inhibidor de la recaptación de DA en el estado de ánimo

### Efecto sobre las alteraciones neuroconductuales

Se realizó un estudio acerca del efecto de este inhibidor de la recaptación de DA sobre las alteraciones neuroconductuales relativas al estado anímico, tanto una semana (Fig. R. 17) como un mes (Fig. R. 18 y Fig. R. 19) después de la lesión.

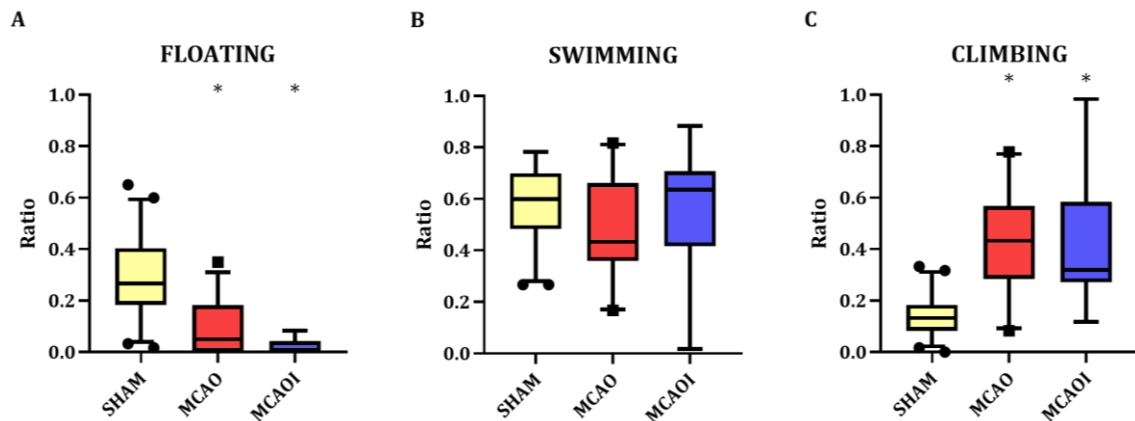


**Figura R. 17.** Efecto de los distintos tratamientos sobre las alteraciones neuroconductuales del estado de ánimo. **A.** Representación gráfica del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. **B.** Distribución de los resultados del grupo SHAM en el test de presión. **C.** Distribución de los resultados del grupo MCAO en el test de presión. **D.** Distribución de los resultados del grupo MCAOI en el test de presión. ( $n=15-23$ ).

**Una semana después** de la lesión, mediante el TST, se comprobó cómo el grupo **MCAOI** mostró una reversión del comportamiento tipo depresivo, representado en esta prueba como un mayor tiempo de inmovilidad, evidenciando una disminución del tiempo de inmovilidad respecto al grupo **MCAO**, igualando sus resultados a los obtenidos por parte del grupo **SHAM**, (Fig. R. 17. A). Estas diferencias se calcularon mediante el análisis de *Kruskal-Wallis*, siendo significativas si el *valor de p* obtenido era inferior a 0,05. Al comprobar el estado del motor grosero mediante la prueba de **presión** a esta misma edad, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en cuando a la distribución de los resultados mediante el estadístico  $\chi^2$  (Fig. R. 17. B, Fig. R. 17. C, Fig. R. 17. D).

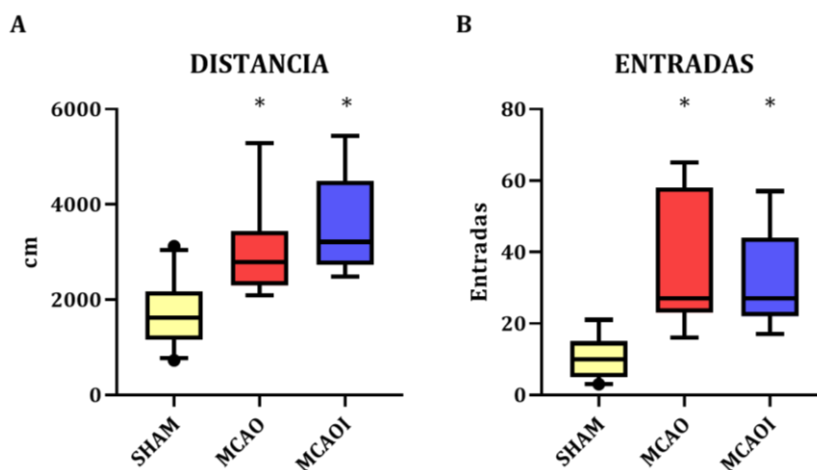
**Un mes después** del daño, en el FST, no se encontró ningún efecto de la administración de GBR 12909 en cuanto al comportamiento de tipo **flotar** ya que los animales **MCAOI** no mostraron diferencias respecto al grupo **MCAO**, pero sí una reducción de este tipo de comportamiento respecto al grupo **SHAM** (Fig. R. 18. A). Las diferencias respecto a este comportamiento se analizaron mediante la prueba de *Kruskal-Wallis*, y se consideraron significativas siempre que el *valor de p* fuese inferior a 0,05. En cuanto a la actividad de **nadar**, en este mismo test, no se encontraron diferencias entre los grupos sometidos a

estudio, en las comparativas realizadas mediante *ANOVA de una vía* ningún valor de  $p$  se encontró por debajo de 0,05 (Fig. R. 18. B). Por último, en el comportamiento de tipo **trepar**, el GBR 12909 no fue capaz de producir ninguna modificación. El grupo **MCAOI** mostró los mismos resultados que el grupo **MCAO**, no existiendo diferencias entre ellos, pero sí de ambos respecto al **SHAM** (Fig. R. 18. C). El análisis de estas diferencias se llevó a cabo mediante la prueba *ANOVA de Brown-Forsythe y Welch* y fueron consideradas significativas con un valor de  $p$  inferior a 0,05.



**Figura R. 18.** Efecto de los distintos tratamientos sobre los diferentes tipos de comportamiento mostrados en el FST. **A.** Resultados relativos al comportamiento de tipo flotar. **B.** Resultados relativos al comportamiento de tipo nadar. **C.** Resultados relativos al comportamiento de tipo trepar. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=8-15$ ).

En el **OFT**, realizado también **un mes después** del daño, el grupo al cual se administró GBR 12909 (**MCAOI**) no mostró diferencias respecto al grupo **MCAO**, pero sí un aumento en dicha distancia respecto al grupo **SHAM**, cuando estos grupos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de *Kruskal-Wallis*, considerando significativas las diferencias con un valor de  $p$  inferior a 0,05 (Fig. R. 19. A). En cuanto al análisis de las **entradas** al centro de la arena en este mismo test, se halló un resultado similar al de la distancia. Los animales pertenecientes al grupo **MCAOI** obtuvieron un mayor número de entradas que aquellos pertenecientes al grupo **SHAM**, sin mostrar diferencias con los del grupo **MCAO** (Fig. R. 19. B). Por tanto, no se encontró ningún efecto asociado al tratamiento con GBR 12909. Estas comparaciones se realizaron mediante el estadístico *Kruskal-Wallis* y fueron consideradas diferencias significativas aquellas con un valor de  $p$  inferior a 0,05.



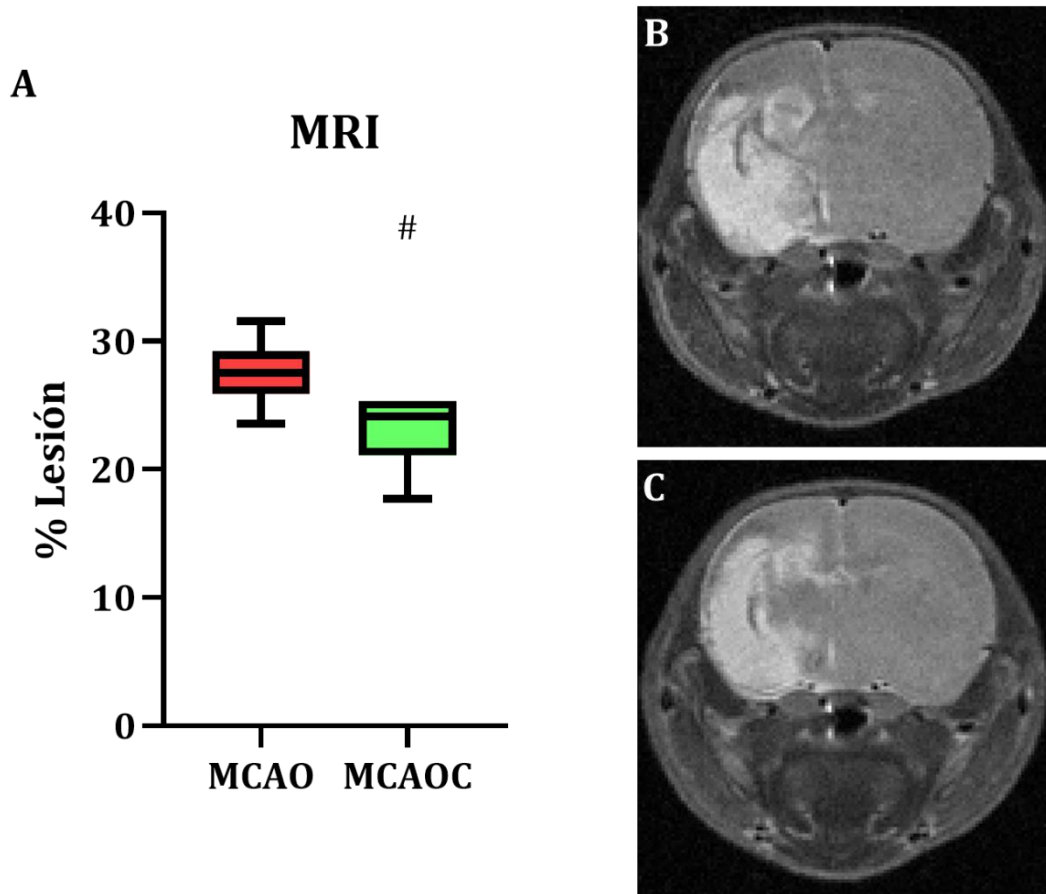
**Figura R. 19.** Efecto de los distintos tratamientos sobre el comportamiento en el OFT. **A.** Distancia recorrida durante la prueba. **B.** Número de entradas al centro de la arena a lo largo de la prueba. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=8-15$ ).

De manera general, el tratamiento con inhibidor fue capaz de revertir el comportamiento tipo depresivo que apareció a p14 asociado al daño isquémico, puesto que estos animales obtuvieron un menor tiempo de inmovilidad que el grupo **MCAO**, sin ser diferentes del grupo control. Sin embargo, en el caso de los test realizados a p37, el grupo al cual se administró inhibidor no mostró ningún efecto sobre las alteraciones neuroconductuales del estado anímico estudiadas. En todos los casos en grupo **MCAOI** obtuvo resultados similares a los del grupo **MCAO**, mostrándose diferente del grupo **SHAM** siempre que existieron alteraciones.

## Efecto del CBD en el daño isquémico

### Efecto sobre el daño a nivel macroscópico

Se valoró el posible efecto neuroprotector del CBD a nivel macroscópico por medio de imágenes de resonancia magnética. Dado que se ha demostrado como a p14 el porcentaje de lesión ya estaba establecido y no varió a p37 y a fin de respetar la norma del refinamiento y evitar procedimientos no necesarios a los animales, este análisis únicamente se realizó una semana después del daño.

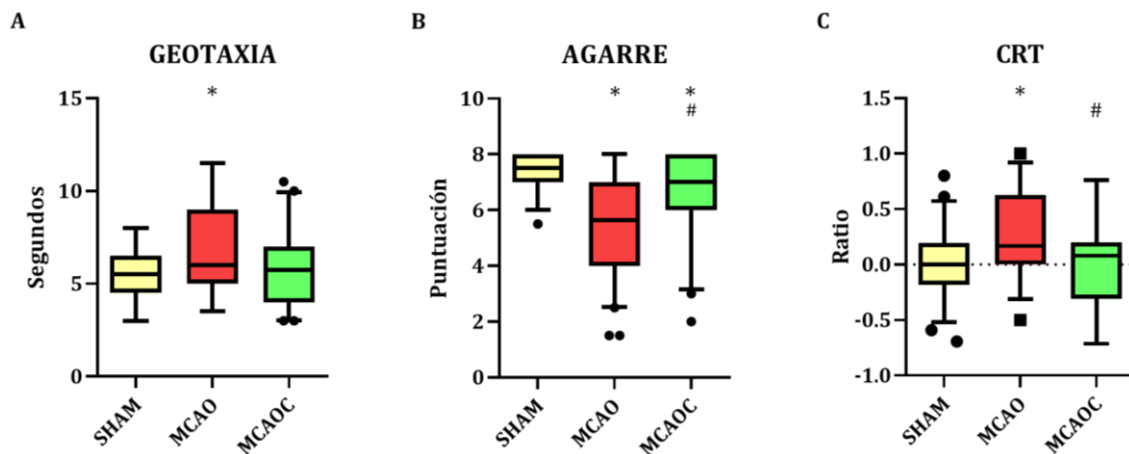


**Figura R. 20.** Efecto del cannabidiol en el daño macroscópico por MRI. **A.** Diferencias entre los grupos MCAO y MCAOC. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. **B.** Imagen representativa de la lesión del grupo MCAO. **C.** Imagen representativa de la lesión del grupo MCAOC. ( $n=6-14$ ).

El grupo **MCAOC**, tratado con CBD, obtuvo un **porcentaje de volumen de lesión** significativamente menor que el grupo **MCAO**, tratado con vehículo, **una semana después** del infarto isquémico. En el análisis estadístico se obtuvo un *valor de p* inferior a 0,05 en el test *t de Student* (Fig. R. 20. A).

### Efecto sobre el daño funcional

Se comprobó el efecto del CBD sobre el daño funcional a nivel motor, tanto una semana (Fig. R. 21. A y Fig. R. 21. B) como un mes (Fig. R. 21. C) después de la lesión.



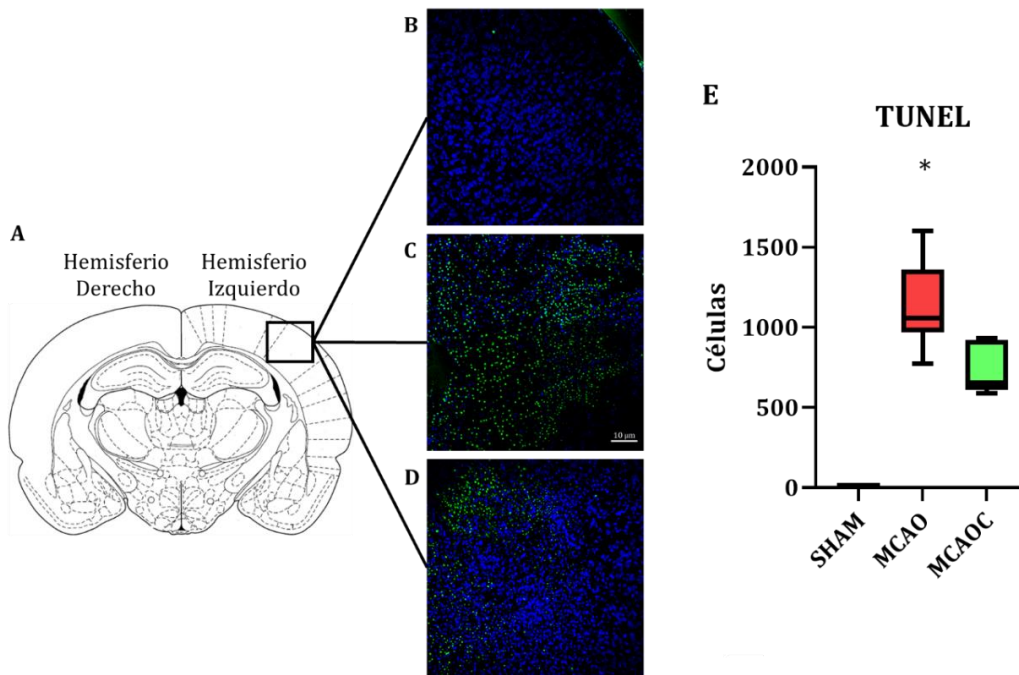
**Figura R. 21.** Efecto del CBD sobre el daño funcional a nivel motor. **A.** Diferencias en el test de geotaxia inversa. **B.** Diferencias en el test de agarre. **C.** Diferencias en el test del cilindro. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. ( $n=10-23$ ).

Como ya se demostró anteriormente, el grupo **MCAO** vio su función motora afectada en todas estas pruebas neuroconductuales relacionadas con la actividad motora, tanto una semana como un mes después del infarto. Por su parte, el CBD, **una semana después** de la lesión, mostró un efecto parcial sobre el daño en la coordinación motora provocado por el infarto, ya que, en el test de la **geotaxia inversa**, no mostró diferencias significativas con el grupo **SHAM**, pero tampoco obtuvo un resultado significativamente distinto del grupo **MCAO** (Fig. R. 21. A), ya que cuando se analizaron las diferencias mediante el test estadístico *Kruskal-Wallis* se obtuvo un *valor de p* superior a 0,05 al comparar el grupo **MCAOC** con cualquiera de los otros dos. En cuanto al daño comprobado relativo al **agarre**, el CBD mostró una reducción en este daño, pero no lo evitó, puesto que el grupo **MCAOC** fue capaz de aumentar significativamente la puntuación de este agarre respecto a la del grupo **MCAO**, pero no logró una valoración similar a la del grupo **SHAM**, siendo todas estas diferencias analizadas mediante el test *Kruskal-Wallis* (Fig. R. 21. B). En cuanto al daño **un mes después** de la lesión, el CBD mostró una recuperación total en cuanto a la hemiparesia asociada a la lesión, previamente mencionada, ya que el grupo **MCAOC** mostró, en el CRT, una menor preferencia por la pata ipsilateral a la lesión que el grupo **MCAO**, pero ninguna diferencia significativa respecto al grupo **SHAM** al realizar una *ANOVA de una vía* (Fig. R. 21. C).

Dado que previamente no se encontraron alteraciones asociadas al infarto en cuanto a la memoria evaluada cuando se realizó la prueba de reconocimiento de objeto nuevo un mes después de la lesión, no se continuó realizando dicho test, a fin de evitar procedimientos estresantes innecesarios a los animales.

## Efecto sobre la muerte celular

Se comprobó el efecto del CBD sobre otro de los daños provocados por el infarto isquémico ya analizados como es la muerte celular, utilizando para ello de nuevo la técnica de TUNEL (Fig. R. 22).



**Figura R. 22.** Efecto del cannabidiol sobre el daño a nivel de muerte celular mediante la técnica de TUNEL. **A.** Zona del cerebro en la que se realizó la toma de las imágenes. **B.** Imagen representativa de las células positivas en el grupo SHAM. **C.** Imagen representativa de las células positivas en el grupo MCAO. **D.** Imagen representativa de las células en el grupo MCAOC. **E.** Representación gráfica de las diferencias entre los grupos SHAM y MCAO. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. ( $n=5-9$ ).

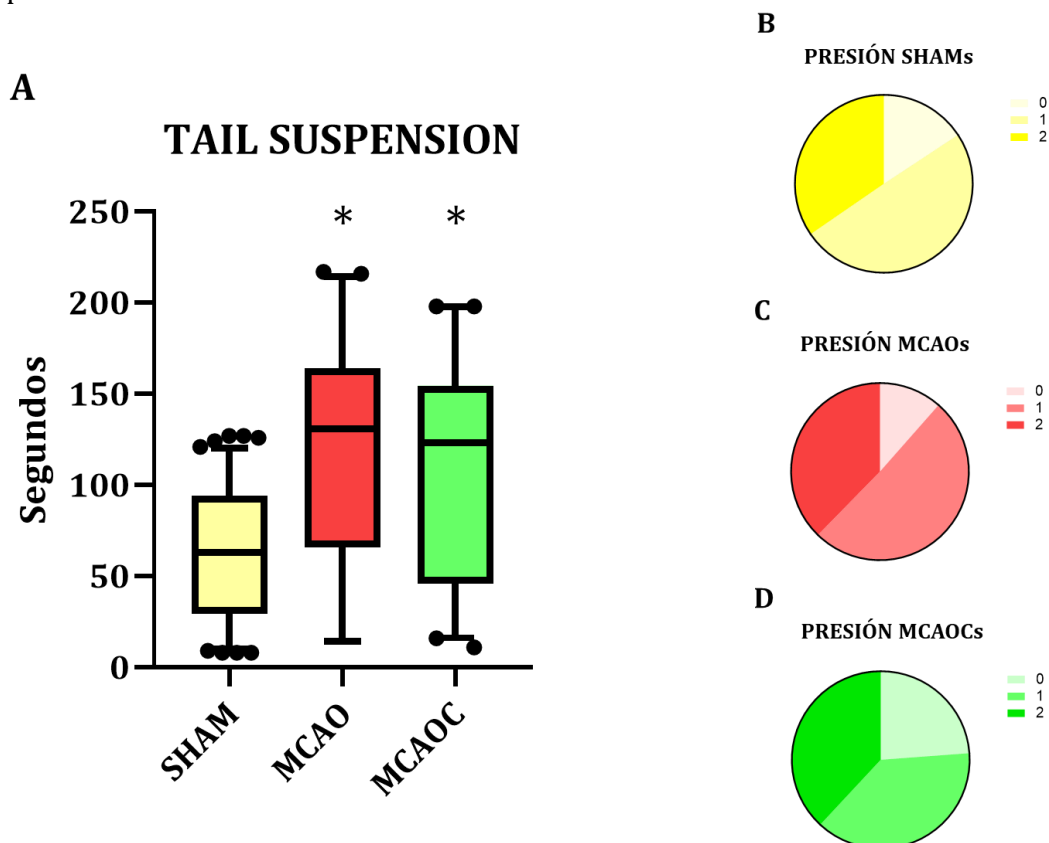
**Una semana después** de la lesión, el CBD fue capaz de mostrar un efecto parcial sobre la **muerte celular**. El grupo **MCAO** fue el único que mostró diferencias significativas respecto al grupo **SHAM**, contando con una mortalidad aumentada. Por su parte, el grupo **MCAOC** redujo parcialmente estos resultados de muerte celular, puesto que, si bien no mostró diferencias significativas respecto al grupo **MCAO**, tampoco lo hizo respecto al grupo **SHAM** (Fig. R. 22. E). Las comparativas entre estos tres grupos se realizaron mediante la prueba de *Kruskal-Wallis*, considerando significativas las diferencias que contaron con un valor de  $p$  inferior a 0,05.

Por tanto, respecto al daño isquémico clásicamente descrito, el CBD fue capaz de mostrar al menos un efecto parcial en la recuperación del tejido, tanto a nivel macroscópico comprobado por la reducción del porcentaje de volumen de lesión que presentó el grupo **MCAOC** respecto al grupo **MCAO**, como a nivel microscópico al no mostrar dicho grupo **MCAOC** diferencias respecto al grupo **SHAM** relativas a la muerte celular. A esta edad el CBD también mostró efecto a nivel neuroconductual, tanto en la prueba de geotaxia inversa, en la cual el grupo **MCAOC** no mostró diferencias significativas respecto al grupo **SHAM**, como en la de agarre, test en el cual el grupo tratado con CBD sí fue diferente del control, pero también de aquel tratado únicamente con vehículo, siendo por tanto capaz de reducir, aunque no de evitar completamente, este daño. En este sentido, el CBD mostró su mayor efecto a nivel neuroconductual un mes después de la lesión, momento en el cual, en el test del cilindro, fue capaz de revertir completamente el comportamiento hemiparético clásicamente asociado a la lesión isquémica, ya que el resultado obtenido en esta prueba por el grupo **MCAOC** no difirió del observado en el grupo **SHAM** y sí del obtenido por el grupo **MCAO**.

## Efecto del CBD en el estado de ánimo

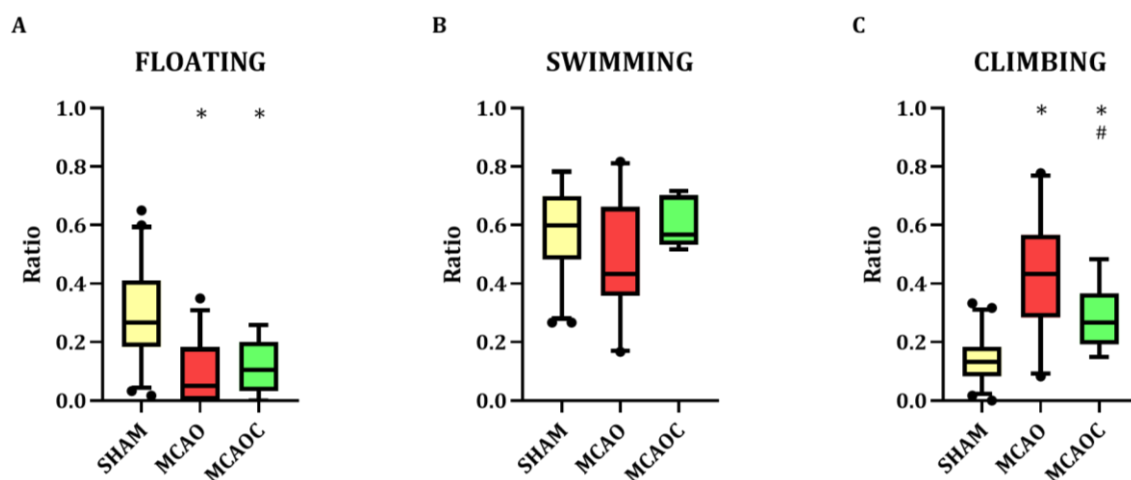
### Efecto sobre las alteraciones neuroconductuales

Se evaluó el efecto del CBD sobre las alteraciones neuroconductuales relativas al estado anímico de los animales, asociadas al daño isquémico y descritas previamente. Estos estudios se realizaron tanto una semana (Fig. R. 23) como un mes (Fig. R. 24 y Fig. R. 25) después de la lesión.



**Figura R. 23.** Efecto del CBD sobre las alteraciones neuroconductuales del estado de ánimo. **A.** Representación gráfica del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. **B.** Distribución de los resultados del grupo SHAM en el test de presión. **C.** Distribución de los resultados del grupo MCAO en el test de presión. **D.** Distribución de los resultados del grupo MCAOC en el test de presión. ( $n=18-23$ ).

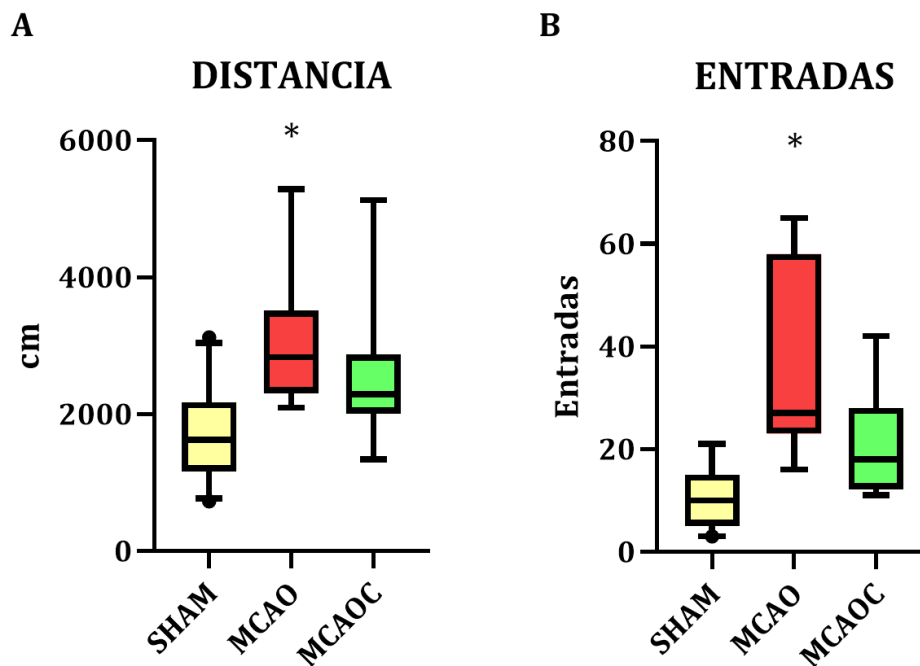
Las ya descritas alteraciones del estado de ánimo, concretamente de tipo depresivo, asociadas al infarto **una semana después** del mismo continuaron siendo apreciables, como se comprobó dadas las diferencias entre el grupo MCAO y el SHAM. En este caso, el CBD no mostró ningún efecto que contrarrestase este comportamiento alterado, ya que no se comprobó ninguna diferencia del grupo MCAOC respecto al grupo MCAO, pero sí un elevado tiempo de inmovilidad del primero respecto al grupo SHAM en el TST (Fig. R. 23. A). Estas diferencias fueron analizadas según la prueba estadística *Kruskal-Wallis*. De nuevo, no se encontraron alteraciones en cuanto al motor grueso, tampoco respecto al grupo MCAOC, ya que las distribuciones de los resultados en el **test de la presión** de los diversos grupos no fueron significativamente diversas entre sí, según el estadístico  $\chi^2$  (Fig. R. 23. B, Fig. R. 23. C y Fig. R. 23. D).



**Figura R. 24.** Efecto del CBD sobre los diferentes tipos de comportamiento mostrados en el FST. **A.** Resultados relativos al comportamiento de tipo flotar. **B.** Resultados relativos al comportamiento de tipo nadar. **C.** Resultados relativos al comportamiento de tipo trepar. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. ( $n=11-15$ ).

Un mes después de la lesión, en el FST, se comprobó como el CBD no fue capaz de revertir la reducción del comportamiento tipo **flotar** asociada a la lesión, ya que el grupo **MCAOC** no fue significativamente diferente del grupo **MCAO**, pero sí mostró las mismas diferencias que este con el grupo **SHAM** (Fig. R. 24. A) cuando estas fueron analizadas mediante el test ANOVA de Brown-Forsythe y Welch, valorando como significativos aquellos resultados con un valor de  $p$  inferior a 0,05. Al analizar el comportamiento de **natación** no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos a estudio, obteniendo un valor de  $p$  superior a 0,05 en todas las comparaciones realizadas mediante el test ANOVA de Brown-Forsythe y Welch (Fig. R. 24. B). Por último, en cuanto a la actividad de **trepar**, el CBD mostró una reducción del comportamiento alterado asociado a la lesión, sin lograr evitar el mismo, ya que el grupo **MCAOC** mostró diferencias significativas con el grupo **MCAO**, reduciendo el comportamiento de tipo trepar respecto a este. Sin embargo, esta reducción no fue suficiente para equipar los resultados del grupo tratado con CBD a aquellos del grupo **SHAM**, ya que mostró diferencias también con este (Fig. R. 24. C). Una vez más, estas diferencias fueron comprobadas estadísticamente mediante el test ANOVA de Brown-Forsythe y Welch, siendo significativo un valor de  $p$  inferior a 0,05.

En el OFT el grupo **MCAOC** no fue capaz de reducir significativamente la distancia recorrida respecto al grupo **MCAO**, sin embargo, tampoco se apreciaron diferencias significativas del grupo tratado con CBD respecto al grupo **SHAM**, sugiriendo un efecto parcial del tratamiento en la normalización de esta distancia recorrida (Fig. R. 25. A). Estas diferencias fueron analizadas mediante el test estadístico de Kruskal-Wallis, siendo positivo un valor de  $p$  inferior a 0,05. En cuanto al **número de entradas**, el CBD también mostró un efecto parcial, ya que el grupo **MCAOC** no mostró una reducción en cuanto al número de entradas que el grupo **MCAO** muestra patológicamente aumentado, pero tampoco se hallaron diferencias en este comportamiento entre el grupo tratado y el **SHAM** (Fig. R. 25. B). Las diferencias, en este caso, fueron analizadas mediante el test ANOVA de Brown-Forsythe y Welch, siendo significativo un valor de  $p$  inferior a 0,05.



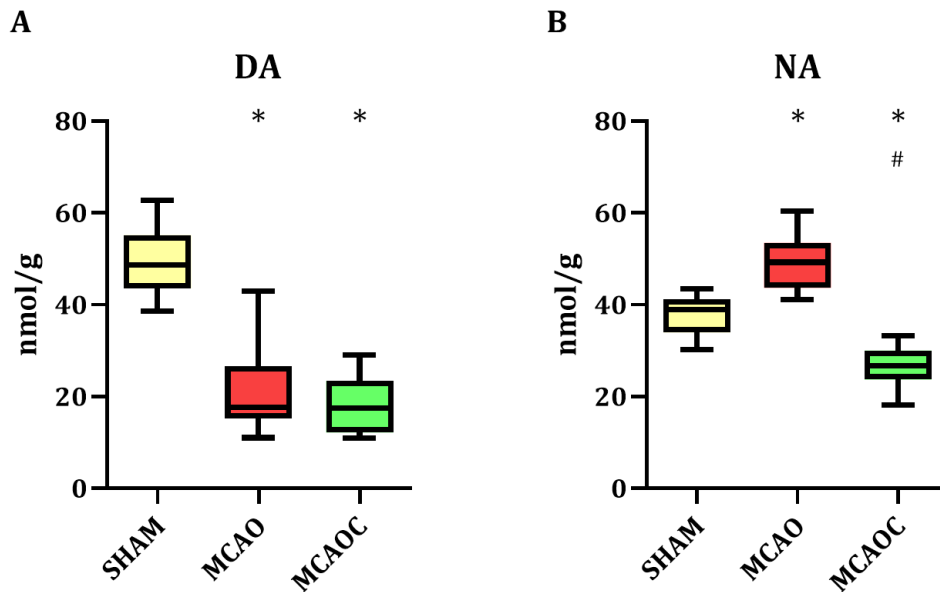
**Figura R. 25.** Efecto del CBD sobre el comportamiento en el OFT. **A.** Distancia recorrida durante la prueba. **B.** Número de entradas al centro de la arena a lo largo de la prueba. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n = 11-15$ ).

Por tanto, en cuanto a las alteraciones neuroconductuales, el CBD no mostró ningún efecto sobre estas una semana después de la lesión. Sin embargo, sí mostró eficacia parcial en las alteraciones halladas un mes después de la lesión, reduciendo a niveles del grupo control el exceso de actividad tanto en el FST, mostrado en forma de comportamiento de tipo trepar, como la distancia recorrida y el número de entradas al centro de la arena en el OFT.

### Efecto sobre las alteraciones moleculares

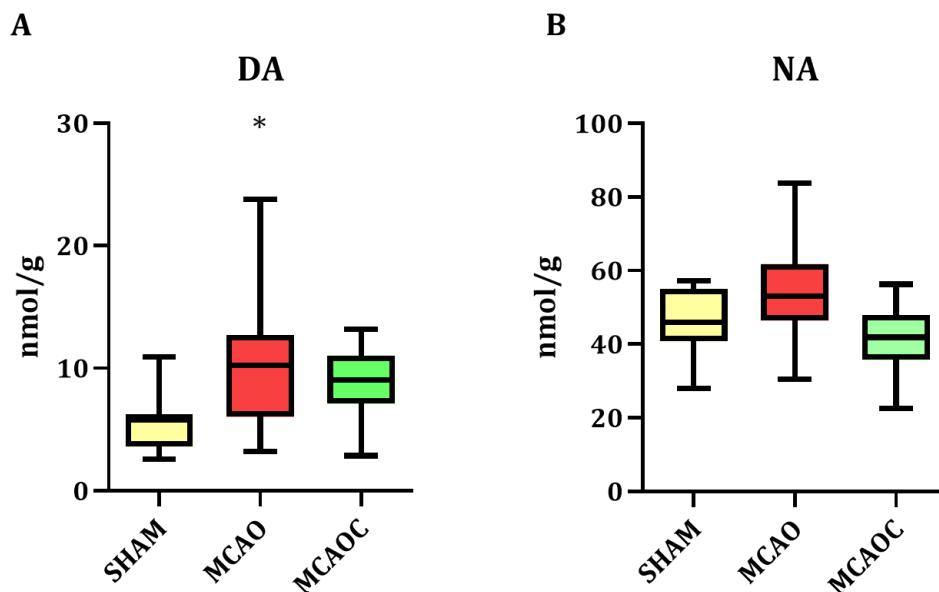
En relación al efecto con estas alteraciones neuroconductuales y el efecto del CBD, se estudió también el efecto de este fármaco sobre las variaciones en los niveles de neurotransmisores que previamente se habían encontrado alterados por el infarto (DA y NA), mediante HPLC, en el hemisferio ipsilateral al daño, tanto una semana (Fig. R. 26) como un mes (Fig. R. 27) después de la lesión.

**Una semana después** del infarto el CBD no fue capaz de lograr ningún efecto sobre los niveles de DA que ya se habían encontrado disminuidos debido a la isquemia, ya que el grupo MCAOC mostró una cantidad de DA en el hemisferio izquierdo disminuida respecto al grupo SHAM y no mostró ninguna diferencia respecto al grupo MCAO (Fig. R. 26. A). Las diferencias fueron analizadas mediante la prueba estadística ANOVA de una vía y solo se consideraron significativos los resultados de valor de  $p$  inferiores a 0,05. Por el contrario, el CBD sí fue capaz de disminuir los niveles de NA a esta edad. El grupo MCAOC obtuvo un valor de NA en el hemisferio izquierdo significativamente menor que el grupo MCAO y que el grupo SHAM (Fig. R. 26. B). Estos resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis y las diferencias con un valor de  $p$  inferior a 0,05 fueron consideradas significativas.



**Figura R. 26.** Efecto del cannabidiol sobre los niveles de neurotransmisores a p14. **A.** Niveles de DA. **B.** Niveles de NA. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto a MCAO. ( $n=9-14$ ).

Un mes después del daño, el CBD mostró un efecto parcial sobre la alteración de los niveles de DA asociada a la lesión. Estos niveles, que estaban aumentados en el grupo lesionado tratado con vehículo respecto al grupo control, se normalizaron parcialmente en el grupo MCAOC, ya que si bien no mostró diferencias con el grupo MCAO tampoco lo hizo respecto al grupo SHAM (Fig. R. 27. A) cuando estos resultados fueron comprobados estadísticamente mediante la ANOVA de una vía, siendo las diferencias significativas cuando la comparación arrojó un valor de  $p$  inferior a 0,05. En cuanto a los niveles de NA, no se encontraron diferencias entre los grupos SHAM, MCAO y MCAOC en este neurotransmisor a esta edad, obteniendo un valor de  $p$  superior a 0,05 en todas las comparaciones entre grupos mediante la ANOVA de una vía (Fig. R. 27. B).



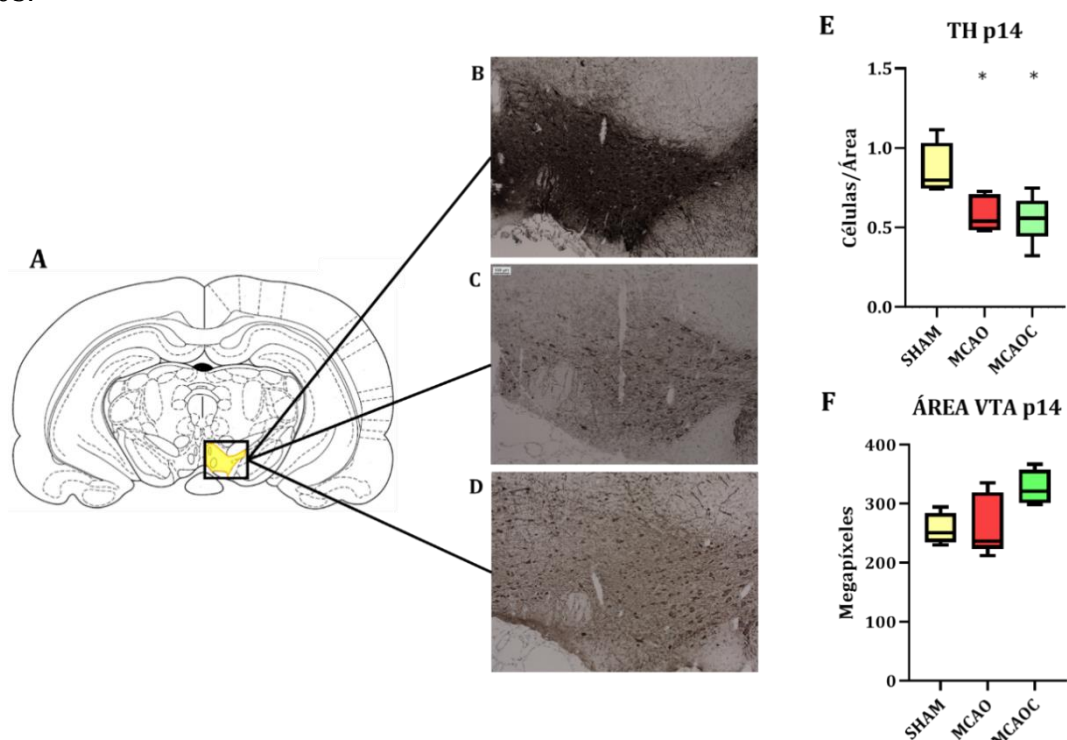
**Figura R. 27.** Efecto del cannabidiol sobre los niveles de neurotransmisores a p37. **A.** Niveles de DA. **B.** Niveles de NA. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=9-15$ ).

Por tanto, en cuanto a la DA, el CBD no mostró ningún efecto sobre las alteraciones de los niveles de este neurotransmisor debidos a la lesión una semana después de la misma. Sin embargo, el tratamiento con este cannabinoide sí fue capaz de provocar una disminución parcial de los niveles de DA un mes después de la lesión, haciendo estos niveles en el grupo **MCAOC** similares a los del grupo **SHAM**. Por otro lado, una semana después de la lesión, el CBD redujo los niveles de NA, los cuales se habían encontrado elevados en relación al daño isquémico. No se hallaron diferencias en cuanto a la misma un mes después de la lesión entre ninguno de los grupos sometidos a estudio.

## Efecto sobre las alteraciones histológicas

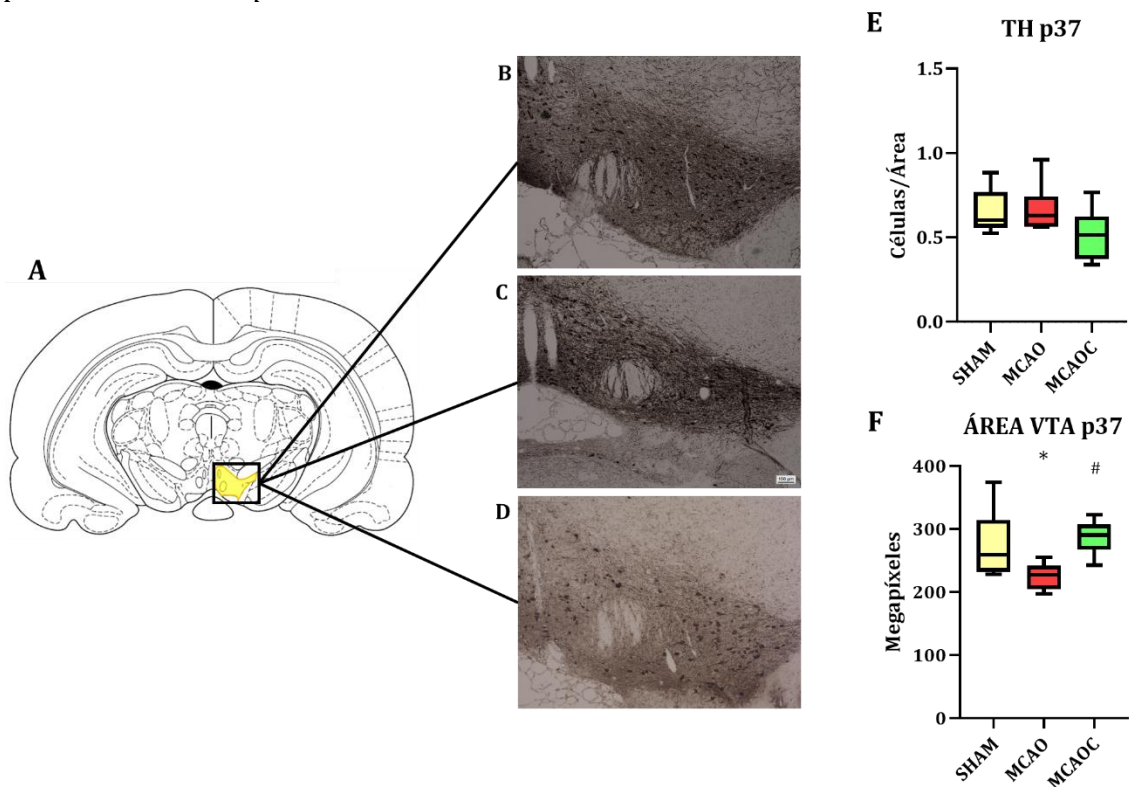
Se analizó el efecto del CBD sobre las neuronas dopaminérgicas que previamente se habían comprobado afectadas, por efecto del infarto, en el VTA del hemisferio lesionado. Esta evaluación se realizó una semana (*Fig. R. 28*) y también un mes (*Fig. R. 29*) después del daño.

**Una semana después** del infarto, el CBD no fue capaz de recuperar la **densidad de neuronas dopaminérgicas**, que se encontró disminuida en el VTA izquierdo debido al daño isquémico. Esto se comprobó dado que el grupo **MCAOC** no mostró diferencias respecto del grupo **MCAO**, pero sí obtuvo un valor de densidad menor que el grupo **SHAM** (*Fig. R. 28. E*). En esta misma edad, no se encontraron diferencias en cuanto al **área** de este núcleo entre ninguno de los grupos observados (*Fig. R. 28. F*). Todas estas diferencias fueron evaluadas mediante *ANOVA de una vía*, considerando significativo un *valor de p* inferior a 0,05.



**Figura R. 28.** Efecto del cannabidiol sobre las alteraciones histológicas a p14. **A.** Zona en la que se realizó la toma de las imágenes. **B.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo SHAM. **C.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo MCAO. **D.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo MCAOC. **E.** Diferencias en cuanto a la densidad de neuronas dopaminérgicas. **F.** Diferencias en cuanto al área del VTA entre grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. ( $n=5$ ).

Por otro lado, **un mes después** de la oclusión de la arteria cerebral media, no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos en cuanto a la **densidad de neuronas dopaminérgicas** en el VTA del hemisferio izquierdo, al comparar las diferencias entre dichos grupos mediante el test estadístico de *Kruskal-Wallis*, no arrojando ninguna de estas diferencias un *valor de p* inferior a 0,05 y, por tanto, no siendo significativas (*Fig. R. 29. E*). En cuanto al **tamaño** de este VTA del hemisferio izquierdo en esta misma edad, el CBD fue capaz de prevenir la pérdida de superficie asociada a la lesión. Esto fue comprobado puesto que el grupo **MCAOC** no mostró diferencias respecto al grupo **SHAM**, pero sí mostró un tamaño aumentado respecto al grupo **MCAO** (*Fig. R. 29. F*). En este caso, se utilizó una *ANOVA de una vía* para evaluar la significancia de las diferencias entre grupos, siendo positivo un *valor de p* inferior a 0,05.

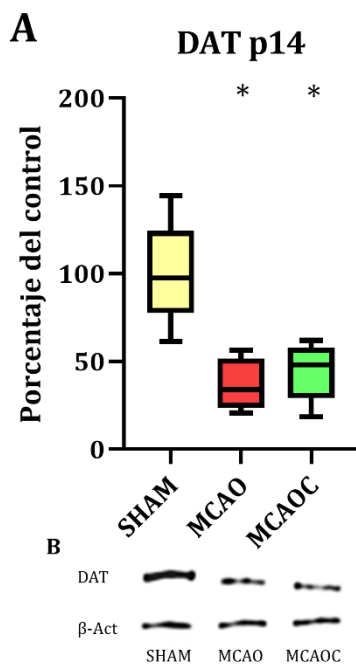


**Figura R. 29.** Efecto del cannabidiol sobre las alteraciones histológicas a p37. **A.** Zona en la que se realizó la toma de las imágenes. **B.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo SHAM. **C.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo MCAO. **D.** Imagen de inmunohistoquímica representativa del grupo MCAOC. **E.** Diferencias en cuanto a la densidad de neuronas dopaminérgicas. **F.** Diferencias en cuanto al área del VTA entre grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto a grupo MCAO. ( $n=6-9$ ).

Por tanto, el CBD no fue capaz de recuperar la pérdida de densidad de neuronas dopaminérgicas en el VTA del hemisferio lesionado a p14, pero el valor del grupo **MCAOC** fue similar al de los otros dos a la edad de p37. En cuanto al tamaño de este núcleo de neuronas dopaminérgicas no se encontró ninguna diferencia entre grupos a p14, pero sí se demostró que el tratamiento con CBD previno la pérdida de tamaño provocada por la lesión a p37, siendo el tamaño del VTA superior en el grupo **MCAOC** que en el grupo **MCAO** y no difiriendo este primero del grupo **SHAM**.

## Efecto sobre la alteración de receptores

Se comprobó el efecto del CBD en la expresión de los receptores de DA DAT y D<sub>2</sub> tanto una semana (Fig. R. 30) como un mes (Fig. R. 31) después del daño.

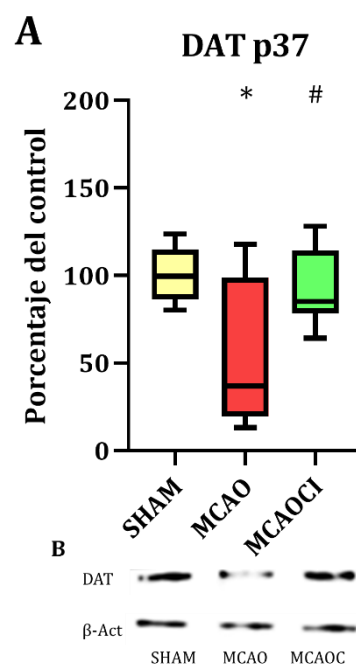


**Figura R. 30.** Análisis de la expresión del receptor DAT mediante WB a p14. **A.** Diferencias entre los grupos en cuanto a la expresión de DAT. **B.** Imagen representativa de la expresión de DAT y  $\beta$ -Actina en los diferentes grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \*valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. (n=7-8).

Una semana después del daño isquémico el CBD no fue capaz de mostrar ningún efecto sobre la alteración en la expresión de DAT. El grupo MCAOC mostró un descenso en la expresión de este DAT similar a la observada previamente por el grupo MCAO, encontrando una diferencia significativa de este grupo MCAOC respecto al grupo SHAM, pero no respecto al grupo MCAO (Fig. R. 30. A). Se utilizó una ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre grupos, siendo significativas aquellas que

alcanzaron un valor de  $p$  inferior a 0,05. De nuevo, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados respecto a la expresión del receptor D<sub>2</sub> (datos no mostrados) al ser analizadas mediante una ANOVA de una vía y arrojar todas las comparativas un valor de  $p$  superior a 0,05.

En lo relativo a la expresión de estos receptores **un mes después** de la lesión, el grupo



**Figura R. 31.** Análisis de la expresión del receptor DAT mediante WB a p14. **A.** Diferencias entre los grupos en cuanto a la expresión de DAT. **B.** Imagen representativa de la expresión de DAT y  $\beta$ -Actina en los diferentes grupos. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \*valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto a grupo MCAO. (n=7-10).

MCAOC mostró una normalización en cuanto a la expresión de DAT, siendo los niveles de este grupo superiores a los encontrados en el grupo MCAO y similares al grupo SHAM (Fig. R. 31. A). Estas diferencias se compararon por medio de un test ANOVA de una vía, mediante la cual en todos los casos se obtuvo un valor de  $p$  por encima de 0,05. Una vez más, tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de D<sub>2</sub> (resultados no mostrados) entre ninguno de los grupos cuando se

analizaron mediante el test estadístico *ANOVA de una vía*, ya que todas las comparaciones arrojaron un *valor de p* mayor que 0,05.

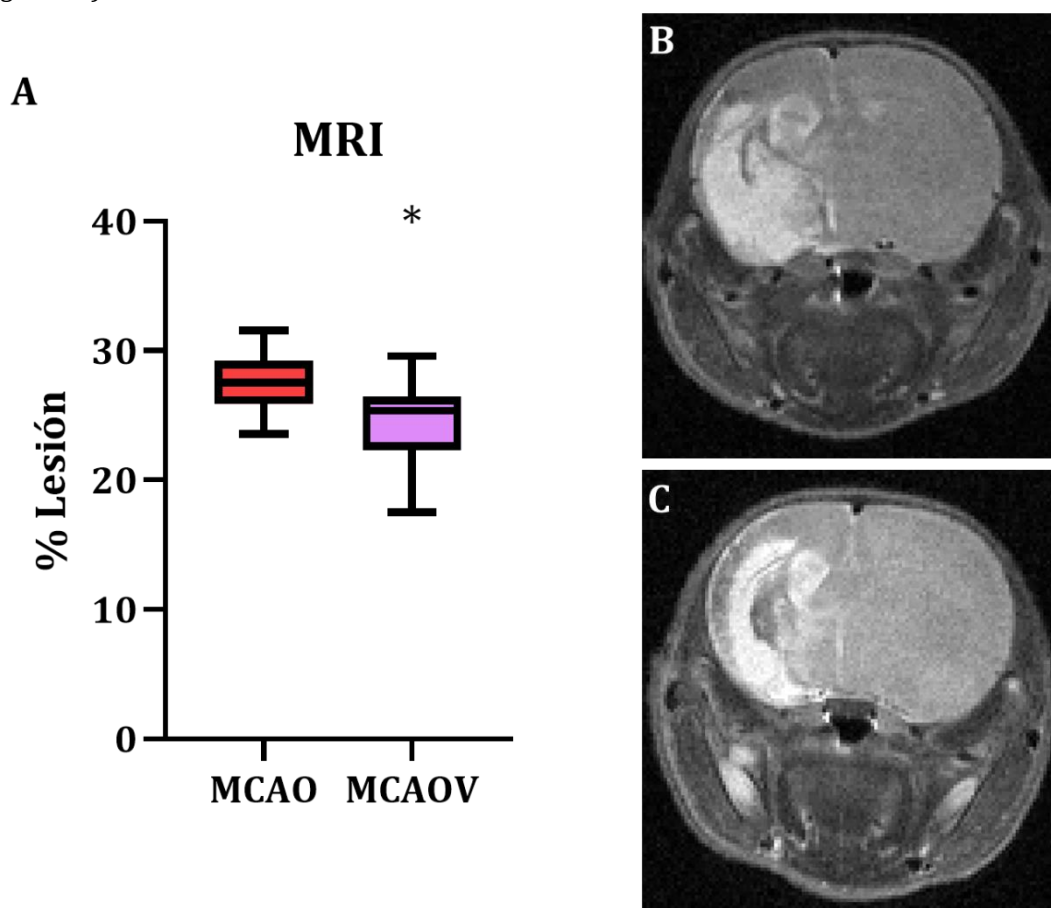
Por tanto, en lo relativo a la expresión de receptores se encontró una disminución del DAT una semana después de la lesión que se mantuvo un mes después de la lesión. El tratamiento con CBD no mostró ningún efecto en el punto temporal p14, pero sí fue capaz de normalizar los niveles de expresión de DAT un mes después del daño. En cuanto a la expresión de D<sub>2</sub>, no se encontraron alteraciones asociadas al daño isquémico ni una semana ni un mes después de este, tampoco el CBD alteró la expresión de este receptor.

De manera general, una semana después del daño el CBD no fue capaz de mostrar eficacia en ninguno de los parámetros estudiados asociados a los trastornos del estado de ánimo. A esta edad, los animales tratados con este cannabinoide continuaron mostrando un comportamiento tipo depresivo, unos niveles reducidos de DA, una disminución en cuanto a las neuronas dopaminérgicas del VTA y una menor expresión de DAT que el grupo control. Sí mostró eficacia reduciendo los niveles de NA que se encontraron elevados en relación con el daño. Por el contrario, un mes después de la lesión el CBD mostró eficacia reduciendo el comportamiento hiperactivo en las pruebas neuroconductuales, y normalizando los niveles de DA, el número de células dopaminérgicas en el VTA y la expresión de DAT.

## Efecto del VCE-004.8 en el daño isquémico clásico

### Efecto sobre el daño a nivel macroscópico

Se evaluó el efecto potencial del cannabinoide sintético VCE-004.8 sobre el daño clásicamente asociado al infarto isquémico. Inicialmente se estudió la eficacia de este fármaco sobre el daño a nivel macroscópico una semana después de la lesión mediante MRI (Fig. R. 32).

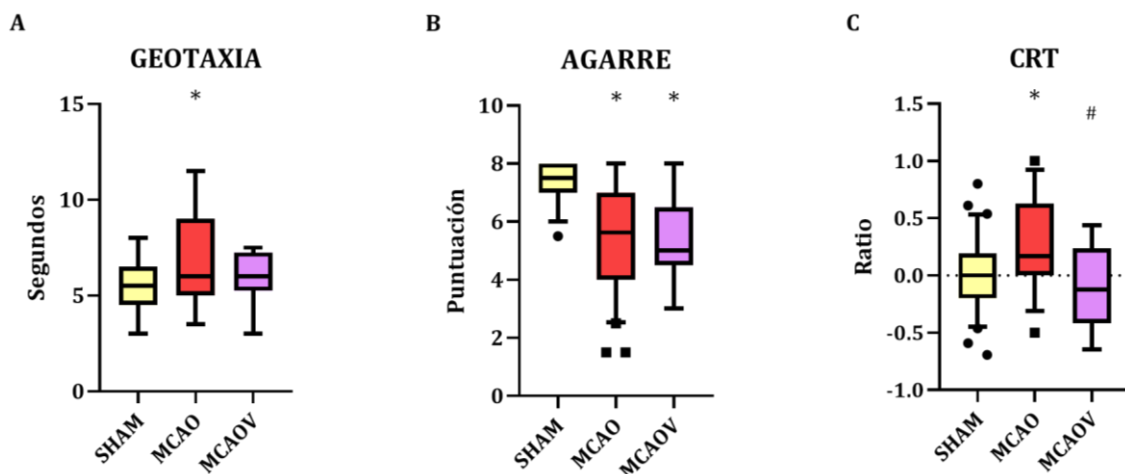


**Figura R. 32.** Efecto del VCE-004.8 en el daño macroscópico por MRI. **A.** Diferencias entre los grupos MCAO y MCAOV. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. **B.** Imagen representativa de la lesión del grupo MCAO. **C.** Imagen representativa de la lesión del grupo MCAOV. ( $n=13-14$ ).

Este fármaco mostró tener efecto en la protección del daño macroscópico medido por MRI **una semana después** del daño, ya que se apreció en el grupo **MCAOV** una reducción en el **porcentaje de volumen de lesión** respecto al grupo **MCAO**, cuando las diferencias entre ambos grupos se analizaron mediante una *t de Student*, arrojando un *valor de p* inferior a 0,05 (Fig. R. 32. A).

### Efecto sobre el daño funcional

De igual manera, se analizó el efecto de este cannabinoide sobre el daño funcional a nivel motor, tanto una semana como un mes después de la lesión (Fig. R. 33).



**Figura R. 33.** Efecto del VCE-004.8 sobre el daño funcional a nivel motor. **A.** Diferencias en el test de geotaxia inversa. **B.** Diferencias en el test de agarre. **C.** Diferencias en el test del cilindro. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. ( $n=9-23$ ).

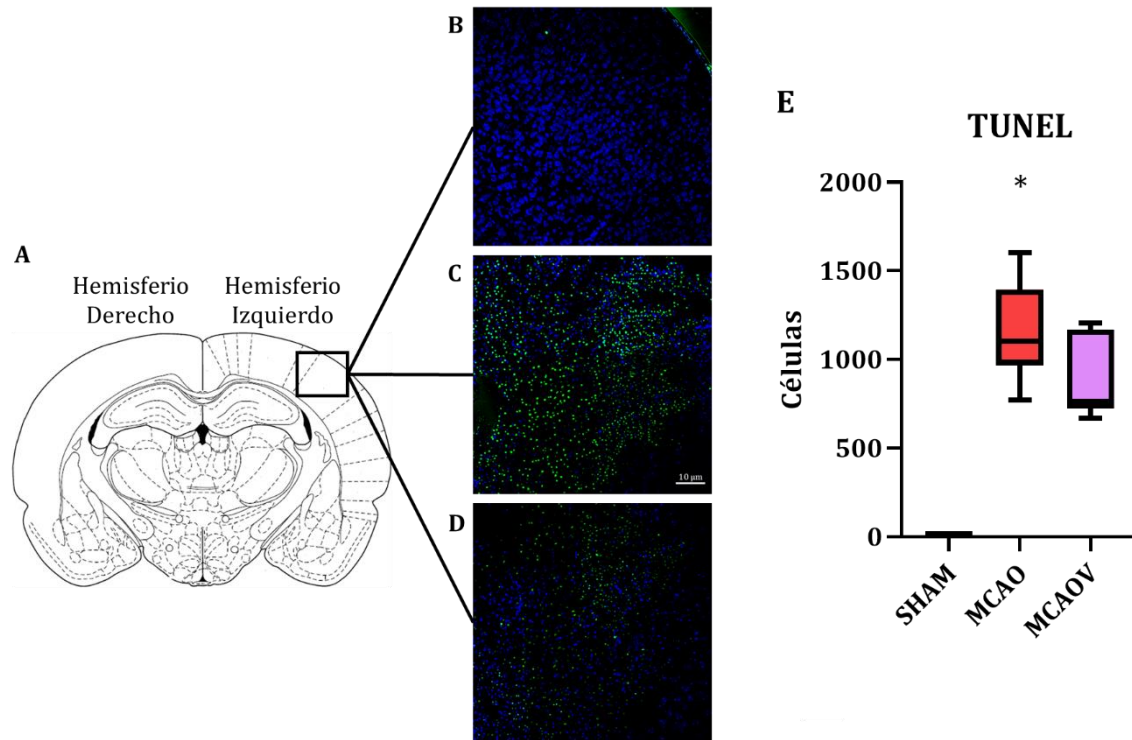
Una semana después del daño, se estudió el efecto del VCE-004.8 sobre el daño funcional a nivel motor mediante las pruebas de geotaxia inversa y agarre. En lo relativo a la **geotaxia inversa** este cannabinoide mostró un efecto parcial en la reversión del daño ocasionado por la lesión, puesto que, si bien el grupo **MCAOV** no mostró diferencias respecto al grupo **MCAO**, el tiempo empleado en rotar 180 grados por los animales pertenecientes al primero se redujo lo suficiente como para tampoco mostrar diferencias respecto al grupo **SHAM** (Fig. R. 33. A). Estas diferencias se definieron cuando el *valor de p* en las comparativas fue menor que 0,05 según el test *ANOVA de Brown-Forsythe y Welch*. A esta misma edad, en cuanto al **test de agarre**, el VCE-004.8 no mostró ningún efecto protector frente a este daño, ya que el grupo **MCAOV** manifestó la misma reducción en la puntuación obtenida respecto al grupo **SHAM** que los animales pertenecientes al grupo **MCAO**, sin contar con diferencias respecto a este último (Fig. R. 33. B). Estos resultados fueron analizados mediante el test estadístico de *Kruskal-Wallis* y se tomaron como significativas las diferencias con un *valor de p* inferior a 0,05.

Respecto al efecto de este derivado cannabinoide sobre las alteraciones motoras **un mes después** del daño, se realizó la **prueba del cilindro**. En esta prueba se comprobó la reversión total de la hemiparesia provocada por la lesión cuando los animales fueron tratados con VCE-004.8. El grupo **MCAOV** redujo la preferencia por la pata sana hasta lograr obtener valores significativamente inferiores a los del grupo **MCAO**, normalizando estos hasta ser similares a los del grupo **SHAM** (Fig. R. 33. C). Estas diferencias fueron comprobadas al obtener un *valor de p* inferior a 0,05 al analizarlas mediante una *ANOVA de una vía*.

Por tanto, el cannabinoide VCE-004.8 mostró la capacidad de revertir parcialmente el daño en la coordinación motora una semana después del infarto y de hacerlo completamente en cuanto a la hemiparesia asociada a la lesión comprobada un mes después de la isquemia. Sin embargo, este tratamiento no fue capaz de mostrar efectos en cuanto a las alteraciones en la capacidad de agarre una semana después de la oclusión de la arteria cerebral media.

## Efecto sobre la muerte celular

Finalmente, el efecto del VCE-004.8 sobre el daño clásicamente provocado por la isquemia se comprobó mediante la técnica de TUNEL (*Fig. R. 34*), a fin de evaluar la muerte celular, que se encuentra aumentada una semana después del infarto debido a la lesión, como ya se ha descrito previamente.



**Figura R. 34.** Efecto del VCE-004.8 sobre el daño a nivel de muerte celular mediante la técnica de TUNEL. **A.** Zona del cerebro en la que se realizó la toma de las imágenes. **B.** Imagen representativa de las células positivas en el grupo SHAM. **C.** Imagen representativa de las células positivas en el grupo MCAO. **D.** Imagen representativa de las células en el grupo MCAOV. **E.** Representación gráfica de las diferencias entre los grupos SHAM y MCAO. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. (n=5-8).

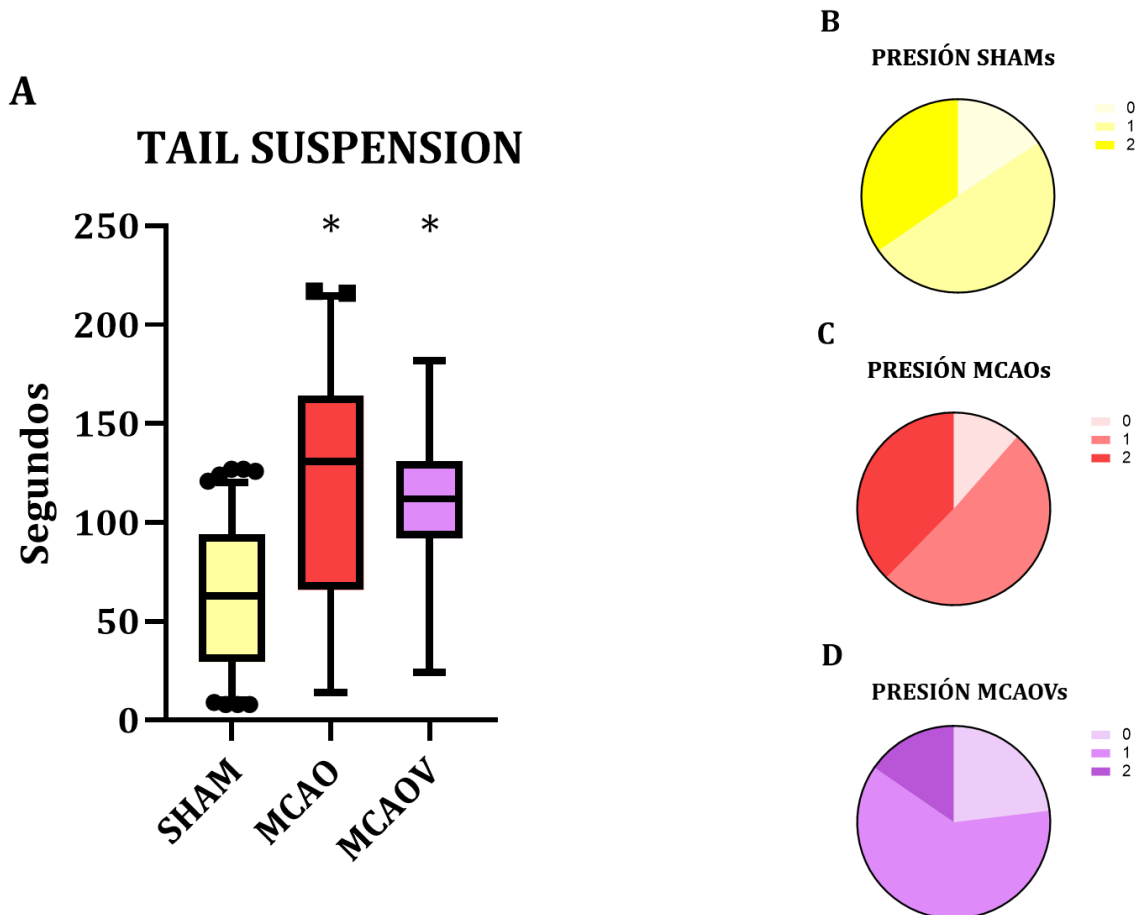
Se comprobó cómo, una semana después del daño, este cannabinoide logró reducir parcialmente la muerte celular, ya que el grupo **MCAOV** contó con un menor número de células positivas en esta técnica de **TUNEL**, ya que, si bien no mostró diferencias significativas respecto al grupo **MCAO**, esta disminución sí fue suficiente en cuanto a la muerte celular fue suficiente para que el grupo tratado con VCE-004.8 tampoco mostró diferencias respecto al grupo **SHAM** (*Fig. R. 34. E*). Estas comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba estadística de *Kruskal-Wallis* y las diferencias se consideraron significativas con un *valor de p* menor que 0,05.

De manera general, una semana después del infarto el VCE-004.8 fue capaz de evitar, al menos parcialmente el daño sobre el tejido, tanto a nivel macroscópico, comprobado mediante MRI, como microscópico, analizado por medio de la técnica de TUNEL, así como en las alteraciones funcionales relativas a la coordinación motora (geotaxia inversa), aunque no mostró ningún efecto en cuanto al agarre. Un mes después del daño este cannabinoide también fue eficaz sobre el daño a nivel funcional, ya que consiguió evitar completamente la hemiparesia debida a la lesión.

## Efecto del VCE-004.8 en el estado de ánimo

### Efecto sobre las alteraciones neuroconductuales

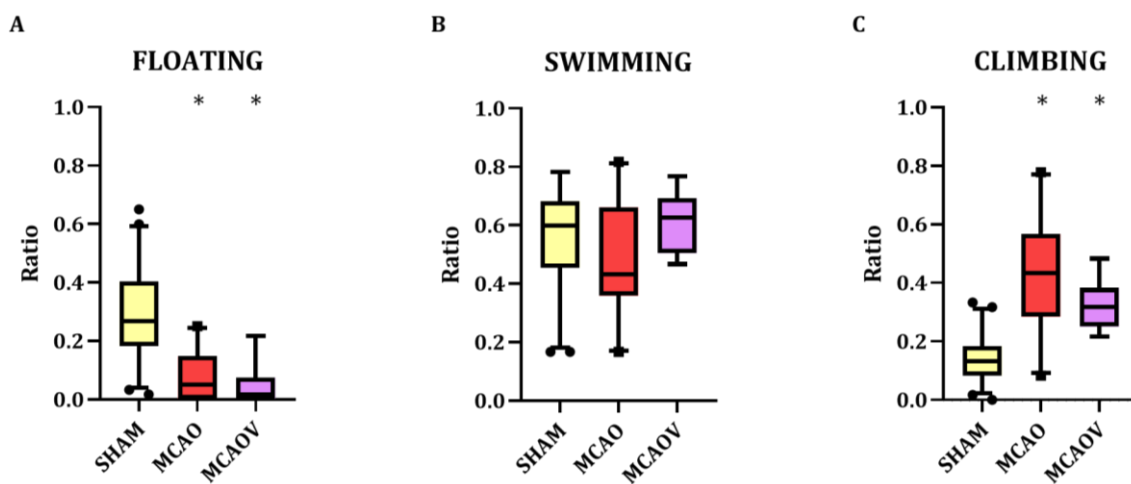
Se llevó a cabo un estudio neuroconductual a fin de estudiar el efecto del VCE-004.8 sobre las alteraciones del estado de ánimo descritas previamente. Estas pruebas se realizaron tanto una semana (Fig. R. 35) como un mes (Fig. R. 36 y Fig. R. 37) después de la lesión.



**Figura R. 35.** Efecto del VCE-004.8 sobre las alteraciones neuroconductuales del estado de ánimo. **A.** Representación gráfica del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. **B.** Distribución de los resultados del grupo SHAM en el test de presión. **C.** Distribución de los resultados del grupo MCAO en el test de presión. **D.** Distribución de los resultados del grupo MCAOV en el test de presión. ( $n=12-23$ ).

**Una semana después** del daño este fármaco no pareció ejercer ningún efecto sobre las alteraciones del estado de ánimo en el TST. El grupo **MCAOV** no mostró una reducción en el tiempo de inmovilidad respecto al grupo **MCAO**, ya que estos grupos no mostraron diferencias significativas entre sí. Este tiempo de inmovilidad siguió aumentado en relación al daño a pesar del tratamiento, ya que el grupo **MCAOV** mostró unos valores significativamente elevados respecto al grupo **SHAM**. Estas diferencias se analizaron mediante el test de *Kruskal-Wallis* y fueron significativas con un valor de  $p$  inferior a 0,05 (Fig. R. 35. A). Una vez más, no se encontraron diferencias entre grupos en el motor grueso mediante la **prueba de presión** cuando estas se analizaron mediante el test  $\chi^2$  (Fig. R. 35. B, Fig. R. 35. C y Fig. R. 35. D).

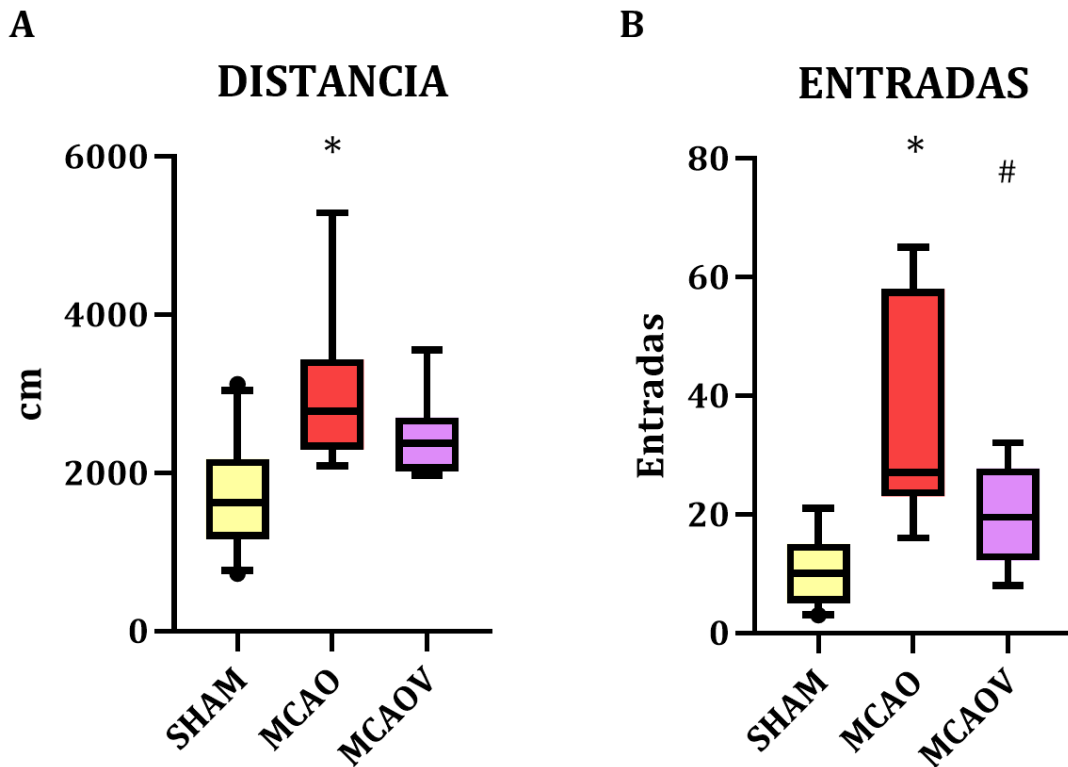
Por otro lado, **un mes después** de la lesión también se analizó el efecto de este cannabinoide sobre las alteraciones previamente descritas. En el **FST** el VCE-004.8 no mostró ningún efecto sobre las alteraciones encontradas y relativas a la lesión. En la actividad de **flotar** el grupo **MCAOV** mostró resultados similares a los del grupo **MCAO**, siendo la ratio de ambos significativamente menor que la encontrada en el grupo **SHAM** (Fig. R. 36. A). Las diferencias se evaluaron utilizando un test de *Kruskal-Wallis* y se tomaron como significativas al alcanzar un *valor de p* inferior a 0,05. Respecto al comportamiento de tipo **nadar**, una vez más no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos analizados mediante *ANOVA de una vía*, puesto que en las comparaciones todos los *valor de p* fueron superiores a 0,05 (Fig. R. 36. B). Por último, en cuanto a la actividad de **trepar**, el grupo **MCAOV** mostró resultados similares a los del grupo **MCAO**, estando en ambos casos la ratio de este comportamiento aumentada respecto a la del grupo **SHAM** (Fig. R. 36. C). En este caso se utilizó la prueba estadística *ANOVA de Brown-Forsythe y Welch* y las diferencias únicamente se consideraron significativas en los casos en los que el *valor de p* obtenido era menor a 0,05.



**Figura R. 36.** Efecto del VCE-004.8 sobre los diferentes tipos de comportamiento mostrados en el FST. **A.** Resultados relativos al comportamiento de tipo flotar. **B.** Resultados relativos al comportamiento de tipo nadar. **C.** Resultados relativos al comportamiento de tipo trepar. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. (n=7-15).

En este mismo punto temporal, en el **OFT**, se evaluó el efecto del VCE-004.8 sobre la actividad motora según la distancia recorrida y el comportamiento relacionado con la ansiedad según el número de entradas al centro. En el caso de la **distancia** se observó un efecto parcial de este fármaco, el grupo **MCAOV** fue capaz de reducir este valor a niveles del grupo **SHAM** y no mostrar diferencias significativas respecto a este. Sin embargo, este efecto se consideró parcial puesto que este grupo **MCAOV** no fue capaz de reducir la distancia recorrida hasta lograr una diferencia significativa respecto al grupo **MCAO** (Fig. R. 37. A). Las diferencias se analizaron según el test estadístico *Kruskal-Wallis* y se consideraron significativas cuando el *valor de p* fue inferior a 0,05. En cuanto al **número de entradas al centro** de la arena, se observó la eficacia del VCE004.8 a la hora de normalizar el aumento en esta medida ocasionado por la lesión. El grupo **MCAOV** redujo el número de entradas de forma que este valor fue significativamente inferior al mostrado por el grupo **MCAO** y se igualó al del grupo **SHAM**, sin mostrar diferencias significativas con este último. En este caso

se utilizó la prueba estadística *ANOVA de Brown-Forsythe y Welch* y se aceptaron como significativos aquellos valores de *p* inferiores a 0,05 (Fig. R. 37. B).



**Figura R. 37.** Efecto del VCE-004.8 sobre el comportamiento en el OFT. **A.** Distancia recorrida durante la prueba. **B.** Número de entradas al centro de la arena a lo largo de la prueba. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. (n=7-15).

Por tanto, el VCE-004.8 no mostró ningún efecto sobre las alteraciones del estado de ánimo una semana después del daño isquémico, ya que no fue capaz de disminuir el tiempo de inmovilidad, catalogado como un comportamiento tipo depresivo, que se produjo en relación al infarto, mostrando un valor similar al del grupo tratado con vehículo y superior al control. Un mes después de este daño isquémico, el VCE-004.8 no mostró ningún efecto en el FST, donde se halló el mismo comportamiento alterado que el del grupo lesionado en todas las posibles acciones realizadas dentro de esta prueba. Este grupo tratado con VCE-004.8 reveló, por tanto, una disminución en el comportamiento de tipo flotar y un aumento en el de tipo trepar respecto al grupo control, sin hallarse ninguna diferencia respecto al comportamiento de tipo nadar. Por otro lado, este fármaco sí fue capaz de mostrar ciertos efectos en las alteraciones del estado de ánimo un mes después de la lesión. Lo hizo en el OFT, donde redujo de forma parcial la actividad motora alterada en relación a la lesión, hasta equipararlo al nivel de los animales control, y de forma total el número de entradas al centro, patológicamente aumentado en el grupo tratado con vehículo y reducido respecto a este al tratar con el cannabinoide hasta asemejar este grupo al grupo control.

# DISCUSIÓN





El accidente cerebrovascular arterial isquémico es una patología típicamente considerada propia de la edad adulta y la vejez; sin embargo, la incidencia de este daño en la etapa perinatal se asemeja a la encontrada en la vejez (Fernández-López et al., 2014; Kratzer et al., 2014). Cuando el PAIS se produce en este momento tan temprano de la vida del paciente conlleva multitud de secuelas que pueden comprometer la salud y el correcto desarrollo del mismo de por vida (Dunbar & Kirton, 2018; Golomb, 2009). Algunas de estas secuelas, como las motoras, han sido ampliamente descritas, mientras que los trastornos del estado de ánimo asociados a este daño no han sido clásicamente estudiados con detenimiento (Ceprián et al., 2017; López-Espejo et al., 2021; Wagenaar et al., 2018). Es importante definir la existencia y el momento de aparición de estos trastornos, a fin de conseguir la mejor comprensión posible de esta patología y sus secuelas y para poder establecer una correcta terapia para abordarlas. Por otro lado, es de vital importancia la búsqueda de tratamientos que puedan paliar todos, o al menos la gran mayoría de estos trastornos derivados del infarto arterial isquémico (Dunbar & Kirton, 2018; Loubinoux et al., 2012). Para poder definir estas terapias farmacológicas también resulta vital conocer los mecanismos patológicos subyacentes a esta lesión, para lo cual resulta de gran ayuda la utilización de modelos animales que reproduzcan correctamente las alteraciones encontradas en los humanos y hagan más accesible la observación de las mismas a diferentes niveles y en un periodo temporal más corto que el que ofrecen los estudios clínicos (Derugin et al., 2005; Loubinoux et al., 2012).

## Reproducción del modelo de MCAO

En primer lugar, y debido a su elevada complejidad, se comprobó la correcta realización del modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas de entre 7 y 10 días de edad postnatal, descrito inicialmente en 1998 (Derugin et al., 1998), modificado posteriormente en 2005 (Derugin et al., 2005) y llevado a cabo según lo realizado en el grupo del Dr. Martínez Orgado, en base a esa última modificación (Ceprián et al., 2017). Para ello, se evaluaron distintos daños habitualmente descritos en asociación a modelos de stroke perinatal en ratas, a nivel histológico y funcional, tanto una semana como un mes después de producirse el infarto (Altamentova et al., 2020; Bouet et al., 2010; Ceprián et al., 2017; Charriaut-Marlangue & Baud, 2018; Mao et al., 2006).

Dado que el volumen de lesión asociado a este tipo de daño ha sido ampliamente descrito mediante MRI (Ceprián et al., 2017; Derugin et al., 2000, 2005), se utilizó esta técnica a ambas edades para definir el volumen de la lesión, comprobando que este tamaño fue similar a lo encontrado previamente en la bibliografía, sin encontrar variaciones en el volumen relativo del mismo con el avance del tiempo, entre una semana y un mes después de producirse la oclusión (Chang et al., 2005; Derugin et al., 2005; C. Fox et al., 2005). Además, la distribución de esta lesión fue similar a la encontrada en los humanos, confirmando la validez de este modelo a la hora de reproducir el daño encontrado en la clínica (Geraldo et al., 2020). Generalmente, reducir el volumen de lesión y, por tanto, las zonas afectadas por el daño, se asocia con una menor afectación y un mejor estado general de los afectados (Larphaveesarp et al., 2016).

Esta afectación patológica sobre el tejido fue complementariamente validada mediante la técnica de TUNEL, comprobando la muerte celular que, generalmente, se produce en la zona perilesional (Mao et al., 2006). Con este marcaje del DNA fragmentado se comprobó el aumento en cuanto a la muerte celular en el área de penumbra, clásicamente descrito en este modelo (Ceprián et al., 2017; Mao et al., 2006). Esta muerte celular es un proceso que puede prolongarse en el tiempo, por lo que aún fue detectable 7 días después de la lesión (Ceprián et al., 2017; Larphaveesarp et al., 2016). El daño producido en la zona de penumbra define en último término el alcance de la lesión y actuar sobre la muerte celular en la misma, promoviendo la recuperación de la perilesión, es el proceso en el que generalmente se centran los esfuerzos terapéuticos para lograr una mejoría en el daño provocado por el accidente cerebrovascular (Glushakova et al., 2017; Z. Li et al., 2016; Woodruff et al., 2011).

Finalmente, la correcta reproducción del modelo y su asociación con el daño en los humanos se comprobó mediante pruebas funcionales en ambos puntos temporales. Una limitación de este estudio fue la dificultad asociada a realizar pruebas conductuales a animales de solo 14 días de edad, por lo que a estos se les realizaron pruebas funcionales, típicamente usadas en diferentes modelos de daño en roedores de corta edad, basadas en reflejos como son la geotaxia inversa y el agarre palmar (Ceprián et al., 2017; Lubics et al., 2005; Ragaeva et al., 2017; E. S. a. M. Sanches et al., 2019). A pesar de no haber podido realizar pruebas funcionales de mayor complejidad, es importante tener en cuenta que las alteraciones relativas a estos reflejos analizados se consideran un buen indicador del desarrollo neurológico posterior (Farkas et al., 2009). Estas pruebas neuroconductuales evidenciaron un daño funcional a nivel motor en ambas edades analizadas, correspondiente a lo ya encontrado previamente por nuestro grupo en cuanto a este mismo modelo (Ceprián et al., 2017), pero también hallado con anterioridad en relación a otros modelos de daño neurológico perinatal (Del Pozo et al., 2022; Silva et al., 2022) y en relación con lo encontrado en la clínica (Benders et al., 2009; Wagenaar et al., 2017). El daño hemiparético encontrado un mes después de la lesión mediante el test del cilindro ha sido descrito en estudios previos, pero también es una secuela característica de esta patología en humanos, mostrando una vez más la bondad del modelo a la hora de reproducir lo hallado en la clínica (Ceprián et al., 2017; Larphaveesarp et al., 2016, 2021; Saunders et al., 2018). Sin embargo, no se encontró daño cognitivo relativo a la memoria a corto plazo, en consonancia con lo encontrado en la bibliografía, ya que este tipo de memoria se ha mostrado inalterada en estudios previos preclínicos de PAIS (Ceprián et al., 2017). No encontrar alteraciones en este tipo de memoria no implica que el PAIS no produzca ningún daño sobre la memoria, sino, tal vez, que sea necesario analizar diferentes tipos de esta para evidenciar alteraciones relativas a la misma, sin embargo en el caso de pacientes humanos hay indicios que indican la preservación de la memoria de trabajo en relación al PAIS (Dunbar & Kirton, 2018).

Es importante definir el daño a p14 ya que se corresponde con una edad clave del desarrollo humano, como es la infancia, en la cual las condiciones fisiológicas, pero también sociológicas, son determinantes para definir el alcance del daño y la posible recuperación del mismo (Clark & Kingsley, 2020). Las secuelas encontradas a p37 correlacionarían con aquellas que persistirían en la adolescencia y que, probablemente, el paciente acarrearía de por vida (Dunbar & Kirton, 2018; Lehman & Rivkin, 2014; Wagenaar et al., 2018).

Se demostró, por tanto, que el modelo fue llevado a cabo correctamente y que reproduce con fidelidad diferentes daños asociados a este stroke perinatal.

## Alteraciones del estado de ánimo

Como ya se ha mencionado, desde que el modelo de infarto cerebral perinatal transitorio fue descrito y modificado por el grupo de Derugin (Derugin et al., 1998, 2005) distintas alteraciones han sido definidas y utilizadas a fin de establecer la eficacia de distintas estrategias terapéuticas (Ceprián et al., 2017; Chang et al., 2005; C. Fox et al., 2005). Sin embargo, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, este modelo no había sido previamente utilizado para estudiar las alteraciones del estado de ánimo, a pesar de la gran importancia de estas tanto en el desarrollo de la patología como en la búsqueda de estrategias terapéuticas para tratar a estos pacientes (Dunbar & Kirton, 2018). De hecho, en la bibliografía los estudios relacionados con estos trastornos en asociación al PAIS son escasos, refiriéndose principalmente a estos bajo el nombre global de “alteraciones del comportamiento” en la mayoría de los casos, sin entrar a definirlos (Geraldo et al., 2020; Machado et al., 2015).

A pesar del escaso número de estudios, tanto clínicos como preclínicos, de estas alteraciones derivadas del PAIS, sí existen recientes evidencias que ponen de manifiesto síntomas depresivos durante la infancia de pacientes que sufrieron una patología similar, como es la EHI, durante el período neonatal (Álvarez-García et al., 2022). Además, la depresión post-stroke ha sido ampliamente descrita y asociada a una mayor morbilidad y mortalidad en el adulto, afectando a la eficacia de la rehabilitación de los pacientes (Villa et al., 2018; Z. Wang et al., 2018). Es precisamente esta sintomatología la que se encontró en el desarrollo de nuestro estudio preclínico, evidenciada por un mayor tiempo de inactividad en esta prueba de los animales lesionados respecto a los controles en el TST, clásicamente utilizado para la detección de comportamiento tipo depresivo en roedores (Kumar Arora et al., 2022; Taniguti et al., 2019). Este test se realizó a dicha edad para evitar interferencias del elevado peso de estos animales a p37, lo cual podría provocarles un dolor excesivo (Can et al., 2012). Sin embargo, realizar dicha prueba a tan corta edad conlleva otro tipo de limitaciones, por ejemplo la complicación en cuanto a realizar una prueba que mida la actividad de los animales, como podría ser el OFT, que complemente los resultados del TST, lo cual generalmente es deseable (Gould, 2009). Esta limitación se debe a que previamente en la bibliografía se ha descrito que la actividad motora de animales sanos a las dos semanas de edad, analizada mediante el OFT, es prácticamente nula (Lubics et al., 2005). Para lograr paliar este inconveniente, se midió el motor grueso de los animales, no encontrándose ningún daño a este nivel. Este hecho descarta que la mayor inmovilidad de los animales lesionados en el TST se debiera a problemas motores, en vez de a una conducta tipo depresiva. Por tanto, se confirmó la aparición de síntomas depresivos asociados al daño isquémico una semana después de producirse el mismo, relacionados con lo encontrado en la clínica a una edad similar en el desarrollo de los pacientes humanos a la que supondría este p14 analizado en el caso de las ratas (Álvarez-García et al., 2022).

Este comportamiento tipo depresivo no se mantuvo cuando las pruebas neuroconductuales destinadas al estudio del mismo se realizaron un mes después de la lesión. Por el contrario,

a esta edad de p37 se observó en los animales isquémicos una hiperactividad en el FST en lugar de un mayor tiempo de inmovilidad -lo que significaría la presencia de un comportamiento tipo depresivo (Unal & Canbeyli, 2019)-. Concretamente, el tipo de comportamiento que estaba especialmente incrementado fue aquel de tipo trepar, que ya se encuentra sobredimensionado en animales tratados con antidepresivos propios de la vía catecolaminérgica (Slattery & Cryan, 2012; Vega-Rivera et al., 2013). Al estudiar, mediante el OFT, la actividad motora de los animales isquémicos respecto a los controles un mes después de la lesión se encontró, de igual forma, una hiperactividad que se mostró como un incremento en la distancia recorrida. Esta hiperactividad en el OFT ha sido descrita previamente en modelos en roedores de daño adquirido cerebral neonatal, basados en procesos de isquemia, parecidos al que nos ocupa (Kadam et al., 2010; Lubics et al., 2005). Es más, en relación a lo encontrado en nuestro estudio, se ha descrito previamente cómo una depleción de DA en ratas en edad neonatal desencadenaba una hiperactividad en el OFT a largo plazo (Ogata et al., 2019). En relación a estos hallazgos sintomatológicos, estudios clínicos han descrito la aparición de trastornos tipo TDAH en pacientes de PAIS, siendo estas alteraciones más evidentes cuanto mayor era la edad de los sujetos (Bosenbark et al., 2018; Williams et al., 2017). Otro factor que se encontró alterado en el OFT fue el número de entradas al centro de la arena, elevado en el caso de los animales lesionados. Este incremento en el número de entradas, a la par con el aumento en cuanto a la distancia recorrida, puede considerarse un indicador de una mayor toma de riesgo por estos animales, que en este periodo similar a la adolescencia en humanos generalmente contribuye a lesiones y mortalidad (Bishnoi et al., 2021).

## **El sistema dopaminérgico tras el PAIS**

Siete días después de la inducción del PAIS se encontraron alteraciones en los niveles de dos neurotransmisores clásicamente asociados a los trastornos de los estados de ánimo, concretamente estas alteraciones se vieron en relación con la NA y la DA (Dean & Keshavan, 2017; Hamon & Blier, 2013; Lima-Ojeda et al., 2018). En el caso del primero, el aumento observado una semana después del daño puede explicarse como un indicador consecuente del propio daño isquémico, previamente descrito en la bibliografía (Drobyshevsky et al., 2015; Lechtenberg et al., 2019; Tao et al., 2019; Zhao et al., 2020). En cuanto a la DA, una semana después del daño se observó una disminución en los niveles de este neurotransmisor en el hemisferio izquierdo de los animales infartados respecto al de los animales del grupo control, que podría relacionarse con el comportamiento depresivo encontrado en el TST (Ano et al., 2019; Cao et al., 2021; Raupp-Barcaro et al., 2021). Por tanto, el descenso descrito en cuanto a los niveles de DA podría relacionarse con el comportamiento tipo depresivo encontrado en el TST a esta misma edad, considerándolo como la causa de esta sintomatología. Sin embargo, a pesar de la típica implicación del sistema serotoninérgico en la depresión (Daut & Fonken, 2019; Dell'Osso et al., 2016; Kraus et al., 2017), no se encontraron cambios en los niveles de 5-HT relacionados con la oclusión de la arteria cerebral media en este modelo.

Por tanto, dado que la principal alteración relacionada con los síntomas depresivos pareció achacarse al sistema dopaminérgico, se examinó con más detenimiento la afectación sobre

el mismo. En concordancia con la reducción de los niveles de DA una semana después del daño, se encontró una reducción de las neuronas dopaminérgicas que conforman el VTA, sin hallarse una disminución en el tamaño de este núcleo, en aquellos animales que habían sufrido un infarto isquémico. Esta reducción en la densidad de neuronas dopaminérgicas pudo deberse a la elevada susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas al estrés oxidativo (elemento clave en la fisiopatología del PAIS), ya que generalmente estas neuronas cuentan con un nivel basal elevado de ROS (Chinta & Andersen, 2005; Pamies et al., 2022; Patricio et al., 2020). La pérdida de neuronas dopaminérgicas podría ser la causa del descenso en los niveles de DA, ya que el VTA es uno de los principales núcleos encargados de la síntesis de DA (Hamon & Blier, 2013). Dada la implicación de las neuronas dopaminérgicas, y en concreto las del VTA, en lo relativo al estado de ánimo y trastornos neuropsiquiátricos (Bariselli et al., 2016; Chinta & Andersen, 2005; Douma & de Kloet, 2020; Hamon & Blier, 2013; Morales & Margolis, 2017), en último término, la muerte de estas neuronas y la consecuente reducción en la cantidad de DA observadas podría ser la causa de los síntomas depresivos encontrados en los animales lesionados cuando estos se evaluaron una semana después del daño.

Por último, una semana después de la lesión también se avaluó la expresión del transportador (también llamado recaptador) de DA, el DAT. En este caso, también se comprobó una reducción en cuanto a los niveles de este receptor asociada al daño isquémico. Dado que se trata de un receptor presináptico, cabe esperar que su expresión se encuentre disminuida en relación con la pérdida de neuronas dopaminérgicas previamente mencionada (Colloby et al., 2012; Palermo & Ceravolo, 2019). De hecho, en una patología clásicamente caracterizada por la muerte de neuronas dopaminérgicas como es la Enfermedad de Parkinson, se suele caracterizar por una reducción de este DAT y su funcionalidad (Kraemmer et al., 2014; Palermo & Ceravolo, 2019). Sin embargo, no se encontraron alteraciones en cuanto a la expresión de D<sub>2</sub>.

Sin embargo, un mes después de la inducción del PAIS, la única alteración encontrada fue relativa a la DA, que apareció aumentada en el grupo lesionado respecto al grupo control. Como ya se ha mencionado, este aumento en los niveles de DA estuvo en consonancia con lo encontrado en el FST, ya que los fármacos antidepresivos que actúan aumentando la vía dopaminérgica incrementan el comportamiento de tipo trepar en este test (Raupp-Barcaro et al., 2021; Slattery & Cryan, 2012; Vega-Rivera et al., 2013). Por otro lado, estos niveles elevados de DA también explicarían el aumento observado en cuando a la distancia recorrida en el OFT, ya que es conocido que este neurotransmisor influye en gran medida en la actividad motora (Buddenberg et al., 2008; de Souza Silva et al., 2008; Kokkinou et al., 2021; Struntz & Siegel, 2018). Además, el sistema dopaminérgico está ampliamente relacionado con la toma de decisiones arriesgada, que podría estar representada por las entradas al centro del terreno que aparecían aumentadas en estos animales lesionados (Gabriel et al., 2021; Kohno et al., 2015).

Contrariamente a lo encontrado una semana después de la lesión, a p37 no se evidenciaron diferencias en cuanto a la densidad de neuronas dopaminérgicas en el VTA, pero sí en el tamaño que presentó dicho núcleo. Se ha descrito que, tras un episodio de hipoxia-isquemia neonatal, se produce una derivación de la proliferación neuronal hacia la generación de

neuronas dopaminérgicas, proceso que se ve alterado, como otros muchos procesos neurorregenerativos que tienen lugar tras dicha patología, por las desfavorables condiciones ambientales para la supervivencia de esas nuevas neuronas (McPherson & Juul, 2008). De forma similar, nuestros hallazgos, al observar la recuperación de la densidad de neuronas DA en el VTA, pero con el resultado final de un VTA de menor volumen, apoyan que ese proceso regenerativo fue incompleto. El hecho de que, por tanto, el número total de neuronas dopaminérgicas fuera menor y, sin embargo, los niveles de DA estuvieran aumentados, sugiere la persistencia de algún tipo de desregulación que condujera a un aumento relativo de la concentración de DA. Estas alteraciones en la regulación del sistema dopaminérgico se han comprobado previamente, por ejemplo en relación a la enfermedad de Parkinson, tratando de revertir el descenso en la cantidad de DA (Grandi et al., 2018; Lee et al., 2000; Palermo & Ceravolo, 2019). De hecho en la bibliografía se ha descrito cómo, en ocasiones, podría haber un proceso inherente y consecutivo a esta lesión por el cual aumentaría la inervación dopaminérgica en la zona isquémica (Talhada et al., 2021). Sin embargo, como se describió anteriormente, el TDAH se considera secundario a una situación de disminución de la concentración cerebral de DA, que reduciría el papel modulador de las vías mesocorticales, dando lugar a la hiperactividad (Del Campo et al., 2011; Russell et al., 2005; Sharma & Couture, 2014; Tripp & Wickens, 2009). No obstante, los resultados referentes al aumento o disminución de la actividad del sistema dopaminérgico en el TDAH específicamente secundario a daño hipóxico-isquémico son contradictorios, observándose también en algunos modelos una asociación con concentración elevada de DA (McPherson & Juul, 2008).

De hecho, algunas de estas alteraciones de la regulación del sistema dopaminérgico mencionadas en relación al PAIS tienen que ver con una reducción en cuanto a la expresión de DAT, que favorece una mayor cantidad de DA disponible en la brecha sináptica (Lee et al., 2000; Palermo & Ceravolo, 2019). Es precisamente esta disminución en los niveles de expresión de DAT lo que se continuó observando en nuestro estudio de nuevo un mes después de la lesión. Esta menor expresión de DAT podría deberse al menor número total de neuronas DA en los animales isquémicos, pero el hecho de que se pudiera recuperar la densidad de neuronas DA en el VTA y que en este caso la síntesis de DA no se viera reducida (al contrario de lo observado a p14) sugiere que a p37 los bajos niveles de expresión de DAT no se corresponden con una reducción de la población de neuronas DA de similar intensidad. De este modo, se abre la posibilidad de que existiera algún tipo de alteración en los mecanismos de transducción o expresión de este receptor. Esta opción, pese a ser de gran atractivo, no ha sido descrita previamente en relación con daño isquémico cerebral. Es interesante que en modelos transgénicos de ratones que carecen de expresión del gen DAT se produce también una clínica de hiperactividad asociada a una concentración aumentada de DA (McPherson & Juul, 2008), coincidente con nuestros resultados. Igualmente, se ha descrito en roedores que bajos niveles de DAT se asocian a un comportamiento hiperactivo, de exploración aumentada e impulsivo (Salatino-Oliveira et al., 2018), como lo encontrado en nuestro estudio. De nuevo no se hallaron alteraciones en cuanto a los niveles de D<sub>2</sub>.

## Efecto de un inhibidor de la recaptación de DA en el estado de ánimo tras PAIS

Para confirmar la relación de la baja concentración de DA con la sintomatología tipo depresiva (Raupp-Barcaro et al., 2021), se trató dicho déficit con un inhibidor de la recaptación de esta (GBR 12909) que ha demostrado aumentar eficazmente los niveles de DA (Smolders et al., 2008).

Dado que en ocasiones los antidepresivos pueden tener efectos neuroprotectores en situaciones de accidentes cerebrovasculares, inicialmente se analizaron los efectos del GBR 12909 sobre el daño isquémico, para comprobar si una posible eficacia del mismo se producía debido a una neuroprotección o directamente a su actividad sobre el sistema dopaminérgico (Campos et al., 2016). Se observó que la administración de GBR 12909 no se asoció a una reducción en el daño cerebral macroscópico (volumen de lesión) o microscópico (densidad de células TUNEL+) ni en el desarrollo de hemiparesia a largo plazo, respecto al grupo tratado con vehículo.

El GBR 12909 actuó eficazmente sobre la sintomatología depresiva observada a p14, puesto que los animales tratados con este fármaco mostraron un menor tiempo de inmovilidad en el TST. No se encontró ningún efecto de este tratamiento en cuanto al desempeño de los animales en el reflejo de presión, lo cual una vez más indicó la falta de relación entre la fuerza muscular y el tiempo de inmovilidad en el TST. Por el contrario, los resultados avalaron la relación de los bajos niveles cerebrales de DA con la presencia de sintomatología tipo depresivo.

Se ha descrito que una reducción de la concentración cerebral de DA en época neonatal en ratas se asocia a largo plazo con un comportamiento tipo hiperactivo (Lai et al., 2018; Ogata et al., 2019). Por dicho motivo el tratamiento con GBR 12909 se prolongó tres días tras la evaluación del TST, a fin de investigar los efectos del aumento de concentración de DA desde p10 hasta p17 sobre la hiperactividad observada a p37. Sin embargo, esta actuación no fue suficiente para evitar el desarrollo de la sintomatología hiperactiva encontrada un mes después del daño. Por tanto, aumentar los niveles de DA que se encontraron disminuidos una semana después del infarto no fue suficiente para evitar la desregulación encontrada posteriormente, asociada con el comportamiento hiperactivo de los animales lesionados.

A modo de resumen, asociado a la isquemia se encontró un comportamiento tipo depresivo una semana después del daño que, por el contrario, pasó a ser de tipo hiperactivo cuando este se analizó un mes después del infarto. De manera subyacente el principal neurotransmisor implicado en ambos casos fue la DA, encontrándose disminuida una semana después del daño, en relación al comportamiento tipo depresivo, pero aumentada al mes, asociada al comportamiento tipo hiperactivo. Adicionalmente y en correlación a lo anterior, a p14 la densidad de neuronas dopaminérgicas en el VTA fue menor en los animales infartados sin existir diferencias en cuanto al tamaño del núcleo. Por el contrario, no se encontraron diferencias en cuanto a la densidad de estas, aunque el tamaño del VTA a p37 no se normalizó, denotando un menor número total de neuronas dopaminérgicas a ambas edades. A ambas edades se comprobó una menor expresión de DAT, que puede

relacionarse con la disminución del número de neuronas DA, pero también parece ser secundaria a una alteración de la síntesis del receptor DAT. Así, a p14, pese al descenso de DAT, la intensa pérdida de neuronas DA conduciría globalmente a la disminución de la concentración de DA, y con ello del comportamiento depresivo. A p37, en cambio la persistencia de una baja expresión de DAT con un número y actividad de las neuronas DA parcialmente recuperado, resultaría en el aumento de la concentración de DA, y con ello del comportamiento hiperactivo.

Cabe destacar la importancia de los datos aquí descritos, los cuales confirmaron la aparición de trastornos del estado de ánimo en asociación al PAIS. De gran relevancia es el hecho de que estos trastornos variaron dependiendo del punto temporal de observación de los mismos, siendo ya apreciables a corto plazo (una semana después del daño). Esto recalca la importancia de llevar a cabo un control exhaustivo de estos pacientes, a fin de diagnosticar la aparición de estas alteraciones correctamente y a la mayor brevedad posible, dada su determinante implicación en una mejor recuperación y desarrollo de los afectados por esta patología y sus familiares o cuidadores (Álvarez-García et al., 2022; Wu et al., 2017). Es importante mantener un control prolongado sobre las alteraciones del estado de ánimo que se puedan encontrar en los pacientes puesto que, como sugiere este estudio, estas pueden variar a lo largo del tiempo. Como se ha mencionado previamente, la PSD afecta a la capacidad de recuperación funcional de los adultos afectados (Dafer et al., 2008; Das & G K, 2018; Dong et al., 2022; G. Li et al., 2021; Robinson & Jorge, 2016). Sería preocupante que fuera el mismo caso en los niños supervivientes a una PAIS. En ese sentido, son muy destacables los resultados obtenidos con el GBR 12909.

Aunque el fármaco no tuvo efecto neuroprotector ni evitó las secuelas motoras a largo plazo, los animales con PAIS que recibían el fármaco una semana después del daño mostraron resultados similares a los controles en la geotaxia inversa y el test de agarre. Estos resultados abren la posibilidad de una implicación de los niveles de DA, y el estado motivacional con la que estos se asocian ampliamente (Berke, 2018; Love, 2014; Volkow et al., 2017), a la hora de realizar los test neuroconductuales. Por un lado, esto podría implicar que parte del déficit motor encontrado en pacientes sobrevivientes a un PAIS estuviera interferido por un estado depresivo. Por otro, dada la falta de efectos del GBR 12909 sobre los resultados motores a largo plazo, que la suspensión del tratamiento y por tanto la posible reaparición de sintomatología depresiva, podría afectar la capacidad de recuperación. Estos extremos, de enorme interés, exigen una investigación específica.

Finalmente, otro de los puntos clave de este estudio reside en el hecho de las alteraciones subyacentes descritas. El hecho de conocer los neurotransmisores y las células principalmente dañados en este modelo podría resultar de gran interés clínico, puesto que saber sobre qué aspecto concreto de la fisiopatología es más conveniente actuar es altamente deseable y beneficioso para la elección del tratamiento correcto. En este sentido, la DA ha cobrado una mayor importancia en cuanto a los trastornos del estado de ánimo posteriores al stroke (Kim et al., 2013; Sami & Faruqui, 2015). Al encontrar alterado este sistema dopaminérgico en nuestro modelo, parece de gran interés el uso de fármacos que actúen sobre esta vía para tratar estos trastornos.

## **Efecto neuroprotector del CBD en el daño isquémico**

A fin de comprobar la reproducibilidad en cuanto a la forma de administración y la consecuente eficacia del CBD en este modelo de PAIS en rata, se comprobó el efecto de este fármaco sobre los daños típicamente asociados a la isquemia y descritos previamente en este modelo. Para ello, se utilizó una dosis de 5mg/Kg en una única administración vía intraperitoneal 30 minutos después de producirse la reperfusión del flujo sanguíneo, según lo descrito previamente por nuestro grupo (Ceprián et al., 2017).

Respecto al daño histológico a nivel macroscópico, mediante la técnica de MRI se observó una reducción en el porcentaje de volumen de lesión asociada al tratamiento con CBD una semana después de causar el daño isquémico. Este efecto se ha descrito previamente, tanto en el modelo de PAIS como en otros modelos de daño cerebral adquirido perinatal (Ceprián et al., 2017; Del Pozo-Sanz, 2021; Pazos et al., 2012). También en relación al daño histológico, pero en esta ocasión a nivel microscópico, se comprobó el efecto del CBD en cuanto a la muerte celular, analizando ésta en la zona perilesional mediante la técnica de TUNEL, de nuevo una semana después del infarto. Como ya se ha mencionado, la recuperación de esta zona de perilesión es el objetivo en el que se centran principalmente las estrategias farmacológicas actuales (Glushakova et al., 2017; Z. Li et al., 2016; Woodruff et al., 2011). En este sentido, se encontró una reducción de esta muerte celular en el grupo tratado con CBD, poniendo de manifiesto su eficacia en esta característica de la patología del PAIS. Esta eficacia en cuanto a paliar la muerte celular también ha sido previamente probada, tanto en este modelo como en otros modelos de daño perinatal (Barata et al., 2019; Ceprián et al., 2017; Martínez-Orgado et al., 2021; Pazos et al., 2012). El CBD fue, por tanto, capaz de actuar sobre la muerte celular en una zona determinante para una mejor recuperación de este daño como es la perilesión isquémica, mostrando su elevado potencial terapéutico (Martínez-Orgado et al., 2021).

Finalmente, a nivel neuroconductual, el CBD mostró efecto neuroprotector una semana después del daño en ambos reflejos comprobados y asociados a la función motora, ya que el grupo tratado obtuvo mejores resultados que aquel tratado con vehículo. Este efecto fue confirmado un mes después del daño, cuando el CBD fue capaz de evitar la hemiparesia asociada al PAIS. Una vez más, este efecto beneficioso sobre la funcionalidad motora estaba en consonancia a lo descrito previamente en la bibliografía en relación a la eficacia de este cannabinoide en modelos de daño cerebral adquirido neonatal (Ceprián et al., 2017; Del Pozo-Sanz, 2021; Pazos et al., 2012).

La comprobación de estos efectos permitió asumir que el CBD, administrado a la dosis y en el momento utilizados, mostraba eficacia terapéutica.

## **Efecto del CBD sobre el estado de ánimo tras PAIS**

### **Efectos sobre el cuadro depresivo**

Dado que se confirmó la eficacia neuroprotectora del CBD, se pudo continuar con el estudio de la posible utilidad de este fármaco en las alteraciones del estado de ánimo

secundariamente al PAIS. La eficacia del CBD en este sentido se ha demostrado en trastornos psiquiátricos y del estado de ánimo (Campos et al., 2012; Crippa et al., 2018; García-Gutiérrez et al., 2020), pero no había sido estudiada previamente en relación a este modelo.

En primer lugar, una semana después de la lesión no se encontró ningún efecto de la administración de CBD sobre los resultados del TST. Los animales tratados con este fármaco mostraron un tiempo de inmovilidad aumentado respecto al grupo control y similar al descrito en el grupo tratado con vehículo. Por tanto, el CBD no tuvo efecto protector en lo relativo a la sintomatología depresiva encontrada a esta edad en nuestro modelo. Un estudio previo en ratones indicó que el tratamiento con CBD no mostró propiedades antidepresivas en el TST, pero sí en el FST, achacándolo al menor estrés que implica el primero y, por tanto, los distintos mecanismos que subyacen a cada uno (El-Alfy et al., 2010).

Tras lo encontrado en las pruebas neuroconductuales, se analizaron los niveles de los neurotransmisores que previamente se habían mostrado alterados en asociación al daño isquémico. El CBD evitó el aumento de los niveles de NA, ya que los animales pertenecientes al grupo tratado con este cannabinoide contaban con una menor concentración de NA que aquellos tratados con vehículo, lo que corroboraría el efecto neuroprotector del CBD en este sentido. Se ha descrito como una disminución de la concentración de NA se asocia con un menor daño relativo al infarto, un mejor pronóstico y menor mortalidad (Phelan et al., 2015). Sin embargo, el CBD no fue capaz de mostrar ningún efecto en lo relativo a los niveles reducidos de DA encontrados en asociación a la lesión isquémica. En nuestro estudio, el grupo tratado con CBD también mostró una concentración de DA menor que la del grupo control y similar a los encontrados en el grupo tratado con vehículo. Esta falta de efecto por parte del fármaco en cuanto a los niveles del neurotransmisor estaba en consonancia con lo hallado en las pruebas neuroconductuales, en las que como ya se ha mencionado tampoco se encontró eficacia alguna del CBD. Por tanto, a pesar de su marcado y prometedor carácter antidepresivo, el CBD no fue capaz de paliar el descenso de la concentración de DA, manteniéndose por tanto la sintomatología depresiva asociada.

También una semana después del daño se analizaron las neuronas dopaminérgicas del VTA. Se encontró que, en consonancia con lo observado en cuanto a las pruebas neuroconductuales y los niveles de DA, el CBD no fue capaz de mostrar efecto neuroprotector sobre la reducción de la densidad de estas células. El grupo al que se le administró el tratamiento con CBD mostró una densidad reducida de neuronas dopaminérgicas respecto al grupo control, sin verse alterado el tamaño del VTA de igual forma que la comprobado en cuanto al grupo tratado con vehículo. Pese a que, como ya se ha comentado y encontrado en la bibliografía, el CBD fue capaz de reducir la muerte celular en la zona de perilesión (Barata et al., 2019; Ceprián et al., 2017; Martínez-Orgado et al., 2021; Pazos et al., 2012), este efecto neuroprotector no fue suficiente para evitar la pérdida de células dopaminérgicas en el VTA en nuestro modelo. El CBD sí protege estas neuronas dopaminérgicas en modelos de enfermedad de Parkinson en la que el daño se induce mediante estrés oxidativo (Giuliano et al., 2021; Lastres-Becker et al., 2005; Patricio et al., 2020), pero no en modelos de Parkinson basados en la alteración mitocondrial (Celorrio et al., 2017). Es preciso tener en cuenta que estos modelos se realizaron en animales

adultos, mientras que el nuestro reprodujo la patología de un cerebro inmaduro, especialmente susceptible al estrés oxidativo (Martínez-Biarge et al., 2019; Martínez-Orgado et al., 2007, 2021). Es posible que el daño oxidativo sobre estas células tan susceptibles fuera demasiado grave como para que el demostrado efecto antioxidante del CBD tras PAIS en ratas neonatas (Ceprián Costoso, 2019; Ceprián et al., 2017) pudiera evitar la muerte de dichas neuronas dopaminérgicas.

En consonancia, el CBD tampoco fue capaz de evitar la reducción de los niveles de expresión de DAT tras el PAIS, ya que la destrucción de las neuronas dopaminérgicas conlleva la pérdida de este receptor presináptico (Chinta & Andersen, 2005; Pamies et al., 2022; Patricio et al., 2020).

A pesar de que el efecto antidepresivo del CBD ha sido ampliamente documentado en la bibliografía, generalmente estos estudios utilizan dosis más altas y/o prolongadas en el tiempo que la aquí citada (García et al., 2011; Giuliano et al., 2021; Lastres-Becker et al., 2005; Patricio et al., 2020), asociando dicho efecto antidepresivo a su actuación sobre el sistema serotoninérgico (García-Gutiérrez et al., 2020; Melas et al., 2021; Sales et al., 2018), mientras que el CBD muestra muy poca capacidad para inhibir la recaptación de DA (Patricio et al., 2020). Es importante destacar que, en nuestro caso, el CBD se administró en dosis única tras la inducción del PAIS, es decir, varios días antes de la evaluación, por lo que en ese momento ya no era esperable que persistieran niveles terapéuticos de CBD en sangre o cerebro (Pazos et al., 2012). Aunque existen trabajos que indican el efecto antidepresivo del CBD, incluso mostrando un efecto sostenido en el tiempo cuando este se aplicó una semana antes de realizar las pruebas conductuales (Sales et al., 2019), esta eficacia se comprobó utilizando una dosis más elevadas que la mencionada en este trabajo y en animales adultos que no presentaban patologías subyacentes. La eficacia del CBD en cuanto a los trastornos del estado de ánimo depende en gran medida de la forma de administración así como de la edad de los animales en el momento del tratamiento (García-Gutiérrez et al., 2020).

En nuestro caso, se trataba más bien de estudiar si el efecto neuroprotector del CBD era capaz de evitar el desarrollo del cuadro tipo depresivo. Al no existir estudios previos en la literatura en relación con el desarrollo de un cuadro depresivo tras PAIS, no hay tampoco antecedentes sobre el posible papel de otros neuroprotectores en este sentido. En cualquier caso, probablemente un tratamiento crónico o subcrónico de CBD podría ser más efectivo en cuanto a la protección del sistema dopaminérgico. Por ejemplo, la administración de eritropoyetina a dosis altas durante tres días seguidos tras la inducción de un daño hipóxico-isquémico en ratas recién nacidas protege las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y evita las alteraciones motoras y cognitivas resultantes (McPherson & Juul, 2008)

## **Efectos sobre el cuadro hiperactivo**

Por otro lado, un mes después de la isquemia en el apartado neuroconductual el CBD sí mostró efectos sobre las alteraciones encontradas. El tratamiento con CBD no modificó el tiempo de inmovilidad encontrado en asociación al PAIS; sin embargo, logró reducir el tiempo dedicado a trepar respecto a lo observado en el tratado con vehículo, de modo que el tiempo dedicado a trepar fue similar al del grupo control. La reducción del tiempo de

inmovilidad en el FST con la administración de CBD se asocia con un efecto antidepresivo, es decir, ocurre cuando los animales muestran un comportamiento depresivo manifestado por un aumento del tiempo de inmovilidad (El-Alfy et al., 2010; Sartim et al., 2021). Es por ello por lo que es explicable que el CBD no fuera capaz de modificar el tiempo de inmovilidad (comportamiento tipo flotar) en nuestro modelo, ya que éste estaba reducido tras el PAIS. Sin embargo, sí se ha descrito que el CBD es capaz de aumentar el tiempo de inmovilidad previamente reducido por el uso de fluoxetina (Maciel et al., 2021). El no haber encontrado este aumento en nuestro estudio podría explicarse por el hecho de que los efectos de la fluoxetina se relacionan con el sistema serotoninérgico (Micheli et al., 2018; Pei et al., 2016; Wagner, 2015), en el que no encontramos alteraciones en nuestro modelo. Precisamente, en el FST el comportamiento natatorio y su ausencia se relacionan con el sistema serotoninérgico, mientras que los comportamientos tipo trepar se relacionan más con el sistema dopaminérgico (Slattery & Cryan, 2012). Respecto a lo observado en el OFT, de nuevo el grupo tratado con CBD obtuvo unos valores normales, similares a los del grupo control, tanto en lo relativo a la distancia recorrida como al número de entradas al centro del terreno. Estos resultados fueron en consonancia con lo descrito en la bibliografía en cuanto a los efectos del CBD reduciendo la hiperactividad (Khan et al., 2020; Ledesma et al., 2021; Samarut et al., 2019).

En cuanto a las alteraciones encontradas en los niveles de DA un mes después de la lesión, el CBD fue capaz de evitar la elevación de la concentración observada tras el PAIS; hasta llevarla a valores similares a los del grupo control. La activación de CB<sub>2</sub>, que está involucrado en los efectos neuroprotectores de CBD en el cerebro inmaduro (Martínez-Orgado et al., 2021) inhibe el disparo neuronal de DA en el VTA (Martínez-Orgado et al., 2021; Zhang et al., 2014). El CBD es capaz de revertir algunos de los efectos ocasionados por la cocaína (la cual causa un aumento de DA), como por ejemplo la hiperlocomoción asociada a esta sustancia (Ledesma et al., 2021). Sin embargo, estos efectos directos de CBD sobre la liberación de DA son poco probables en nuestro modelo, ya que el CBD se administró un mes antes.

En cuanto al efecto del CBD en el daño histológico observado a esta edad, el CBD no sólo preservó la recuperación de la densidad de neuronas DA en el VTA, sino que también evitó la pérdida de tamaño del núcleo, de modo que el área del VTA fue similar a los controles en los animales tratados con CBD, y superior al de los tratados con vehículo. Ambos datos apuntan a una normalización del número total de las neuronas dopaminérgicas. Teniendo en cuenta que a p14 el CBD no había evitado la reducción del número de neuronas DA tras el PAIS, este dato sugiere que el CBD tuvo un efecto protector sobre la regeneración de estas neuronas tras el daño. El efecto protector del CBD sobre la neuroregeneración está ampliamente descrito o en la literatura (Ceprián et al., 2019; García-Gutiérrez et al., 2020; F. Navarrete et al., 2021; Watt & Karl, 2017). Logra además una correcta actividad de estas neuronas, ya que este mayor tamaño del núcleo respecto al grupo tratado con vehículo no se correspondió con una mayor cantidad de DA.

A esta edad, el CBD también mostró eficacia a la hora de evitar la reducción de la expresión del receptor DAT, puesto que los valores del grupo tratado con CBD fueron similares a aquellos del grupo control y superiores a los del grupo tratado con vehículo. Es evidente que

la normalización del número de neuronas DA influiría en la normalización de la presencia de DAT, ya que éste se encontraría en los terminales presinápticos de las neuronas que se generen (García-Gutiérrez et al., 2020; F. Navarrete et al., 2021; Palermo & Ceravolo, 2019; Watt & Karl, 2017). No obstante, ya se ha comentado previamente que los datos obtenidos en los animales con PAIS sin tratamiento sugieren que también exista una alteración en las vías de síntesis del transportador. Si ese fuera el caso, el CBD también podría extender su efecto protector a la preservación de dichas vías. Este aspecto, sin embargo, no puede responderse en el presente estudio.

En cualquier caso, el hecho de que aumenten los niveles de DAT hasta asemejarse a los del grupo control, a su vez, explicaría la normalización de los niveles de DA, puesto que la recaptación se produciría en condiciones normales. Como ya se ha mencionado, la deficiencia en los niveles de DAT se asocia a comportamientos de tipo hiperactivo o impulsivo, por tanto parece coherente que la normalización de la expresión de este receptor en nuestro estudio se asocie con una normalización del comportamiento de estos animales tratados con CBD (Salatino-Oliveira et al., 2018).

Tomando todos estos datos obtenidos un mes después de la lesión en conjunto, se puede apreciar como el CBD fue capaz de preservar el tamaño del VTA a pesar de la lesión isquémica. Este efecto, adicionalmente, se correspondió con una mejor funcionalidad de estas neuronas dopaminérgicas, puesto que los niveles de DA encontrados fueron menores en el grupo de animales tratados con CBD que en aquel tratado con vehículo, en el que los niveles de dicho neurotransmisor estaban aberrantemente aumentados. La normalización de los niveles de DA por parte del CBD se tradujo en un comportamiento en concordancia, ya que en el FST se redujo el comportamiento de tipo trepar, asociado a la vía catecolaminérgica, así como la hiperactividad en el OFT.

A modo de resumen, el CBD no fue capaz de evitar las alteraciones del estado de ánimo tipo depresivo una semana después del daño, obteniendo resultados similares a los del grupo tratado con vehículo en cuanto a las pruebas neuroconductuales, a los niveles de DA (si bien redujo los de NA) y al daño histológico en el VTA. No obstante, este cannabinoide si fue eficaz para evitar las alteraciones del estado de ánimo tipo hiperactivo encontradas un mes después del daño. Redujo el comportamiento hiperactivo encontrado en las pruebas conductuales y, en consonancia, los niveles de DA respecto al grupo tratado con vehículo. Adicionalmente, evitó la pérdida de tamaño del VTA provocada por la lesión isquémica sin que esto implicase un aumento en los niveles de DA, significando una funcionalidad normalizada de las neuronas dopaminérgicas presentes en este núcleo

## **Efecto del VCE-004.8 en el daño isquémico**

Debido a que el CBD no consiguió una eficacia completa sobre las alteraciones analizadas, se planteó estudiar la eficacia de un derivado del CBD que potenciara alguna de sus propiedades neuroprotectoras. Se eligió el cannabinoide sintético VCE-004.8, ya que ésta modificación de la molécula de CBD consigue potenciar sus efectos antiinflamatorios al conseguir la activación directa tanto de CB<sub>2</sub> como de PPAR- $\gamma$  (del Río et al., 2016; García-Martín et al., 2021; C. Navarrete et al., 2020). La inflamación es un elemento importante del

daño cerebral secundario a PAIS (Ceprián Costoso, 2019; Ceprián et al., 2017) y también está implicado en las alteraciones cerebrales que subyacen a la depresión (Beurel et al., 2020; Colasanto et al., 2020; Kiecolt-Glaser et al., 2015). Además, el VCE-004.8 también muestra un potente perfil antioxidante (Burgaz et al., 2021; García-Martín et al., 2021; C. Navarrete et al., 2020), aspecto que como ya se ha explicado es de sumo interés en el caso del PAIS.

Una vez más, inicialmente fue necesario demostrar la eficacia protectora de este fármaco frente a los daños típicamente asociados al infarto cerebral isquémico, a fin de concluir si el uso del VCE-004.8 podía resultar una buena estrategia terapéutica.

El VCE-004.8 logró reducir el volumen de daño analizado mediante MRI una semana después del infarto. Este cannabinoide sintético ha probado previamente su eficacia en diferentes modelos de daño neurológico (Burgaz et al., 2021; C. Navarrete et al., 2018, 2020); sin embargo, hasta nuestro estudio no se había analizado previamente el efecto del mismo mediante técnicas de MRI. Cuantitativamente, el efecto del VCE-004.8 fue similar al observado con el CBD en este estudio y en otros previos (Ceprián et al., 2017; Del Pozo-Sanz, 2021; Pazos et al., 2012).

En cuanto al análisis microscópico del tejido mediante la técnica de TUNEL, también se comprobó la eficacia del VCE-004.8, puesto que el grupo tratado con éste mostró un nivel de muerte celular similar al grupo control una semana después del daño isquémico. También en este caso, el efecto del VCE-004.8 fue similar en términos cuantitativos al observado tras la administración de CBD en este estudio y otros (Barata et al., 2019; Ceprián et al., 2017; Pazos et al., 2012; Poignet et al., 1992).

En lo referente a las pruebas neuroconductuales, el tratamiento con VCE-004.8 mostró también un efecto neuroprotector similar al observado con el CBD en este estudio y otros previos (Ceprián et al., 2017; Del Pozo-Sanz, 2021; Pazos et al., 2012), tanto en las pruebas realizadas a medio a plazo como a largo plazo. La única excepción fue el test del agarre, en el que los resultados en animales con PAIS tratados con VCE-004.8 no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa respecto a los animales control. La ausencia de efecto en un test tan concreto, contradiciendo el resto de resultados, sugiere la existencia de alguna dificultad técnica en alguna de las evaluaciones de estos animales o la necesidad de incrementar el tamaño muestral para esa prueba en concreto. El VCE-004.8 ya ha demostrado su eficacia evitando la aparición de hemiparesia, según se estudia mediante el test del cilindro, en modelos de Parkinson (Burgaz et al., 2021).

En resumen, el VCE-004.8 mostró un potente efecto neuroprotector, similar al observado y descrito para el CBD (Barata et al., 2019; Ceprián et al., 2017; Del Pozo-Sanz, 2021; Martínez-Orgado et al., 2021; Pazos et al., 2012). No fue posible demostrar una potenciación de los efectos neuroprotectores del CBD tras la transformación de su molécula, debido a que el CBD consiguió una eficacia cercana al 100% en la mayoría de las pruebas. En el caso del volumen de infarto, el hecho de que el VCE-004.8 se administrara *a posteriori* de la inducción de la lesión puede representar para esta molécula la misma limitación que para el CBD, esto es, que la acción neuroprotectora se inicie cuando la lesión de la zona del núcleo del infarto ya está desarrollada.

## Efecto del VCE-004.8 en el estado de ánimo

Como ya se ha mencionado, este fármaco tiene especial interés por su potente efecto antiinflamatorio y su reducción del estrés oxidativo, pero también por haber demostrado previamente su eficacia en modelos que implicaron una alteración del sistema dopaminérgico (Burgaz et al., 2021).

Evalutando el comportamiento relativo a los trastornos del estado anímico una semana después del daño se encontró cómo, al igual que el CBD, el VCE-004.8 no fue capaz de evitar el comportamiento tipo depresivo. Es decir, que la potenciación de la actividad antiinflamatoria no mejoró los resultados obtenidos con CBD. No hay referencias en la bibliografía que describan la eficacia de este cannabinoide en este sentido. Sin embargo, tanto CBD como VCE-004.8 han demostrado efectos protectores sobre las neuronas dopaminérgicas en otros paradigmas de daño cerebral (Burgaz et al., 2021; Giuliano et al., 2021; Lastres-Becker et al., 2005; Patricio et al., 2020), basados en su potente efecto antioxidante y antiinflamatorio. Estos datos sugieren que las neuronas dopaminérgicas del animal inmaduro podrían ser tan especialmente vulnerables a ambos factores que ni siquiera CBD o VCE-004.8 serían capaces de evitar su daño inicial. También es posible que esta gran susceptibilidad implique que las neuronas dopaminérgicas sean dañadas en los primeros momentos del daño isquémico, antes de que los tratamientos fueran administrados, de modo que igual que CBD y VCE-004.8 no evitaron completamente la aparición de una zona de infarto, no habrían podido evitar una destrucción tan precoz de las esas neuronas. Pero también sería posible la existencia de otros mecanismos, independientes de los dos citados, que conduzcan a la muerte de estas neuronas específicas. Estos aspectos son, indudablemente, merecedores de futuros estudios.

Un mes después de la lesión, en el OFT, se encontró una reversión del comportamiento patológico asociado al PAIS en los animales tratados con VCE-004.8. Los animales tratados con este cannabinoide recorrieron una menor distancia y entraron un menor número de veces al centro de la arena, equiparando ambos valores al grupo control. Estos resultados también fueron similares a los obtenidos tras la administración de CBD, e indican que el efecto neuroprotector del VCE-004.8 también tuvo como resultado la prevención del desarrollo del comportamiento hiperactivo a largo plazo. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con CBD, en el FST el tratamiento con VCE-004.8 no modificó el comportamiento tipo trepar observado tras el PAIS, y que se adscribe a un comportamiento hiperactivo. Aunque el desempeño de los animales en ambas pruebas neuroconductuales no tiene por qué estar relacionado (Unal & Canbeyli, 2019), también en este caso la aparente contradicción entre los resultados de FST y OFT pueden sugerir problemas metodológicos. Pero también abren la posibilidad de que la transformación de la molécula de CBD, aunque potencie los efectos antiinflamatorios, pudiera menoscabar otro tipo de acciones beneficiosas del CBD. Este aspecto, que excede los límites de este proyecto de Tesis, exigiría un estudio comparativo de ambos fármacos en diferentes paradigmas de daño cerebral.

## Visión integrada de los diferentes tratamientos

Por tanto, reuniendo el conocimiento adquirido a través del análisis del propio modelo, así como de los distintos tratamientos, se pueden obtener diferentes lecciones.

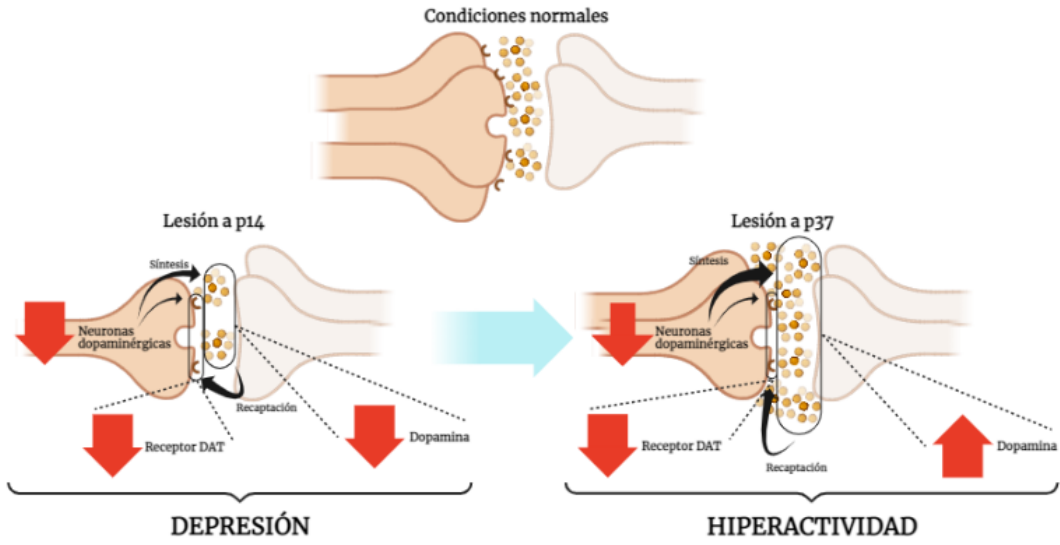
El hecho de que, asociado al daño isquémico, se hallara un comportamiento tipo depresivo una semana después de la lesión en relación con un descenso en los niveles de DA, de las neuronas dopaminérgicas del VTA y de la expresión de DAT, que dos estrategias terapéuticas con un marcado carácter neuroprotector como son el CBD y el VCE-004.8 no fueron capaces de revertir, dan a entender que estos tratamientos no fueron suficientes para prevenir la muerte de las neuronas dopaminérgicas, especialmente vulnerables a este daño. Por tanto, a pesar de estas estrategias terapéuticas, una semana después del daño las neuronas dopaminérgicas del VTA continuarían estando disminuidas y por tanto también los niveles de DA que estas sintetizan y los receptores DAT presentes en sus terminales presinápticos. Por otro lado, un aumento de la cantidad de DA disponible, producido mediante la administración de GBR 12909 contrarrestó la sintomatología depresiva en p14 asociada al daño, confirmando la implicación de esta reducción de los niveles de DA en el comportamiento tipo depresivo de los animales lesionado, puesto que únicamente con el aumento de esta, sin una neuroprotección asociada a este inhibidor de la recaptación, se evitó esta alteración del estado de ánimo. Los resultados con los neuroprotectores avalan de alguna manera lo discutido previamente, en el sentido de que el estado tipo depresivo tras el PAIS pudiera influir en el rendimiento motor evaluado. Así, tratamientos neuroprotectores que normalizaron el rendimiento funcional a largo plazo mostraron unos resultados mucho más pobres en los estudios a medio plazo, asociado a su ausencia de efecto antidepresivo. Sin embargo, un fármaco con efecto antidepresivo sí consiguió normalizar el rendimiento funcional en ese momento, de manera superior a la de los neuroprotectores, sin ningún beneficio a largo plazo. De extrapolarse estos datos a la clínica, representaría un punto de enorme interés tanto para mejorar la recuperación de los niños afectados como para evitar interpretaciones erróneas del estado funcional del niño, que podrían ensombrecer sesgadamente su pronóstico.

Por otro lado, los tratamientos neuroprotectores (CBD y VCE-004.8) fueron capaces de mostrar eficacia a la hora de revertir la sintomatología hiperactiva encontrada un mes después de la lesión. Los datos obtenidos relativos al tratamiento con CBD dieron a entender que estos tratamientos fueron capaces de proteger la regeneración de las neuronas dopaminérgicas, puesto que el número de estas un mes después del daño se encontró normalizado. La normalización del número de neuronas dopaminérgicas se acompañó de una normalización también en cuanto a la expresión de DAT, presente en los terminales presinápticos de estas neuronas. Este aumento en la expresión de DAT que logró el tratamiento, puesto que en los animales lesionados se encontró reducido, estaría también relacionado con la normalización en los niveles de DA encontrada en relación con el tratamiento. Al aumentar los niveles de DAT hasta igualarse con el grupo control, se produciría una mayor recaptación de DA, por tanto, se evitaría el aumento de los niveles de dicho neurotransmisor encontrado a esta edad en los animales lesionados tratados con vehículo. Todo ello justificaría la eficacia de estos tratamientos en cuanto al comportamiento hiperactivo encontrado a esta edad. El tratamiento con GBR 12909 no

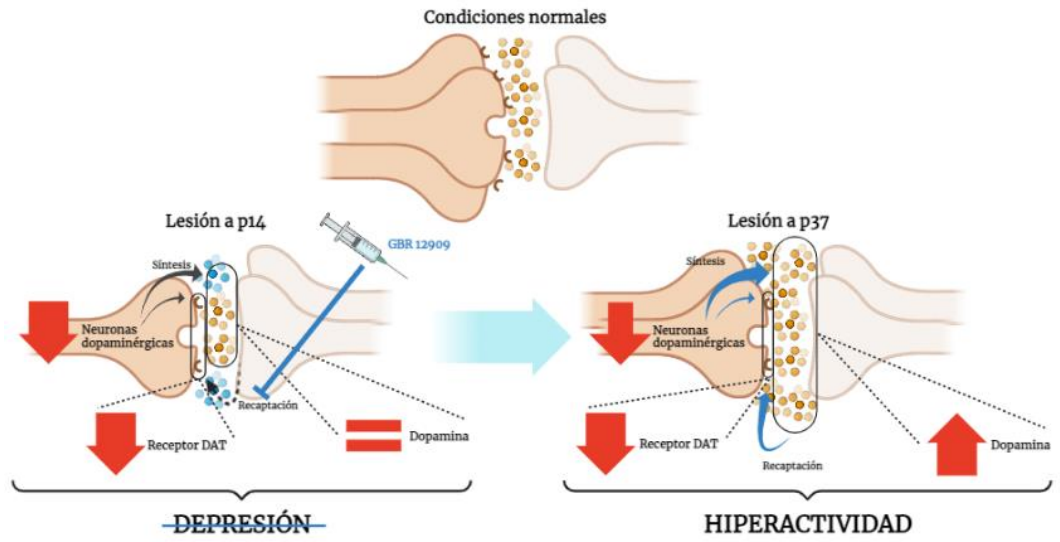
evitó la presencia de este tipo de comportamiento hiperactivo un mes después de la lesión, indicando que únicamente actuar sobre los niveles de DA cuando estos se encontraron reducidos no fue suficiente para evitar la descompensación del sistema, sino que fue necesario un efecto neuroprotector para lograr revertir estas secuelas a largo plazo, así como los mecanismos subyacentes.

Estos datos confirman la necesidad de emplear tratamiento neuroprotectores tras un PAIS. Pero también abren la posibilidad de utilidad de un tratamiento antidepresivo en una época tan sensible como la primera infancia. Sería necesario estudiar con más detalle la posible influencia de ese cuadro depresivo tras un PAIS en la capacidad de aprendizaje y de recuperación funcional, para confirmar así la importancia de dicho tratamiento antidepresivo.

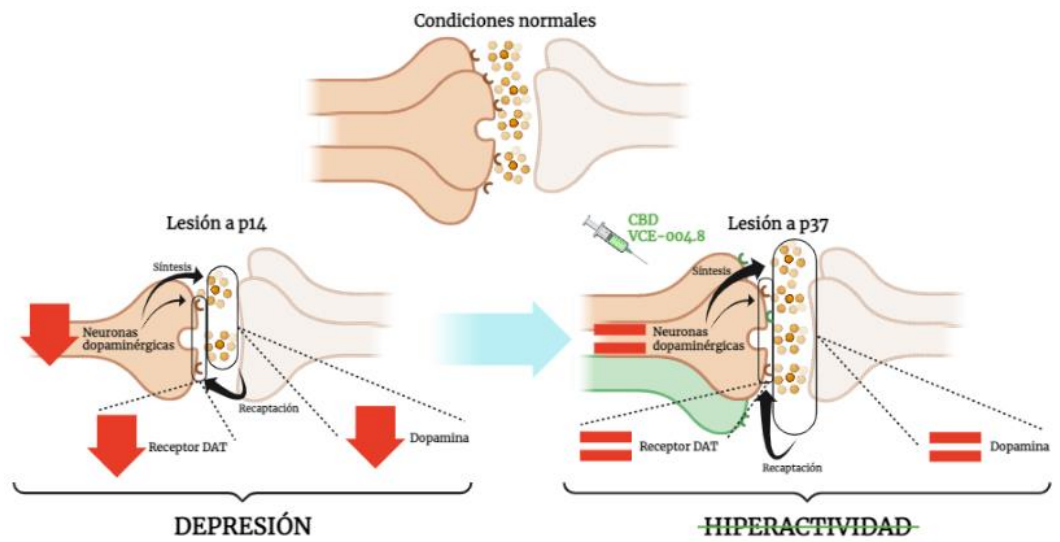
**A**



**B**



**C**



# CONCLUSIONES





Por tanto, las conclusiones de este trabajo fueron:

1. El modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas neonatas empleado en este trabajo reprodujo correctamente las consecuencias del infarto cerebral neonatal. El daño típico asociado a la isquemia se comprobó mediante:
  - a. Imagen de Resonancia Magnética. Obteniendo un porcentaje de volumen de lesión que se mantuvo en el tiempo y fue similar al encontrado previamente en este modelo y en la clínica.
  - b. Técnicas neuroconductuales, tanto a corto como a largo plazo que revelaron alteraciones motoras características de este daño.
  - c. La técnica de TUNEL, en la cual se comprobó un aumento de la muerte celular en la zona perilesional.
  
2. El daño cerebral isquémico condujo en los animales afectados a alteraciones del estado de ánimo tanto a corto como a largo plazo.
  - a. A corto plazo se halló un comportamiento tipo depresivo.
  - b. A largo plazo se halló un comportamiento tipo hiperactivo.
  
3. Los mecanismos por los que se produjeron estas alteraciones del estado de ánimo asociadas al modelo tanto a corto como a largo plazo fueron los siguientes:
  - a. A corto plazo se produjo una disminución de los niveles de dopamina, así como del número de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral y de la expresión del transportador de dopamina. Esto explicaría la sintomatología tipo depresiva encontrada.
  - b. En consonancia, la administración del inhibidor de la recaptación de dopamina GBR 12909 evitó la presencia del comportamiento tipo depresivo.
  - c. A largo plazo se produjo un aumento de los niveles de dopamina pese a la persistencia de una disminución del número total de neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral y de la expresión del transportador de dopamina. Esto podría explicar la sintomatología tipo hiperactiva encontrada.
  - d. En este caso, la administración de GBR 12909 alrededor de p14 no tuvo consecuencias sobre el desarrollo de alteraciones del estado de ánimo de tipo hiperactivo a largo plazo.
  
4. El tratamiento con cannabidiol tuvo un efecto diverso sobre las alteraciones del estado de ánimo encontradas en asociación al modelo.
  - a. A corto plazo el cannabidiol no fue capaz de mostrar efecto sobre el comportamiento tipo depresivo observado a esta edad.
  - b. A largo plazo el cannabidiol sí mostró eficacia en cuando a la reducción del comportamiento hiperactivo observado a esta edad.
  
5. Los mecanismos por los que el cannabidiol produjo su efecto sobre las alteraciones del estado de ánimo fueron los siguientes:

- a. El cannabidiol no fue capaz de preservar las neuronas dopaminérgicas una semana después del daño. Por tanto, tampoco fue capaz de normalizar los niveles de dopamina ni del transportador de dopamina a esta edad. Pudiendo explicar esta falta de efecto la ausencia de eficacia del cannabidiol para tratar la sintomatología depresiva encontrada en este punto temporal.
  - b. El cannabidiol fue capaz de proteger la regeneración de las neuronas dopaminérgicas, de modo que un mes después de la lesión, el número de estas neuronas estaba normalizado, al igual que los niveles de dopamina y del transportador de dopamina. Esta normalización del sistema dopaminérgico podría explicar la eficacia del cannabidiol sobre las alteraciones del estado de ánimo encontradas en este punto temporal.
6. El cannabinoide VCE-004.8, administrado tras la inducción del daño, mostró un potente perfil neuroprotector, similar al del CBD
7. El VCE-004.8 tuvo efectos diversos sobre las alteraciones del estado ánimo descritas en asociación al modelo.
  - a. A corto plazo este fármaco no mostró eficacia sobre la sintomatología depresiva observada
  - b. A largo plazo mostró eficacia reduciendo la hiperactividad encontrada en la prueba de campo abierto, pero no en la de natación forzada
8. Los resultados de los distintos tratamientos sugieren que la presencia de un cuadro tipo depresivo a medio plazo tras un infarto cerebral podría ser un factor determinante en el rendimiento en las pruebas neurofuncionales de tipo motor.

# ANEXO





Para el diseño experimental número 4 se utilizó un derivado sintético del CBD, el VCE-004.8 (Emerald Health Pharmaceuticals) (VCE). En este caso, al ser la primera vez que se testaba este fármaco en este modelo, inicialmente se realizaron pruebas tanto de dosis como de ventana terapéutica. Para ello, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en los siguientes grupos experimentales:

**SHAM:** Animales no ocluidos tratados con vehículo.

**MCAO+VEH:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media tratados con vehículo.

-Para la prueba de dosis (con múltiples dosis):

**MCAO+VCE 1:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con 3 dosis de VCE, a los 30 minutos, 24 horas y 48 horas después de la lesión, a una dosis de 1 mg/Kg.

**MCAO+VCE 5:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con 3 dosis de VCE, a los 30 minutos, 24 horas y 48 horas después de la lesión, a una dosis de 5 mg/Kg.

**MCAO+VCE 10:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con 3 dosis de VCE, a los 30 minutos, 24 horas y 48 horas después de la lesión, a una dosis de 10 mg/Kg.

-Para la prueba de dosis (con una única dosis):

**MCAO+VCE 5SD:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con una única dosis de VCE a los 30 minutos después de la lesión y a una dosis de 5 mg/Kg.

**MVS10+VCE 10SD:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con una única dosis de VCE a los 30 minutos después de la lesión y a una dosis de 10 mg/Kg.

-Para la prueba de ventana terapéutica:

**MCAO+VCE 18H:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con una única dosis de VCE a las 18 horas después de la lesión y a una dosis de 5 mg/Kg.

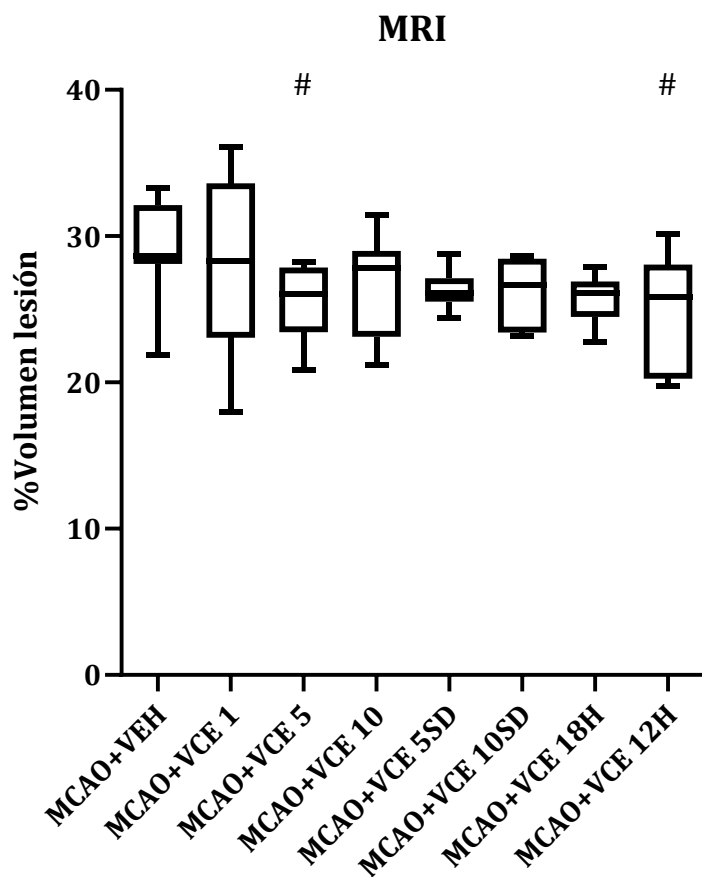
**MCAO+VCE 12H:** Animales a los cuales se les practicó la oclusión de la arteria cerebral media, tratados con una única dosis de VCE a las 12 horas después de la lesión y a una dosis de 5 mg/Kg.

Los animales fueron, en todos los casos, tratados vía intraperitoneal y con un volumen de 100µl. Tanto en el grupo SHAM como en el grupo MCAO se administró un vehículo preparado de la misma forma que el fármaco a excepción de la presencia del mismo. Se administró el fármaco (VCE) a animales SHAM para comprobar un posible efecto de este. No se encontraron resultados que demuestren diferencias entre el grupo SHAM tratado con vehículo y aquel tratado con el fármaco, por lo que se consideró únicamente el grupo SHAM.

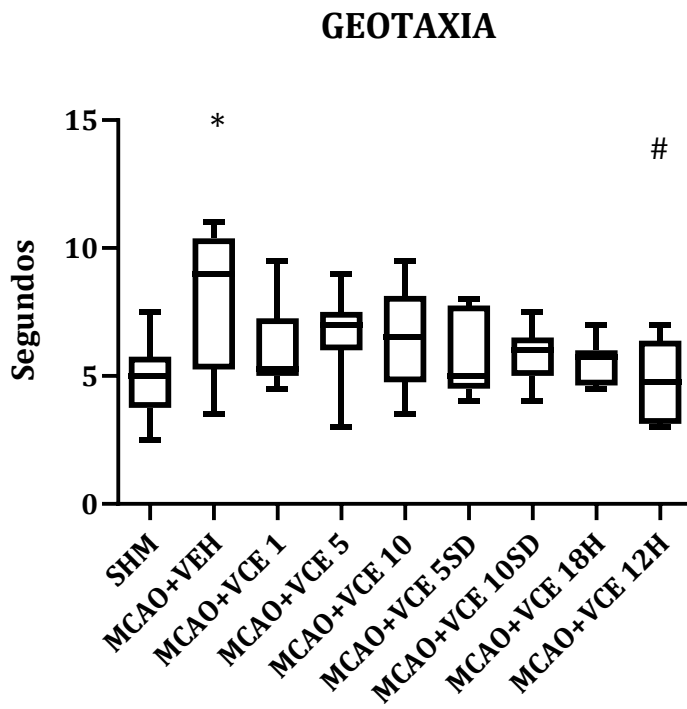
**Tabla A. 1.** Distribución de los grupos MCAO tratados con VCE según el tratamiento.

NOMBRE	FÁRMACO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS	TIEMPO
MCAO+VCE 1	VCE	Intraperitoneal	1 mg/Kg	30 min, 24 h, 48 h
MCAO+VCE 5	VCE	Intraperitoneal	5 mg/Kg	30 min, 24 h, 48 h
MCAO+VCE 10	VCE	Intraperitoneal	10 mg/Kg	30 min, 24 h, 48 h
MCAO+VCE 5SD	VCE	Intraperitoneal	5 mg/Kg	30 min
MCAO+VCE 10SD	VCE	Intraperitoneal	10 mg/Kg	30 min
MCAO+VCE 18H	VCE	Intraperitoneal	5 mg/Kg	18 h
MCAO+VCE 12H	VCE	Intraperitoneal	5 mg/Kg	12 h

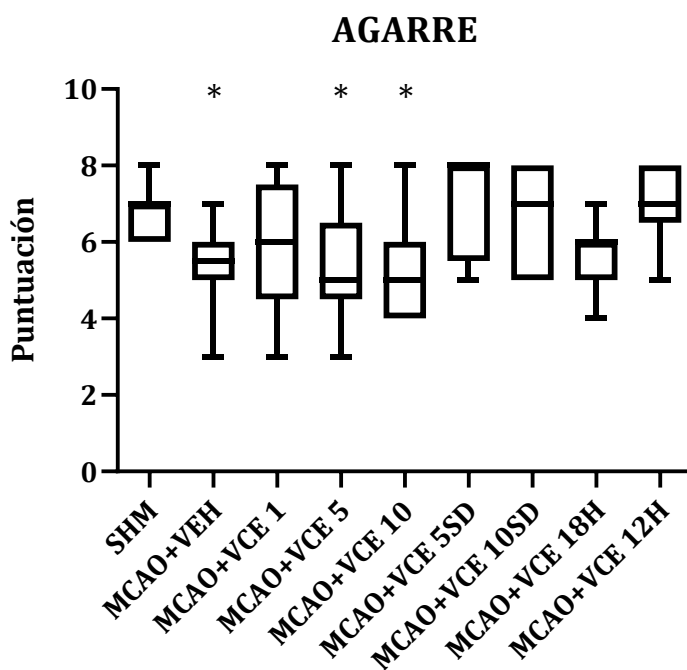
Se obtuvieron los siguientes resultados.



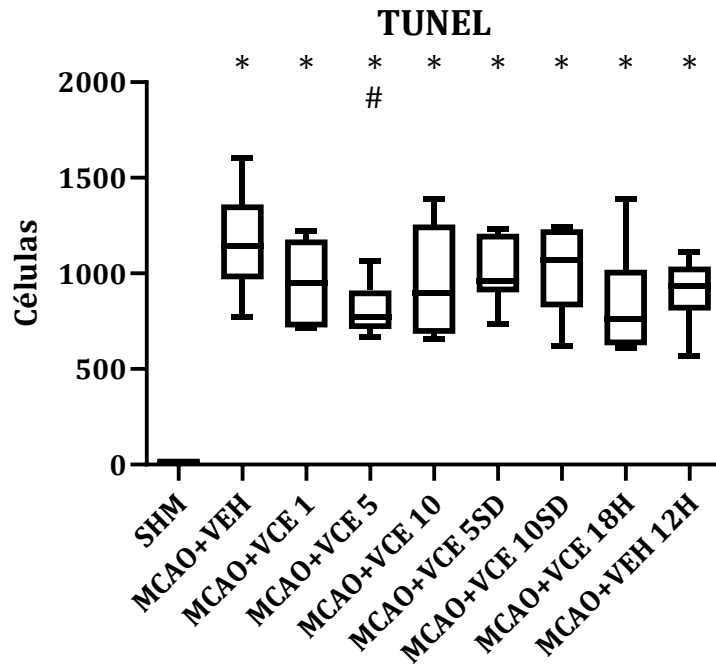
**Figura A. 1.** Porcentaje de volumen de lesión de los diferentes grupos analizados. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. ( $n=12-6$ ).



**Figura A. 2.** Segundos requeridos para realizar el test de geotaxia inversa. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. (n=13-8).



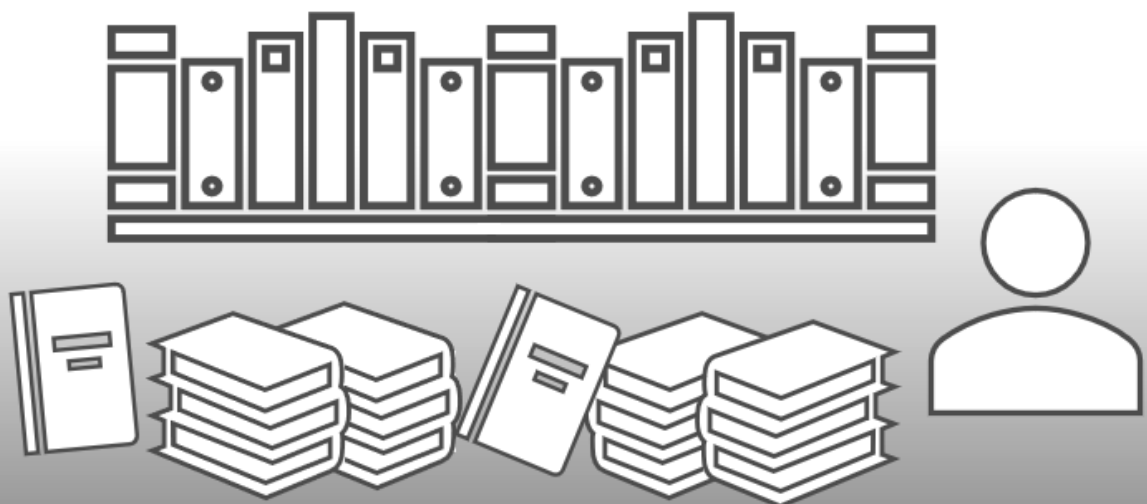
**Figura A. 3.** Puntuación en el test de agarre. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM. (n=13-8).



**Figura A. 4.** Número de células TUNEL+. Mediana, rango intercuartílico y percentiles 5 a 95. \* valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo SHAM, # valor de  $p < 0,05$  respecto al grupo MCAO. ( $n=6-9$ ).

Ya que la administración múltiple de la dosis 5 mg/Kg mostró eficacia, bien parcial o total, en todos los parámetros analizados (a excepción del test de agarre) se propuso esta forma de administración como la más apropiada.

# BIBLIOGRAFÍA





- Altamentova, S., Rumajogee, P., Hong, J., Beldick, S. R., Park, S. J., Yee, A., & Fehlings, M. G. (2020). Methylprednisolone Reduces Persistent Post-ischemic Inflammation in a Rat Hypoxia-Ischemia Model of Perinatal Stroke. *Translational Stroke Research*, *11*(5), 1117-1136. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00792-2>
- Álvarez-García, M., Cuellar-Flores, I., Sierra-García, P., & Martínez-Orgado, J. (2022). Mood disorders in children following neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PLOS ONE*, *17*(1), e0263055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263055>
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L. R., Donnan, G. A., & Hennerici, M. G. (2009). Classification of Stroke Subtypes. *Cerebrovascular Diseases*, *27*(5), 493-501. <https://doi.org/10.1159/000210432>
- Ano, Y., Ohya, R., & Kondo, K. (2019). Antidepressant-Like Effect of  $\beta$ -Lactolin, a Glycine-Threonine-Tryptophan-Tyrosine Peptide. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *65*(5), 430-434. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.430>
- Arauchi, R., Hashioka, S., Tsuchie, K., Miyaoka, T., Tsumori, T., Limoa, E., Azis, I. A., Oh-Nishi, A., Miura, S., Otsuki, K., Kanayama, M., Izuhara, M., Nagahama, M., Kawano, K., Araki, T., Liaury, K., Abdullah, R. A., Wake, R., Hayashida, M., ... Horiguchi, J. (2018). Gunn rats with glial activation in the hippocampus show prolonged immobility time in the forced swimming test and tail suspension test. *Brain and Behavior*, *8*(8), e01028. <https://doi.org/10.1002/brb3.1028>
- Ardalan, M., Chumak, T., Vexler, Z., & Mallard, C. (2019). Sex-Dependent Effects of Perinatal Inflammation on the Brain: Implication for Neuro-Psychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2270. <https://doi.org/10.3390/ijms20092270>
- Armstrong-Wells, J., & Ferriero, D. M. (2014). Diagnosis and acute management of perinatal arterial ischemic stroke. *Neurology: Clinical Practice*, *4*(5), 378-385. <https://doi.org/10.1212/CPJ.0000000000000077>

- Arzimanoglou, A., Brandl, U., Cross, J. H., Gil-Nagel, A., Lagae, L., Landmark, C. J., Specchio, N., Nabbout, R., Thiele, E. A., Gubbay, O., The Cannabinoids International Experts Panel, null, & Collaborators. (2020). Epilepsy and cannabidiol: A guide to treatment. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, *22*(1), 1-14.  
<https://doi.org/10.1684/epd.2020.1141>
- Barata, L., Arruza, L., Rodríguez, M.-J., Aleo, E., Vierge, E., Criado, E., Sobrino, E., Vargas, C., Ceprián, M., Gutiérrez-Rodríguez, A., Hind, W., & Martínez-Orgado, J. (2019). Neuroprotection by cannabidiol and hypothermia in a piglet model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, *146*, 1-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.020>
- Bariselli, S., Glangetas, C., Tzanoulinou, S., & Bellone, C. (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *Journal of Neurochemistry*, *139*(6), 1071-1080. <https://doi.org/10.1111/jnc.13779>
- Benders, M. J. N. L., Groenendaal, F., & De Vries, L. S. (2009). Preterm arterial ischemic stroke. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, *14*(5), 272-277.  
<https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.07.002>
- Berke, J. (2018). What does dopamine mean? *Nature neuroscience*, *21*(6), 787-793.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0152-y>
- Bernson-Leung, M. E., Boyd, T. K., Meserve, E. E., Danehy, A. R., Kapur, K., Trenor, C. C., Lehman, L. L., & Rivkin, M. J. (2018). Placental Pathology in Neonatal Stroke: A Retrospective Case-Control Study. *The Journal of Pediatrics*, *195*, 39-47.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.11.061>
- Bernson-Leung, M. E., & Rivkin, M. J. (2016). Stroke in Neonates and Children. *Pediatrics in Review*, *37*(11), 463-477. <https://doi.org/10.1542/pir.2016-0002>
- Berrigan, P., Hodge, J., Kirton, A., Moretti, M. E., Ungar, W. J., & Zwicker, J. D. (2021). Protocol for a cost–utility analysis of neurostimulation and intensive camp-based therapy for

- children with perinatal stroke and hemiparesis based on a multicentre clinical trial. *BMJ Open*, *11*(1), e041444. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041444>
- Beurel, E., Toups, M., & Nemeroff, C. B. (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron*, *107*(2), 234-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.002>
- Bishnoi, I. R., Ossenkopp, K.-P., & Kavaliers, M. (2021). Sex and age differences in locomotor and anxiety-like behaviors in rats: From adolescence to adulthood. *Developmental Psychobiology*, *63*(3), 496-511. <https://doi.org/10.1002/dev.22037>
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: Effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*, *134*(4), 845-852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Biswas, A., Mankad, K., Shroff, M., Hanagandi, P., & Krishnan, P. (2020). Neuroimaging Perspectives of Perinatal Arterial Ischemic Stroke. *Pediatric Neurology*, *113*, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.011>
- Blessing, E. M., Steenkamp, M. M., Manzanares, J., & Marmar, C. R. (2015). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *12*(4), 825-836. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0387-1>
- Bonfanti, L., & Charvet, C. J. (2021). Brain Plasticity in Humans and Model Systems: Advances, Challenges, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9358. <https://doi.org/10.3390/ijms22179358>
- Borjini, N., Sivilia, S., Giuliani, A., Fernandez, M., Giardino, L., Facchinetti, F., & Calzà, L. (2019). Potential biomarkers for neuroinflammation and neurodegeneration at short and long

- term after neonatal hypoxic-ischemic insult in rat. *Journal of Neuroinflammation*, *16*, 194. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1595-0>
- Bosenbark, D. D., Krivitzky, L., Ichord, R., Jastrzab, L., & Billinghamurst, L. (2018). Attention and executive functioning profiles in children following perinatal arterial ischemic stroke. *Child Neuropsychology: A Journal on Normal and Abnormal Development in Childhood and Adolescence*, *24*(1), 106-123. <https://doi.org/10.1080/09297049.2016.1225708>
- Bouet, V., Freret, T., Ankri, S., Bezault, M., Renolleau, S., Boulouard, M., Jacotot, E., Chauvier, D., & Schumann-Bard, P. (2010). Predicting sensorimotor and memory deficits after neonatal ischemic stroke with reperfusion in the rat. *Behavioural Brain Research*, *212*(1), 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.043>
- Brima, T., Mikulecká, A., & Otáhal, J. (2013). Impacts of perinatal induced photothrombotic stroke on sensorimotor performance in adult rats. *Physiological Research*, *62*(1), 85-94. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932447>
- Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke*, *40*(5), e331-e339. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531632>
- Buddenberg, T. E., Topic, B., Mahlberg, E. D., de Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Mattern, C. (2008). Behavioral actions of intranasal application of dopamine: Effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters. *Neuropsychobiology*, *57*(1-2), 70-79. <https://doi.org/10.1159/000135640>
- Burgaz, S., García, C., Gómez-Cañas, M., Rolland, A., Muñoz, E., & Fernández-Ruiz, J. (2021). Neuroprotection with the Cannabidiol Quinone Derivative VCE-004.8 (EHP-101) against 6-Hydroxydopamine in Cell and Murine Models of Parkinson's Disease. *Molecules*, *26*(11), 3245. <https://doi.org/10.3390/molecules26113245>
- Cabana-Domínguez, J., Torrico, B., Reif, A., Fernández-Castillo, N., & Cormand, B. (2022). Comprehensive exploration of the genetic contribution of the dopaminergic and

- serotonergic pathways to psychiatric disorders. *Translational Psychiatry*, 12, 11.  
<https://doi.org/10.1038/s41398-021-01771-3>
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Sonogo, A. B., & Guimarães, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research*, 112, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>
- Campos, A. C., Moreira, F. A., Gomes, F. V., Del Bel, E. A., & Guimarães, F. S. (2012). Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1607), 3364-3378. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0389>
- Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., & Gould, T. D. (2012). The Tail Suspension Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 59, 3769.  
<https://doi.org/10.3791/3769>
- Cao, G., Meng, G., Zhu, L., Zhu, J., Dong, N., Zhou, X., Zhang, S., & Zhang, Y. (2021). Susceptibility to chronic immobilization stress-induced depressive-like behaviour in middle-aged female mice and accompanying changes in dopamine D1 and GABAA receptors in related brain regions. *Behavioral and Brain Functions : BBF*, 17, 2.  
<https://doi.org/10.1186/s12993-021-00175-z>
- Castillo, A., Tolón, M. R., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., & Martínez-Orgado, J. (2010). The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiology of Disease*, 37(2), 434-440. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.023>
- Celorrio, M., Rojo-Bustamante, E., Fernández-Suárez, D., Sáez, E., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Müller, C. E., Ramírez, M. J., Oyarzábal, J., Franco, R., & Aymerich, M. S. (2017). GPR55: A therapeutic target for Parkinson's disease? *Neuropharmacology*, 125, 319-332. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.017>

- Ceprián Costoso, M. (2019). *Caracterización de los efectos neuroprotectores del cannabidiol en el daño cerebral hipóxico-isquémico neonatal* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Complutense de Madrid].  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=221413>
- Ceprián, M., Jiménez-Sánchez, L., Vargas, C., Barata, L., Hind, W., & Martínez-Orgado, J. (2017). Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. *Neuropharmacology*, *116*, 151-159.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.12.017>
- Ceprián, M., Vargas, C., García-Toscano, L., Penna, F., Jiménez-Sánchez, L., Achicallende, S., Elezgarai, I., Grandes, P., Hind, W., Pazos, M. R., & Martínez-Orgado, J. (2019). Cannabidiol Administration Prevents Hypoxia-Ischemia-Induced Hypomyelination in Newborn Rats. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1131.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01131>
- Chabrier, S., Husson, B., Dinomais, M., Landrieu, P., & Nguyen The Tich, S. (2011). New insights (and new interrogations) in perinatal arterial ischemic stroke. *Thrombosis Research*, *127*(1), 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.10.003>
- Chang, Y. S., Mu, D., Wendland, M., Sheldon, R. A., Vexler, Z. S., McQuillen, P. S., & Ferriero, D. M. (2005). Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatric Research*, *58*(1), 106-111.  
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000163616.89767.69>
- Charriaut-Marlangue, C., & Baud, O. (2018). A Model of Perinatal Ischemic Stroke in the Rat: 20 Years Already and What Lessons? *Frontiers in Neurology*, *9*, 650.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00650>
- Chemerinski, E., Robinson, R. G., & Kosier, J. T. (2001). Improved recovery in activities of daily living associated with remission of poststroke depression. *Stroke*, *32*(1), 113-117.  
<https://doi.org/10.1161/01.str.32.1.113>

- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), 942-946.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00011-2)
- Clark, G. F., & Kingsley, K. L. (2020). Occupational Therapy Practice Guidelines for Early Childhood: Birth–5 Years. *The American Journal of Occupational Therapy*, 74(3), 7403397010p1-7403397010p42. <https://doi.org/10.5014/ajot.2020.743001>
- Clive, B., Vincer, M., Ahmad, T., Khan, N., Afifi, J., & El-Naggar, W. (2020). Epidemiology of neonatal stroke: A population-based study. *Paediatrics & Child Health*, 25(1), 20-25.  
<https://doi.org/10.1093/pch/pxy194>
- Crossen, M. H., van Ommen, C. H., & Appel, I. M. (2009). Etiology and treatment of perinatal stroke; a role for prothrombotic coagulation factors? *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 14(5), 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.07.004>
- Colasanto, M., Madigan, S., & Korczak, D. J. (2020). Depression and inflammation among children and adolescents: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 277, 940-948.  
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.09.025>
- Colloby, S. J., McParland, S., O'Brien, J. T., & Attems, J. (2012). Neuropathological correlates of dopaminergic imaging in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 9), 2798-2808. <https://doi.org/10.1093/brain/aws211>
- Crippa, J. A., Guimarães, F. S., Campos, A. C., & Zuardi, A. W. (2018). Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Frontiers in Immunology*, 9, 2009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02009>

- Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews. Neurology*, *16*(1), 9-29. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>
- Dafer, R. M., Rao, M., Shareef, A., & Sharma, A. (2008). Poststroke depression. *Topics in Stroke Rehabilitation*, *15*(1), 13-21. <https://doi.org/10.1310/tsr1501-13>
- Das, J., & G K, R. (2018). Post stroke depression: The sequelae of cerebral stroke. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *90*, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.04.005>
- Daut, R. A., & Fonken, L. K. (2019). Circadian regulation of depression: A role for serotonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *54*, 100746. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.04.003>
- de Souza Silva, M. A., Topic, B., Huston, J. P., & Mattern, C. (2008). Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. *Synapse (New York, N.Y.)*, *62*(3), 176-184. <https://doi.org/10.1002/syn.20484>
- Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*, *27*, 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
- Del Campo, N., Chamberlain, S. R., Sahakian, B. J., & Robbins, T. W. (2011). The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, *69*(12), e145-157. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.02.036>
- Del Pozo, A., Villa, M., Vargas, C., Castejón, D., Fernández-Valle, M. E., Gutiérrez-Rodríguez, A., & Martínez-Orgado, J. (2022). Intraventricular hemorrhage induces inflammatory brain damage with blood–brain barrier dysfunction in immature rats. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1038/s41390-022-02062-3>

- Del Pozo-Sanz, A. (2021). *Efecto del cannabidiol sobre la hemorragia de la matriz germinal producida en neonatos prematuros* (p. 1) [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Complutense de Madrid].  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=290795>
- del Río, C., Navarrete, C., Collado, J. A., Bellido, M. L., Gómez-Cañas, M., Pazos, M. R., Fernández-Ruiz, J., Pollastro, F., Appendino, G., Calzado, M. A., Cantarero, I., & Muñoz, E. (2016). The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and CB2 pathways. *Scientific Reports*, 6, 21703.  
<https://doi.org/10.1038/srep21703>
- Dell'Osso, L., Carmassi, C., Mucci, F., & Marazziti, D. (2016). Depression, Serotonin and Tryptophan. *Current Pharmaceutical Design*, 22(8), 949-954.  
<https://doi.org/10.2174/1381612822666151214104826>
- Derugin, N., Dingman, A., Wendland, M. F., Fox, C., Bollen, A., & Vexler, Z. S. (2005). Magnetic resonance imaging as a surrogate measure for histological sub-chronic endpoint in a neonatal rat stroke model. *Brain Research*, 1066(1-2), 49-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.10.043>
- Derugin, N., Ferriero, D. M., & Vexler, Z. S. (1998). Neonatal reversible focal cerebral ischemia: A new model. *Neuroscience Research*, 32(4), 349-353. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(98\)00096-0](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(98)00096-0)
- Derugin, N., Wendland, M., Muramatsu, K., Roberts, T. P., Gregory, G., Ferriero, D. M., & Vexler, Z. S. (2000). Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke*, 31(7), 1752-1761.  
<https://doi.org/10.1161/01.str.31.7.1752>
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W. G., Martinez-Orgado, J., Robson, P. J., Rohrback, B. G.,

- Thiele, E., Whalley, B., & Friedman, D. (2014). Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791-802. <https://doi.org/10.1111/epi.12631>
- Di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12(4), 692-698. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6>
- DiMaio, S., Grizenko, N., & Joober, R. (2003). Dopamine genes and attention-deficit hyperactivity disorder: A review. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 28(1), 27-38.
- Dong, L., Williams, L. S., Briceno, E., Morgenstern, L. B., & Lisabeth, L. D. (2022). Longitudinal assessment of depression during the first year after stroke: Dimensionality and measurement invariance. *Journal of Psychosomatic Research*, 153, 110689. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2021.110689>
- Douma, E. H., & de Kloet, E. R. (2020). Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 108, 48-77. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.015>
- Drechsler, R., Brem, S., Brandeis, D., Grünblatt, E., Berger, G., & Walitza, S. (2020). ADHD: Current Concepts and Treatments in Children and Adolescents. *Neuropediatrics*, 51(5), 315-335. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1701658>
- Drobyshevsky, A., Takada, S. H., Luo, K., Derrick, M., Yu, L., Quinlan, K. A., Vasquez-Vivar, J., Nogueira, M. I., & Tan, S. (2015). Elevated spinal monoamine neurotransmitters after antenatal hypoxia-ischemia in rabbit cerebral palsy model. *Journal of Neurochemistry*, 132(4), 394-402. <https://doi.org/10.1111/jnc.12997>
- Dubovsky, S. L. (2015). Mania. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry), 737-755. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000466663.28026.6f>

- Dunbar, M., & Kirton, A. (2018). Perinatal stroke: Mechanisms, management, and outcomes of early cerebrovascular brain injury. *The Lancet. Child & Adolescent Health*, 2(9), 666-676. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(18\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(18)30173-1)
- Dunbar, M., & Kirton, A. (2019). Perinatal Stroke. *Seminars in Pediatric Neurology*, 32, 100767. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2019.08.003>
- El Ictus: ¿qué es, por qué ocurre y cómo se trata? – Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN.* (s. f.). Recuperado 2 de diciembre de 2021, de [http://ictus.sen.es/?page\\_id=90](http://ictus.sen.es/?page_id=90)
- El-Alfy, A. T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., & Ross, S. (2010). Antidepressant-like effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 95(4), 434-442. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.004>
- Ellis, C., McGrattan, K., Mauldin, P., & Ovbiagele, B. (2014). Costs of pediatric stroke care in the United States: A systematic and contemporary review. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 14(5), 643-650. <https://doi.org/10.1586/14737167.2014.933672>
- Farkas, J., Reglodi, D., Gaszner, B., Szogyi, D., Horvath, G., Lubics, A., Tamas, A., Frank, F., Besirevic, D., & Kiss, P. (2009). Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Research Bulletin*, 79(3-4), 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.12.011>
- Felling, R. J., Rafay, M. F., Bernard, T. J., Carpenter, J. L., Dlamini, N., Hassanein, S. M. A., Jordan, L. C., Noetzel, M. J., Rivkin, M. J., Shapiro, K. A., Slim, M., deVeber, G., & Group, the I. P. S. S. (2020). Predicting Recovery and Outcome after Pediatric Stroke: Results from the International Pediatric Stroke Study. *Annals of Neurology*, 87(6), 840-852. <https://doi.org/10.1002/ana.25718>

- Felling, R. J., Sun, L. R., Maxwell, E. C., Goldenberg, N., & Bernard, T. (2017). Pediatric arterial ischemic stroke: Epidemiology, risk factors, and management. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *67*, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.03.003>
- Fernández-López, D., Lizasoain, I., Moro, M. Á., & Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabinoids: Well-Suited Candidates for the Treatment of Perinatal Brain Injury. *Brain Sciences*, *3*(3), 1043-1059. <https://doi.org/10.3390/brainsci3031043>
- Fernández-López, D., Natarajan, N., Ashwal, S., & Vexler, Z. S. (2014). Mechanisms of perinatal arterial ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *34*(6), 921-932. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.41>
- Ferriero, D. M., Fullerton, H. J., Bernard, T. J., Billingham, L., Daniels, S. R., DeBaun, M. R., deVeber, G., Ichord, R. N., Jordan, L. C., Massicotte, P., Meldau, J., Roach, E. S., Smith, E. R., & null, null. (2019). Management of Stroke in Neonates and Children: A Scientific Statement From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, *50*(3), e51-e96. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000183>
- Fluss, J., Dinomais, M., & Chabrier, S. (2019). Perinatal stroke syndromes: Similarities and diversities in aetiology, outcome and management. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, *23*(3), 368-383. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2019.02.013>
- Fluss, J., Garcia-Tarodo, S., Granier, M., Villega, F., Ferey, S., Husson, B., Kossorotoff, M., Muehlethaler, V., Lebon, S., & Chabrier, S. (2016). Perinatal arterial ischemic stroke related to carotid artery occlusion. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, *20*(4), 639-648. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2016.03.003>
- Forman-Hoffman, V. L., & Viswanathan, M. (2018). Screening for Depression in Pediatric Primary Care. *Current Psychiatry Reports*, *20*(8), 62. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0926-7>

- Fox, C., Dingman, A., Derugin, N., Wendland, M. F., Manabat, C., Ji, S., Ferriero, D. M., & Vexler, Z. S. (2005). Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia–reperfusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(9), 1138-1149. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600121>
- Fox, M. E., & Lobo, M. K. (2019). The molecular and cellular mechanisms of depression: A focus on reward circuitry. *Molecular psychiatry*, 24(12), 1798-1815. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0415-3>
- Fraguas-Sánchez, A. I., & Torres-Suárez, A. I. (2018). Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*, 78(16), 1665-1703. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>
- Franco, R., Villa, M., Morales, P., Reyes-Resina, I., Gutiérrez-Rodríguez, A., Jiménez, J., Jagerovic, N., Martínez-Orgado, J., & Navarro, G. (2019). Increased expression of cannabinoid CB2 and serotonin 5-HT1A heteroreceptor complexes in a model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 152, 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.02.004>
- Gabriel, D. B. K., Liley, A. E., Freels, T. G., & Simon, N. W. (2021). Dopamine receptors regulate preference between high-effort and high-risk rewards. *Psychopharmacology*, 238(4), 991-1004. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05745-z>
- García, C., Palomo-Garo, C., García-Arencibia, M., Ramos, J., Pertwee, R., & Fernández-Ruiz, J. (2011). Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid  $\Delta^9$ -THCV in animal models of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1495-1506. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01278.x>
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Gasparyan, A., Austrich-Olivares, A., Sala, F., & Manzanares, J. (2020). Cannabidiol: A Potential New Alternative for the Treatment of Anxiety, Depression, and Psychotic Disorders. *Biomolecules*, 10(11), 1575. <https://doi.org/10.3390/biom10111575>

- García-Martín, A., Navarrete, C., Garrido-Rodríguez, M., Prados, M. E., Caprioglio, D., Appendino, G., & Muñoz, E. (2021). EHP-101 alleviates angiotensin II-induced fibrosis and inflammation in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *142*, 112007. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112007>
- Gardner, M. A., Hills, N. K., Sidney, S., Johnston, S. C., & Fullerton, H. J. (2010). The 5-year direct medical cost of neonatal and childhood stroke in a population-based cohort. *Neurology*, *74*(5), 372-378. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181cbcd48>
- Geraldo, A. F., Parodi, A., Bertamino, M., Buffelli, F., Uccella, S., Tortora, D., Moretti, P., Ramenghi, L., Fulcheri, E., Rossi, A., & Severino, M. (2020). Perinatal Arterial Ischemic Stroke in Fetal Vascular Malperfusion: A Case Series and Literature Review. *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, *41*(12), 2377-2383. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A6857>
- Giuliano, C., Francavilla, M., Ongari, G., Petese, A., Ghezzi, C., Rossini, N., Blandini, F., & Cerri, S. (2021). Neuroprotective and Symptomatic Effects of Cannabidiol in an Animal Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8920. <https://doi.org/10.3390/ijms22168920>
- Glimcher, P. W. (2011). Understanding dopamine and reinforcement learning: The dopamine reward prediction error hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement 3), 15647-15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014269108>
- Glushakova, O. Y., Glushakov, A. A., Wijesinghe, D. S., Valadka, A. B., Hayes, R. L., & Glushakov, A. V. (2017). Prospective clinical biomarkers of caspase-mediated apoptosis associated with neuronal and neurovascular damage following stroke and other severe brain injuries: Implications for chronic neurodegeneration. *Brain Circulation*, *3*(2), 87-108. [https://doi.org/10.4103/bc.bc\\_27\\_16](https://doi.org/10.4103/bc.bc_27_16)

- Golomb, M. R. (2009). Outcomes of perinatal arterial ischemic stroke and cerebral sinovenous thrombosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 14(5), 318-322.  
<https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.07.003>
- Gonzalez, F. F., Larphaveesarp, A., McQuillen, P., Derugin, N., Wendland, M., Spadafora, R., & Ferriero, D. M. (2013). Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial cells of subventricular zone precursor cells after neonatal stroke. *Stroke*, 44(3), 753-758.  
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000104>
- Gould, T. D. (Ed.). (2009). *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests* (Vol. 42). Humana Press.
- Gower, A., & Tiberi, M. (2018). The Intersection of Central Dopamine System and Stroke: Potential Avenues Aiming at Enhancement of Motor Recovery. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10, 18. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00018>
- Grandi, L. C., Di Giovanni, G., & Galati, S. (2018). Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms. *Journal of Neuroscience Methods*, 308, 205-218.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012>
- Grunt, S., Mazenauer, L., Buerki, S. E., Boltshauser, E., Mori, A. C., Datta, A. N., Fluss, J., Mercati, D., Keller, E., Maier, O., Poloni, C., Ramelli, G.-P., Schmitt-Mechelke, T., & Steinlin, M. (2015). Incidence and Outcomes of Symptomatic Neonatal Arterial Ischemic Stroke. *Pediatrics*, 135(5), e1220-e1228. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-1520>
- Hagino, Y., Kasai, S., Fujita, M., Setogawa, S., Yamaura, H., Yanagihara, D., Hashimoto, M., Kobayashi, K., Meltzer, H. Y., & Ikeda, K. (2015). Involvement of Cholinergic System in Hyperactivity in Dopamine-Deficient Mice. *Neuropsychopharmacology*, 40(5), 1141-1150. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.295>

- Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1-12.
- Hamon, M., & Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 45, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.009>
- Hayakawa, K., Irie, K., Sano, K., Watanabe, T., Higuchi, S., Enoki, M., Nakano, T., Harada, K., Ishikane, S., Ikeda, T., Fujioka, M., Orito, K., Iwasaki, K., Mishima, K., & Fujiwara, M. (2009). Therapeutic time window of cannabidiol treatment on delayed ischemic damage via high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(9), 1538-1544. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1538>
- Hendrick, V., Suri, R., Gitlin, M. J., & Ortiz-Portillo, E. (2017). Bupropion Use During Pregnancy: A Systematic Review. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*, 19(5), 26729. <https://doi.org/10.4088/PCC.17r02160>
- Henry, V. J., Lecointre, M., Laudénbach, V., Ali, C., Macrez, R., Jullienne, A., Berezowski, V., Carmeliet, P., Vivien, D., Marret, S., Gonzalez, B. J., & Leroux, P. (2013). High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiology of Disease*, 50, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.020>
- Howlett, A. C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 53-79. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_2)
- Ishii, A., Yamada, S., Yamada, R., Fujibayashi, S., & Hamada, H. (1992). T-PA activity and antigen in the newborn and infant. *Journal of Perinatal Medicine*, 20(6), 465-469. <https://doi.org/10.1515/jpme.1992.20.6.465>

- Johnston, M. V., Fatemi, A., Wilson, M. A., & Northington, F. (2011). Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *The Lancet Neurology*, *10*(4), 372-382. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70016-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70016-3)
- Jordán, J., Ikuta, I., García-García, J., Calleja, S., & Segura, T. (2007). Stroke pathophysiology: Management challenges and new treatment advances. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *63*(3), 261-277. <https://doi.org/10.1007/BF03165789>
- Jost, S. P. (1985). Postnatal growth of the mouse bladder. *Journal of Anatomy*, *143*, 39-43.
- Kadam, S. D., Smith-Hicks, C. L., Smith, D. R., Worley, P. F., & Comi, A. M. (2010). Functional integration of new neurons into hippocampal networks and post-stroke co-morbidities following neonatal stroke in mice. *Epilepsy & behavior : E&B*, *18*(4), 344-357. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.05.006>
- Kaushik, P., Ali, M., Tabassum, H., & Parvez, S. (2020). Post-ischemic administration of dopamine D2 receptor agonist reduces cell death by activating mitochondrial pathway following ischemic stroke. *Life Sciences*, *261*, 118349. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118349>
- Khan, R., Naveed, S., Mian, N., Fida, A., Raafey, M. A., & Aedma, K. K. (2020). The therapeutic role of Cannabidiol in mental health: A systematic review. *Journal of Cannabis Research*, *2*, 2. <https://doi.org/10.1186/s42238-019-0012-y>
- Kiecolt-Glaser, J. K., Derry, H. M., & Fagundes, C. P. (2015). Inflammation: Depression Fans the Flames and Feasts on the Heat. *American Journal of Psychiatry*, *172*(11), 1075-1091. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15020152>
- Kim, K. T., Chung, K. J., Lee, H. S., Ko, I. G., Kim, C. J., Na, Y. G., & Kim, K. H. (2013). Neuroprotective effects of tadalafil on gerbil dopaminergic neurons following cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*, *8*(8), 693-701. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.08.003>

- Kohno, M., Ghahremani, D. G., Morales, A. M., Robertson, C. L., Ishibashi, K., Morgan, A. T., Mandelkern, M. A., & London, E. D. (2015). Risk-Taking Behavior: Dopamine D2/D3 Receptors, Feedback, and Frontolimbic Activity. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, *25*(1), 236-245. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht218>
- Kokkinou, M., Irvine, E. E., Bonsall, D. R., Natesan, S., Wells, L. A., Smith, M., Glegola, J., Paul, E. J., Tossell, K., Veronese, M., Khadayate, S., Dedic, N., Hopkins, S. C., Ungless, M. A., Withers, D. J., & Howes, O. D. (2021). Reproducing the dopamine pathophysiology of schizophrenia and approaches to ameliorate it: A translational imaging study with ketamine. *Molecular Psychiatry*, *26*(6), 2562-2576. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0740-6>
- Kraemmer, J., Kovacs, G. G., Perju-Dumbrava, L., Pirker, S., Traub-Weidinger, T., & Pirker, W. (2014). Correlation of striatal dopamine transporter imaging with post mortem substantia nigra cell counts. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *29*(14), 1767-1773. <https://doi.org/10.1002/mds.25975>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019a). The Forced Swim Test for Depression-Like Behavior in Rodents. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 75-80. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_5)
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019b). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 99-103. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9)
- Kratzer, I., Chip, S., & Vexler, Z. S. (2014). Barrier mechanisms in neonatal stroke. *Frontiers in Neuroscience*, *8*, 359. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00359>
- Kraus, C., Castrén, E., Kasper, S., & Lanzenberger, R. (2017). Serotonin and neuroplasticity—Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *77*, 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.007>

- Kronenberg, G., Balkaya, M., Prinz, V., Gertz, K., Ji, S., Kirste, I., Heuser, I., Kampmann, B., Hellmann-Regen, J., Gass, P., Sohr, R., Hellweg, R., Waeber, C., Juckel, G., Hörtnagl, H., Stumm, R., & Endres, M. (2012). Exofocal dopaminergic degeneration as antidepressant target in mouse model of poststroke depression. *Biological Psychiatry*, *72*(4), 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.02.026>
- Kumar Arora, M., Ratra, A., Asdaq, S. M. B., Alshamrani, A. A., Alsalman, A. J., Kamal, M., Tomar, R., Sahoo, J., Ashok, J., & Imran, M. (2022). Plumbagin Alleviates Intracerebroventricular-Quinolinic Acid Induced Depression-like Behavior and Memory Deficits in Wistar Rats. *Molecules*, *27*(6), 1834. <https://doi.org/10.3390/molecules27061834>
- Kuriakose, D., & Xiao, Z. (2020). Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
- Lai, T. K. Y., Su, P., Zhang, H., & Liu, F. (2018). Development of a peptide targeting dopamine transporter to improve ADHD-like deficits. *Molecular Brain*, *11*. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0409-0>
- Larphaveesarp, A., Georgevits, M., Ferriero, D. M., & Gonzalez, F. F. (2016). Delayed Erythropoietin Therapy Improves Histological and Behavioral Outcomes after Transient Neonatal Stroke. *Neurobiology of disease*, *93*, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.04.006>
- Larphaveesarp, A., Pathipati, P., Ostrin, S., Rajah, A., Ferriero, D., & Gonzalez, F. F. (2021). Enhanced Mesenchymal Stromal Cells or Erythropoietin Provide Long-term Functional Benefit after Neonatal Stroke. *Stroke*, *52*(1), 284-293. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.031191>
- Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J. A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in

vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *19*(1-2), 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.11.009>

Lechtenberg, K. J., Meyer, S. T., Doyle, J. B., Peterson, T. C., & Buckwalter, M. S. (2019). Augmented  $\beta$ 2-adrenergic signaling dampens the neuroinflammatory response following ischemic stroke and increases stroke size. *Journal of Neuroinflammation*, *16*, 112. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1506-4>

Ledesma, J. C., Manzanedo, C., & Aguilar, M. A. (2021). Cannabidiol prevents several of the behavioral alterations related to cocaine addiction in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *111*, 110390. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110390>

Lee, C. S., Samii, A., Sossi, V., Ruth, T. J., Schulzer, M., Holden, J. E., Wudel, J., Pal, P. K., de la Fuente-Fernandez, R., Calne, D. B., & Stoessl, A. J. (2000). In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *47*(4), 493-503.

Lehman, L. L., & Rivkin, M. J. (2014). Perinatal arterial ischemic stroke: Presentation, risk factors, evaluation, and outcome. *Pediatric Neurology*, *51*(6), 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.07.031>

Li, C., Miao, J. K., Xu, Y., Hua, Y. Y., Ma, Q., Zhou, L. L., Liu, H. J., & Chen, Q. X. (2017). Prenatal, perinatal and neonatal risk factors for perinatal arterial ischaemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Neurology*, *24*(8), 1006-1015. <https://doi.org/10.1111/ene.13337>

Li, G., Jing, P., Chen, G., Mei, J., Miao, J., Sun, W., Lan, Y., Zhao, X., Qiu, X., Zhu, Z., & Zhu, S. (2021). Development and Validation of 3-Month Major Post-Stroke Depression Prediction Nomogram After Acute Ischemic Stroke Onset. *Clinical Interventions in Aging*, *16*, 1439-1447. <https://doi.org/10.2147/CIA.S318857>

- Li, Z., Wang, J., Zhao, C., Ren, K., Xia, Z., Yu, H., & Jiang, K. (2016). Acute Blockage of Notch Signaling by DAPT Induces Neuroprotection and Neurogenesis in the Neonatal Rat Brain After Stroke. *Translational Stroke Research*, 7(2), 132-140.  
<https://doi.org/10.1007/s12975-015-0441-7>
- Lima-Ojeda, J. M., Rupprecht, R., & Baghai, T. C. (2018). Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 19(5), 349-359.  
<https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1289240>
- López-Espejo, M. A., Chávez, M. H., & Huete, I. (2021). Short-term outcomes after a neonatal arterial ischemic stroke. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 37(4), 1249-1254.  
<https://doi.org/10.1007/s00381-020-04931-w>
- Loubinoux, I., Kronenberg, G., Endres, M., Schumann-Bard, P., Freret, T., Filipkowski, R. K., Kaczmarek, L., & Popa-Wagner, A. (2012). Post-stroke depression: Mechanisms, translation and therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(9), 1961-1969.  
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01555.x>
- Love, T. M. (2014). Oxytocin, Motivation and the Role of Dopamine. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 0, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.06.011>
- Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Bryant, J., & Ngwa, W. (2021). The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9472. <https://doi.org/10.3390/ijms22179472>
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607-615.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-

ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, *157*(1), 157-165.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>

Machado, V., Pimentel, S., Pinto, F., & Nona, J. (2015). Perinatal ischemic stroke: A five-year retrospective study in a level-III maternity. *Einstein*, *13*(1), 65-71.

<https://doi.org/10.1590/S1679-45082015AO3056>

Maciel, I. de S., de Abreu, G. H. D., Johnson, C. T., Bonday, R., Bradshaw, H. B., Mackie, K., & Lu, H.-C. (2021). Perinatal CBD or THC Exposure Results in Lasting Resistance to Fluoxetine in the Forced Swim Test: Reversal by Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition. *Cannabis and Cannabinoid Research*. <https://doi.org/10.1089/can.2021.0015>

Mao, M., Hua, Y., Jiang, X., Li, L., Zhang, L., & Mu, D. (2006). Expression of tumor necrosis factor alpha and neuronal apoptosis in the developing rat brain after neonatal stroke. *Neuroscience Letters*, *403*(3), 227-232. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.078>

Martinez-Biarge, M., Ferriero, D. M., & Cowan, F. M. (2019). Perinatal arterial ischemic stroke. *Handbook of Clinical Neurology*, *162*, 239-266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00011-4>

Martínez-Orgado, J., Fernández-López, D., Lizasoain, I., & Romero, J. (2007). The seek of neuroprotection: Introducing cannabinoids. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, *2*(2), 131-139. <https://doi.org/10.2174/157488907780832724>

Martínez-Orgado, J., Villa, M., & del Pozo, A. (2021). Cannabidiol for the Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.584533>

Masini, D., & Kiehn, O. (2022). Targeted activation of midbrain neurons restores locomotor function in mouse models of parkinsonism. *Nature Communications*, *13*, 504. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28075-4>

McPartland, J. M., Duncan, M., Di Marzo, V., & Pertwee, R. G. (2015). Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A

systematic review. *British Journal of Pharmacology*, 172(3), 737-753.

<https://doi.org/10.1111/bph.12944>

McPherson, R. J., & Juul, S. E. (2008). Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26(1), 103-111.

<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.08.012>

Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe = Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Progres Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles*, 25, 175-213.

[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8164-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8164-5_6)

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., & Hanus, L. O. (2007). Cannabidiol—Recent advances. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1678-1692.

<https://doi.org/10.1002/cbdv.200790147>

Melas, P. A., Scherma, M., Fratta, W., Cifani, C., & Fadda, P. (2021). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety and Mood Disorders: Molecular Targets and Epigenetic Insights from Preclinical Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1863.

<https://doi.org/10.3390/ijms22041863>

Ménard, C., Hodes, G. E., & Russo, S. J. (2016). Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience*, 321, 138-162.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.053>

Mendelson, T., & Tandon, S. D. (2016). Prevention of Depression in Childhood and Adolescence. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 25(2), 201-218.

<https://doi.org/10.1016/j.chc.2015.11.005>

Mergenthaler, P., Dirnagl, U., & Meisel, A. (2004). Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models. *Metabolic Brain Disease*, 19(3-4), 151-167.

<https://doi.org/10.1023/b:mebr.0000043966.46964.e6>

- Micheli, L., Ceccarelli, M., D'Andrea, G., & Tirone, F. (2018). Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Research Bulletin*, *143*, 181-193.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.002>
- Miguel, P. M., Schuch, C. P., Rojas, J. J., Carletti, J. V., Deckmann, I., Martinato, L. H. M., Pires, A. V., Bizarro, L., & Pereira, L. O. (2015). Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, *129*(3), 309-320. <https://doi.org/10.1037/bne0000063>
- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(2), 73-85.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- Munoz, D., Hidalgo, M. J., Balut, F., Troncoso, M., Lara, S., Barrios, A., & Parra, P. (2018). Risk Factors for Perinatal Arterial Ischemic Stroke: A Case-Control Study. *Cell Medicine*, *10*, 2155179018785341. <https://doi.org/10.1177/2155179018785341>
- Navarrete, C., Carrillo-Salinas, F., Palomares, B., Mecha, M., Jiménez-Jiménez, C., Mestre, L., Feliú, A., Bellido, M. L., Fiebich, B. L., Appendino, G., Calzado, M. A., Guaza, C., & Muñoz, E. (2018). Hypoxia mimetic activity of VCE-004.8, a cannabidiol quinone derivative: Implications for multiple sclerosis therapy. *Journal of Neuroinflammation*, *15*, 64. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1103-y>
- Navarrete, C., García-Martin, A., Garrido-Rodríguez, M., Mestre, L., Feliú, A., Guaza, C., Calzado, M. A., & Muñoz, E. (2020). Effects of EHP-101 on inflammation and remyelination in murine models of Multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *143*, 104994. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104994>
- Navarrete, F., García-Gutiérrez, M. S., Gasparyan, A., Austrich-Olivares, A., & Manzanares, J. (2021). Role of Cannabidiol in the Therapeutic Intervention for Substance Use

- Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 626010.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.626010>
- Nelson, K. B., & Lynch, J. K. (2004). Stroke in newborn infants. *The Lancet. Neurology*, 3(3), 150-158. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00679-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00679-9)
- Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. *Nature neuroscience*, 13(10), 1161-1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>
- Ng, Q. X. (2017). A Systematic Review of the Use of Bupropion for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 27(2), 112-116.  
<https://doi.org/10.1089/cap.2016.0124>
- Obi, K., Amano, I., & Takatsuru, Y. (2018). Role of dopamine on functional recovery in the contralateral hemisphere after focal stroke in the somatosensory cortex. *Brain Research*, 1678, 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.10.022>
- Ogata, M., Akita, H., & Ishibashi, H. (2019). Behavioral responses to anxiogenic tasks in young adult rats with neonatal dopamine depletion. *Physiology & Behavior*, 204, 10-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.02.006>
- Oleske, D. M., Cheng, X., Jeong, A., & Arndt, T. J. (2021). Pediatric Acute Ischemic Stroke by Age-Group: A Systematic Review and Meta-Analysis of Published Studies and Hospitalization Records. *Neuroepidemiology*, 55(5), 331-341.  
<https://doi.org/10.1159/000518281>
- Palazuelos, J., Ortega, Z., Díaz-Alonso, J., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2012). CB2 Cannabinoid Receptors Promote Neural Progenitor Cell Proliferation via mTORC1 Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1198-1209.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291294>
- Palermo, G., & Ceravolo, R. (2019). Molecular Imaging of the Dopamine Transporter. *Cells*, 8(8), 872. <https://doi.org/10.3390/cells8080872>

- Palomares, B., Ruiz-Pino, F., Navarrete, C., Velasco, I., Sánchez-Garrido, M. A., Jimenez-Jimenez, C., Pavicic, C., Vazquez, M. J., Appendino, G., Bellido, M. L., Calzado, M. A., Tena-Sempere, M., & Muñoz, E. (2018). VCE-004.8, A Multitarget Cannabinoquinone, Attenuates Adipogenesis and Prevents Diet-Induced Obesity. *Scientific Reports*, *8*, 16092. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34259-0>
- Pamies, D., Wiersma, D., Katt, M. E., Zhong, L., Burtscher, J., Harris, G., Smirnova, L., Searson, P. C., Hartung, T., & Hogberg, H. T. (2022). Human organotypic brain model as a tool to study chemical-induced dopaminergic neuronal toxicity. *Neurobiology of Disease*, 105719. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105719>
- Pandarakalam, J. P. (2018). Challenges of Treatment-resistant Depression. *Psychiatra Danubina*, *30*(3), 273-284. <https://doi.org/10.24869/psyd.2018.273>
- Patel, A. R., Ritzel, R., McCullough, L. D., & Liu, F. (2013). Microglia and ischemic stroke: A double-edged sword. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, *5*(2), 73-90.
- Patricio, F., Morales-Andrade, A. A., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2020). Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 595635. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Elsevier Science. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=777409>
- Pazos, M. R., Cinquina, V., Gómez, A., Layunta, R., Santos, M., Fernández-Ruiz, J., & Martínez-Orgado, J. (2012). Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function.

- Neuropharmacology*, 63(5), 776-783.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.034>
- Pazos, M. R., Mohammed, N., Lafuente, H., Santos, M., Martínez-Pinilla, E., Moreno, E., Valdizan, E., Romero, J., Pazos, A., Franco, R., Hillard, C. J., Alvarez, F. J., & Martínez-Orgado, J. (2013). Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: Role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology*, 71, 282-291.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.027>
- Pei, S., Liu, L., Zhong, Z., Wang, H., Lin, S., & Shang, J. (2016). Risk of prenatal depression and stress treatment: Alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine. *Scientific Reports*, 6, 33822. <https://doi.org/10.1038/srep33822>
- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International*, 2018, 1691428. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Pertwee, R. G. (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 1-51. [https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_1)
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199-215.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Petrou, S., & Davidson, L. L. (2000). Economic issues in the follow-up of neonates. *Seminars in Neonatology: SN*, 5(2), 159-169. <https://doi.org/10.1053/siny.1999.0005>
- Phelan, C., Alaigh, V., Fortunato, G., Staff, I., & Sansing, L. (2015). Effect of  $\beta$ -adrenergic antagonists on in-hospital mortality after ischemic stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 24(9), 1998-2004. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.04.035>

- Poignet, H., Nowicki, J. P., & Scatton, B. (1992). Lack of neuroprotective effect of some sigma ligands in a model of focal cerebral ischemia in the mouse. *Brain Research*, *596*(1-2), 320-324. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91565-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91565-v)
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: A new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*(5604), 730-732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Pytko, K., Podkowa, K., Rapacz, A., Podkowa, A., Żmudzka, E., Olczyk, A., Sapa, J., & Filipek, B. (2016). The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports: PR*, *68*(2), 263-274. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.08.007>
- Qi, Z., Miller, G. W., & Voit, E. O. (2008). Computational Systems Analysis of Dopamine Metabolism. *PLOS ONE*, *3*(6), e2444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002444>
- Ragaeva, D. S., Tikhonova, M. A., Petrova, O. M., Igonina, T. N., Rozkova, I. N., Brusentsev, E. Y., Amstislavskaya, T. G., & Amstislavsky, S. Y. (2017). Neonatal reflexes and behavior in hypertensive rats of ISIAH strain. *Physiology & Behavior*, *175*, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.026>
- Raju, T. N. K. (2008). Ischemic perinatal stroke: Challenge and opportunities. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, *3*(3), 169-172. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2008.00205.x>
- Ramos Atance, J. A. (2017). *Efectos terapéuticos de los cannabinoides*. Instituto de Investigación Neuroquímica de la Universidad Complutense de Madrid.
- Raupp-Barcaro, I. F. M., da Silva Dias, I. C., Meyer, E., Vieira, J. C. F., da Silva Pereira, G., Petkowicz, A. R., de Oliveira, R. M. W., & Andreatini, R. (2021). Involvement of dopamine D2 and glutamate NMDA receptors in the antidepressant-like effect of amantadine in mice. *Behavioural Brain Research*, *413*, 113443. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113443>

- Rayasam, A., Faustino, J., Lecuyer, M., & Vexler, Z. S. (2020). Neonatal Stroke and TLR1/2 Ligand Recruit Myeloid Cells through the Choroid Plexus in a CX3CR1-CCR2- and Context-Specific Manner. *The Journal of Neuroscience*, *40*(19), 3849-3861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2149-19.2020>
- Reynolds, K. B., MacGillivray, L., Zettler, M., Rosebush, P. I., & Mazurek, M. F. (2011). Role of the dopamine transporter in mediating the neuroleptic-induced reduction of tyrosine hydroxylase-immunoreactive midbrain neurons. *Brain Research*, *1394*, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.003>
- Ribeiro, Â., Ribeiro, J. P., & von Doellinger, O. (2017). Depression and psychodynamic psychotherapy. *Brazilian Journal of Psychiatry*, *40*(1), 105-109. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2016-2107>
- Robinson, R. G., & Jorge, R. E. (2016). Post-Stroke Depression: A Review. *The American Journal of Psychiatry*, *173*(3), 221-231. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15030363>
- Russell, V. A., Sagvolden, T., & Johansen, E. B. (2005). Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behavioral and brain functions : BBF*, *1*, 9. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-1-9>
- Rutherford, M. A., Ramenghi, L. A., & Cowan, F. M. (2012). Neonatal stroke. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, *97*(5), F377-384. <https://doi.org/10.1136/fetalneonatal-2010-196451>
- Salatino-Oliveira, A., Rohde, L. A., & Hutz, M. H. (2018). The dopamine transporter role in psychiatric phenotypes. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *177*(2), 211-231. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32578>
- Sales, A. J., Crestani, C. C., Guimarães, F. S., & Joca, S. R. L. (2018). Antidepressant-like effect induced by Cannabidiol is dependent on brain serotonin levels. *Progress in Neuro-*

*Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 86, 255-261.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.06.002>

Sales, A. J., Fogaça, M. V., Sartim, A. G., Pereira, V. S., Wegener, G., Guimarães, F. S., & Joca, S.

R. L. (2019). Cannabidiol Induces Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects Through Increased BDNF Signaling and Synaptogenesis in the Prefrontal Cortex.

*Molecular Neurobiology*, 56(2), 1070-1081. [https://doi.org/10.1007/s12035-018-1143-](https://doi.org/10.1007/s12035-018-1143-4)

4

Samarut, É., Nixon, J., Kundap, U. P., Drapeau, P., & Ellis, L. D. (2019). Single and Synergistic

Effects of Cannabidiol and  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol on Zebrafish Models of Neuro-Hyperactivity. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 226.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00226>

Sami, M. B., & Faruqi, R. (2015). The effectiveness of dopamine agonists for treatment of

neuropsychiatric symptoms post brain injury and stroke. *Acta Neuropsychiatrica*,

27(6), 317-326. <https://doi.org/10.1017/neu.2015.17>

Sanches, E. F., van de Looij, Y., Toulotte, A., Sizonenko, S. V., & Lei, H. (2019). Mild Neonatal

Brain Hypoxia-Ischemia in Very Immature Rats Causes Long-Term Behavioral and Cerebellar Abnormalities at Adulthood. *Frontiers in Physiology*, 10, 634.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00634>

Sanches, E. S. a. M., Tsuzuki, F., Joinhas, F., Figueiras, G. B., Moreira, E. G., & Salles, M. J. S.

(2019). Paternal exposure to bupropion affects postnatal development in the offspring. *Reproduction, Fertility, and Development*, 31(10), 1539-1544.

<https://doi.org/10.1071/RD18403>

Sartim, A. G., Marques, J., Silveira, K. M., Gobira, P. H., Guimarães, F. S., Wegener, G., & Joca, S.

R. (2021). Co-administration of cannabidiol and ketamine induces antidepressant-like effects devoid of hyperlocomotor side-effects. *Neuropharmacology*, 195, 108679.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108679>

- Saunders, J., Carlson, H. L., Cortese, F., Goodyear, B. G., & Kirton, A. (2018). Imaging functional motor connectivity in hemiparetic children with perinatal stroke. *Human Brain Mapping, 40*(5), 1632-1642. <https://doi.org/10.1002/hbm.24474>
- Schreuder, M. F., Nyengaard, J. R., Remmers, F., van Wijk, J. A. E., & Delemarre-van de Waal, H. A. (2006). Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. *American Journal of Physiology. Renal Physiology, 291*(5), F1104-1107. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00158.2006>
- Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience, 30*, 259-288. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology, 0*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Sharma, A., & Couture, J. (2014). A review of the pathophysiology, etiology, and treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *The Annals of Pharmacotherapy, 48*(2), 209-225. <https://doi.org/10.1177/1060028013510699>
- Silva, L., Vargas, C., Prados, M. E., Del Pozo, A., Villa, M., Martínez, M., Alvarez, L., Muñoz, E., Unciti-Broceta, J. D., & Martínez-Orgado, J. (2022). Neuroprotective Efficacy of Betulinic Acid Hydroxamate, a B55 $\alpha$ /PP2A Activator, in Acute Hypoxia-Ischemia-Induced Brain Damage in Newborn Rats. *Translational Stroke Research*. <https://doi.org/10.1007/s12975-022-01017-4>
- Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols, 7*(6), 1009-1014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
- Smolders, I., Clinckers, R., Meurs, A., De Bundel, D., Portelli, J., Ebinger, G., & Michotte, Y. (2008). Direct enhancement of hippocampal dopamine or serotonin levels as a

pharmacodynamic measure of combined antidepressant-anticonvulsant action.

*Neuropharmacology*, 54(6), 1017-1028.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.006>

Sommer, S., Danysz, W., Russ, H., Valastro, B., Flik, G., & Hauber, W. (2014). The dopamine reuptake inhibitor MRZ-9547 increases progressive ratio responding in rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(12), 2045-2056.

<https://doi.org/10.1017/S1461145714000996>

Steinlin, M. (2017). Neuroinflammation in Ischemic Pediatric Stroke. *Seminars in Pediatric Neurology*, 24(3), 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2017.08.006>

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.

<https://doi.org/10.1007/BF00428203>

Struntz, K. H., & Siegel, J. A. (2018). Effects of methamphetamine exposure on anxiety-like behavior in the open field test, corticosterone, and hippocampal tyrosine hydroxylase in adolescent and adult mice. *Behavioural Brain Research*, 348, 211-218.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.019>

Talhada, D., Marklund, N., Wieloch, T., Kuric, E., & Ruscher, K. (2021). Plasticity-Enhancing Effects of Levodopa Treatment after Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910226>

Taniguti, E. H., Ferreira, Y. S., Stupp, I. J. V., Fraga-Junior, E. B., Doneda, D. L., Lopes, L., Rios-Santos, F., Lima, E., Buss, Z. S., Viola, G. G., & Vandresen-Filho, S. (2019). Atorvastatin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice. *Brain Research Bulletin*, 146, 279-286. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.018>

Tao, P., Jing, Z., Shou-Hong, G., Shu-Juan, P., Jian-Peng, J., Wen-Quan, L., & Wan-Sheng, C.

(2019). Effects of leptin on norepinephrine in acute ischemic stroke. *Die Pharmazie* -

- An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(8), 477-480.  
<https://doi.org/10.1691/ph.2019.9379>
- Thierry, B., Steru, L., Chermat, R., & Simon, P. (1984). Searching-waiting strategy: A candidate for an evolutionary model of depression? *Behavioral and Neural Biology*, 41(2), 180-189. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(84\)90555-7](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(84)90555-7)
- Titomanlio, L., Fernández-López, D., Manganozzi, L., Moretti, R., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: Lessons from animal models. *Pediatric neurology*, 52(6), 566-584.  
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.01.016>
- Tripp, G., & Wickens, J. R. (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology*, 57(7), 579-589.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.026>
- Turk, A. Z., Marchoubeh, M. L., Fritsch, I., Maguire, G. A., & SheikhBahaei, S. (2021). Dopamine, Vocalization, and Astrocytes. *Brain and language*, 219, 104970.  
<https://doi.org/10.1016/j.bandl.2021.104970>
- Unal, G., & Canbeyli, R. (2019). Psychomotor retardation in depression: A critical measure of the forced swim test. *Behavioural Brain Research*, 372, 112047.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112047>
- Vasudevan, C., & Levene, M. (2013). Epidemiology and aetiology of neonatal seizures. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 18(4), 185-191.  
<https://doi.org/10.1016/j.siny.2013.05.008>
- Vega-Rivera, N. M., López-Rubalcava, C., & Estrada-Camarena, E. (2013). The antidepressant-like effect of ethynyl estradiol is mediated by both serotonergic and noradrenergic systems in the forced swimming test. *Neuroscience*, 250, 102-111.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.058>

- Vexler, Z. S., & Yenari, M. A. (2009). Does Inflammation after Stroke Affect the Developing Brain Differently than Adult Brain? *Developmental Neuroscience*, *31*(5), 378-393.  
<https://doi.org/10.1159/000232556>
- Villa, R. F., Ferrari, F., & Moretti, A. (2018). Post-stroke depression: Mechanisms and pharmacological treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, *184*, 131-144.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.005>
- Villalonga, J. M. (2008). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. MARGE BOOKS.
- Villapol, S., Fau, S., Renolleau, S., Biran, V., Charriaut-Marlangue, C., & Baud, O. (2011). Melatonin promotes myelination by decreasing white matter inflammation after neonatal stroke. *Pediatric Research*, *69*(1), 51-55.  
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181fcb40b>
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(12), 741-752.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>
- Wagenaar, N., Aa, N. E. van der, Groenendaal, F., Verhage, C. H., Benders, M. J. N. L., & Vries, L. S. de. (2017). MR imaging for accurate prediction of outcome after perinatal arterial ischemic stroke: Sooner not necessarily better. *European Journal of Paediatric Neurology*, *21*(4), 666-670. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.04.002>
- Wagenaar, N., Martinez-Biarge, M., van der Aa, N. E., van Haastert, I. C., Groenendaal, F., Benders, M. J. N. L., Cowan, F. M., & de Vries, L. S. (2018). Neurodevelopment After Perinatal Arterial Ischemic Stroke. *Pediatrics*, *142*(3), e20174164.  
<https://doi.org/10.1542/peds.2017-4164>
- Wagner, G. A. (2015). Treatment of depression in older adults beyond fluoxetine. *Revista De Saude Publica*, *49*, 20. <https://doi.org/10.1590/s0034-8910.2015049005835>
- Wang, J., Song, H.-R., Guo, M.-N., Ma, S.-F., Yun, Q., Liu, W.-J., Hu, Y.-M., & Zhu, Y.-Q. (2020). PGC-1 $\alpha$  regulate critical period plasticity via gene  $\times$  environment interaction in the

- developmental trajectory to schizophrenia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(4), 989-996. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.030>
- Wang, Z., Shi, Y., Liu, F., Jia, N., Gao, J., Pang, X., & Deng, F. (2018). Diversiform Etiologies for Post-stroke Depression. *Frontiers in Psychiatry*, 9, 761. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00761>
- Watt, G., & Karl, T. (2017). In vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00020>
- Whitaker, E. E., & Cipolla, M. J. (2020). Perinatal stroke. *Handbook of Clinical Neurology*, 171, 313-326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64239-4.00016-3>
- Williams, T. S., McDonald, K. P., Roberts, S. D., Dlamini, N., deVeber, G., & Westmacott, R. (2017). Prevalence and Predictors of Learning and Psychological Diagnoses Following Pediatric Arterial Ischemic Stroke. *Developmental Neuropsychology*, 42(5), 309-322. <https://doi.org/10.1080/87565641.2017.1353093>
- Williams, T. S., Roberts, S. D., Coppens, A. M., Crosbie, J., Dlamini, N., & Westmacott, R. (2018). Secondary attention-deficit/hyperactivity disorder following perinatal and childhood stroke: Impact on cognitive and academic outcomes. *Child Neuropsychology: A Journal on Normal and Abnormal Development in Childhood and Adolescence*, 24(6), 763-783. <https://doi.org/10.1080/09297049.2017.1333091>
- Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S.-C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., & Arumugam, T. V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 11. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-11>
- Wu, X. Y., Kirk, S. F. L., Ohinmaa, A., & Veugelers, P. J. (2017). The importance of health behaviours in childhood for the development of internalizing disorders during adolescence. *BMC Psychology*, 5, 38. <https://doi.org/10.1186/s40359-017-0208-x>

- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *97*, 52587. <https://doi.org/10.3791/52587>
- Zhang, H.-Y., Gao, M., Liu, Q.-R., Bi, G.-H., Li, X., Yang, H.-J., Gardner, E. L., Wu, J., & Xi, Z.-X. (2014). Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(46), E5007-E5015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413210111>
- Zhao, Q., Yan, T., Chopp, M., Venkat, P., & Chen, J. (2020). Brain–kidney interaction: Renal dysfunction following ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *40*(2), 246-262. <https://doi.org/10.1177/0271678X19890931>
- Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>