

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



TESIS DOCTORAL

El tratamiento con cannabidiol mejora la lesión pulmonar inflamatoria secundaria a hipoxia-isquemia cerebral en un nuevo modelo experimental neonatal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Arruza Gómez

Directores

Manuel Moro Serrano
José Antonio Martínez Orgado

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**EL TRATAMIENTO CON CANNABIDIOL MEJORA LA LESIÓN
PULMONAR INFLAMATORIA SECUNDARIA A HIPOXIA-
ISQUEMIA CEREBRAL EN UN NUEVO MODELO EXPERIMENTAL
NEONATAL**

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR: MANUEL MORO SERRANO

CODIRECTOR: JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ ORGADO

LUIS ARRUZA GÓMEZ

MADRID, 2012

INDICE

	<u>Pág.</u>
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1. Afectación pulmonar y lesión cerebral hipóxico-isquémica.....	6
1.1 Fisiopatología de la encefalopatía hipóxico-isquémica.....	6
1.2 Afectación extracerebral en la encefalopatía hipóxico-isquémica.....	7
1.3 El pulmón en la encefalopatía hipóxico-isquémica.....	7
2. El sistema cannabinoide.....	10
2.1 Los cannabinoides.....	10
2.2 Receptores cannabinoides.....	12
2.3 Otros receptores relacionados con los cannabinoides.....	15
2.4 Efectos de los cannabinoides dependientes o no de receptores.....	17
2.5 Endocannabinoides.....	19
2.6 El cannabidiol.....	21
II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	25
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
1. Preparación de los animales.....	29
2. Monitorización respiratoria y hemodinámica.....	30
3. Monitorización cerebral.....	30
4. Protocolo experimental.....	31

5. Obtención y procesamiento de líquido de lavado broncoalveolar.....	31
5.1 Determinación de la concentración de proteínas totales en LBA.....	32
6. Procesamiento de los pulmones.....	33
6.1 Histología de los pulmones.....	33
7. Procesamiento del cerebro.....	34
7.1 Histología cerebral.....	34
8. Valoración de citokinas proinflamatorias en tejidos pulmonar y cerebral.....	35
9. Análisis estadístico.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
1. Generalidades.....	37
2. Diseño de un modelo de daño pulmonar secundario a lesión cerebral hipóxico-isquémica.....	38
2.1 Daño cerebral hipóxico-isquémico.....	38
2.1.1 Alteración de la función y flujo cerebrales.....	38
2.1.2 Alteración de la histología cerebral.....	40
2.1.3 Expresión de citokinas proinflamatorias en tejido cerebral.....	42
2.2 Repercusión hemodinámica de la hipoxia-isquemia cerebral.....	43
2.3 Daño pulmonar en la hipoxia-isquemia cerebral.....	45
2.3.1 Afectación de la distensibilidad pulmonar y el intercambio de gases; edema pulmonar.....	45
2.3.2 Valoración del daño histológico pulmonar.....	47
2.3.3 Estudio de parámetros de inflamación pulmonar.....	49

2.3.3.1	Concentración de proteínas en lavado broncoalveolar.....	49
2.3.3.2	Expresión de citokinas proinflamatorias en tejido pulmonar.....	49
2.3.3.3	Relación entre inflamación cerebral y pulmonar.....	51
3.	Efecto del tratamiento con cannabidiol sobre el daño pulmonar tras hipoxia-isquemia cerebral.....	52
3.1	Efecto neuroprotector del cannabidiol.....	52
3.1.1	Efecto del cannabidiol sobre la alteración de la función y del flujo cerebral.....	52
3.1.2	Efecto del cannabidiol sobre la alteración de la histología cerebral...	54
3.1.3	Efecto del cannabidiol sobre la expresión de citokinas proinflamatorias en tejido cerebral.....	56
3.2	Efecto del cannabidiol sobre la repercusión hemodinámica de la hipoxia-isquemia cerebral.....	57
3.3	Efecto del cannabidiol sobre el daño pulmonar tras la hipoxia-isquemia cerebral.....	58
3.3.1	Efecto del cannabidiol sobre la afectación de la distensibilidad pulmonar y del intercambio de gases y el edema pulmonar.....	58
3.3.2	Efecto del cannabidiol sobre el daño histológico pulmonar.....	61
3.3.3	Efectos del cannabidiol sobre parámetros de inflamación pulmonar....	62
3.3.3.1	Efectos del cannabidiol sobre la variación de concentración de proteínas en lavado broncoalveolar.....	62
3.3.3.2	Efectos del cannabidiol sobre la expresión de citokinas proinflamatorias en tejido pulmonar.....	63

VII. DISCUSION.....	65
1. La hipoxia-isquemia produce daño pulmonar de origen inflamatorio.....	65
1.1 Daño cerebral.....	65
1.2 Afectación hemodinámica.....	67
1.3 Daño pulmonar.....	68
1.4 La lesión pulmonar tras la hipoxia-isquemia es de origen inflamatorio.....	69
1.5 Relación entre inflamación cerebral y pulmonar.....	72
2. El tratamiento con cannabidiol reduce el daño pulmonar tras hipoxia-isquemia cerebral.....	72
2.1 El tratamiento con cannabidiol mejora el daño cerebral de origen inflamatorio secundario a hipoxia-isquemia.....	72
2.2 El tratamiento con cannabidiol mejora la situación hemodinámica tras la hipoxia-isquemia cerebral.....	73
2.3 El tratamiento con cannabidiol mejora el daño pulmonar secundario a la hipoxia-isquemia cerebral.....	74
2.4 El tratamiento con cannabidiol disminuye la inflamación pulmonar secundaria a hipoxia-isquemia cerebral.....	75
VIII. CONCLUSIONES.....	77
IX. SINTESIS FINAL.....	79
X. BIBLIOGRAFÍA.....	80
XI. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	99

I. INTRODUCCIÓN

1. AFECTACION PULMONAR Y LESION CEREBRAL HIPOXICO-ISQUEMICA

1.1 Fisiopatología de la encefalopatía hipóxico-isquémica

La encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) neonatal se presenta en 1-6 de cada 1000 recién nacidos a término vivos. De forma resumida, durante la hipoxia-isquemia cerebral se produce una alteración de la polaridad transmembrana neuronal secundaria a la disfunción de las bombas iónicas. Esto, por un lado genera edema neuronal, que resulta lesivo por sí mismo, y por otro da lugar a una entrada masiva de calcio al interior de la célula. Paralelamente o a consecuencia de ello, se produce una acumulación intracelular de neurotransmisores excitotóxicos como el glutamato. Todo esto induce la síntesis de citokinas proinflamatorias como TNF- α , y la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) que, a su vez, genera grandes cantidades de NO. Tanto las citokinas proinflamatorias como el NO inducen la apoptosis neuronal. Por otro lado, durante la fase de reperfusión, se generan grandes cantidades de radicales libres con el consiguiente estrés oxidativo, que se ve agravado por el NO. La quimiotaxis de células inflamatorias al lugar de la lesión colabora aún más al daño neuronal con la liberación de radicales libres y más citokinas proinflamatorias (*Volpe JJ. 2001*). Además, durante la hipoxia-isquemia y la reperfusión se produce daño endotelial oxidativo y secundariamente aumento de la permeabilidad vascular y pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica (*Chan PH et al. 1984*). El edema vasogénico resultante colabora aún más al daño cerebral.

1.2 Afectación extracerebral en la encefalopatía hipóxico-isquémica

La EHI neonatal se puede acompañar de afectación multiorgánica aunque su aparición ya no se considera necesaria para el diagnóstico (*Hankins GD and Speer M. 2003, Committee on Obstetric Practice, ACOG. 2005*). Uno de los órganos que se ve afectado con más frecuencia es el pulmón. Así, dependiendo de los criterios diagnósticos utilizados, entre un 25 y un 86% de los recién nacidos con EHI desarrollan síntomas de disfunción respiratoria (*Perlman JM et al. 1989, Shankaran S et al. 1991, Martin-Ancel A et al. 1995, Shah P et al. 2004*). La afectación multiorgánica en la EHI neonatal se ha atribuido clásicamente a una redistribución del flujo sanguíneo secundario a la asfixia perinatal (*Peeters LL et al. 1979, Sheldon RE et al. 1979, Bocking AD et al. 1988*). Sin embargo, no se han estudiado mecanismos alternativos que expliquen esta asociación en recién nacidos. La importancia de la afectación multiorgánica se subraya por el hecho de que en recién nacidos con EHI existe proporcionalidad entre el número de órganos extracerebrales afectados y la probabilidad de una evolución adversa (*Shah P et al. 2004*). Sin embargo, la frecuencia y la extensión de la afectación multiorgánica no se pueden predecir en función de la severidad de la asfixia (*Perlman JM et al. 1989, Shankaran S et al. 1991, Martin-Ancel A et al. 1995, Shah P et al. 2004*).

1.3 El pulmón en la encefalopatía hipóxico-isquémica

Existen datos de estudios observacionales en adultos que demuestran que se puede desarrollar lesión pulmonar tras hemorragia cerebral o daño cerebral traumático (*Holland MC et al. 2003, Kahn JM et al. 2006, Kitamura Y et al. 2010*). La incidencia de esta complicación se correlaciona con la severidad de la lesión cerebral y representa

un factor independiente de mal pronóstico (*Gruber A et al. 1998, Kahn JM et al. 2006*).

La etiología de la disfunción respiratoria tras el daño cerebral en adultos no está claramente establecida y se han implicado diversos mecanismos tales como edema pulmonar neurogénico, disfunción del ventrículo izquierdo, infección e inflamación (*Macmillan CS et al. 2002, Wu S et al. 2006, Stevens RD and Nyquist PA. 2007*). Se ha demostrado, por ejemplo, que la hemorragia subaracnoidea induce un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) con acumulación de neutrófilos, liberación de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS), así como un incremento de la permeabilidad vascular (*Kitamura Y et al. 2010*). Esta cascada de acontecimientos puede condicionar en último término el desarrollo de daño tisular a distancia. En modelos animales, el daño cerebral induce una regulación al alza de mediadores inflamatorios tales como TNF- α , ICAM-1, IL-1 β y NF-k β , activación de la microglia y acumulación de neutrófilos (*Le Tulzo Y.1997, Wu S. 2006, Kalsotra A. 2007*).

El aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica en el contexto de este proceso inflamatorio puede conducir a la liberación a la circulación sistémica de citocinas proinflamatorias, ROS y migración de neutrófilos, dando lugar en último término a la aparición de daño pulmonar. No existen estudios en la literatura que investiguen los efectos de la hipoxia-isquemia cerebral y la posterior lesión por reperfusión sobre la lesión tisular a distancia. Sin embargo, sí se ha investigado el efecto sobre el pulmón de la lesión por isquemia-reperfusión en otros órganos. Así, la lesión isquémica renal bilateral se acompaña de un incremento de la concentración de IL-1, IL-6 e IL-12 en suero y de daño pulmonar en ratones (*Hoke TS et al. 2007*). De la misma manera, la lesión intestinal por isquemia-reperfusión induce daño pulmonar

agudo caracterizado por infiltración celular y disfunción microvascular con edema intersticial (*Schmeling DJ et al. 1989*). El papel de los neutrófilos en este tipo de lesión se ve apoyado por el hecho de que la depleción de neutrófilos o la inhibición de la adherencia de éstos previenen el daño tisular a distancia secundario a isquemia-reperfusión intestinal (*Poggetti RS et al. 1992, Hill J et al. 1992*).

2. EL SISTEMA CANNABINOIDE

2.1 Los cannabinoides

Los cannabinoides son componentes de la planta *Cannabis sativa* con efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores, antioxidantes y analgésicos, que ejercen su acción principalmente mediante la activación de los receptores CB1 y CB2 (*Pacher P et al. 2006*). Su posible papel terapéutico se ha estudiado en diversas patologías neurológicas, inflamatorias y neoplásicas (*Bifulco M et al. 2002, Arévalo-Martín A. 2008, Capasso R et al. 2008, Martín-Moreno AM et al. 2011*).

Mechoulam y Gaoni describieron por primera vez en los años sesenta el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) (Figura 1), principio activo responsable de los efectos psicoactivos del cannabis (*Gaoni Y y Mechoulam R. 1964*). Esta sustancia se aisló en la resina amarillenta que cubre las hojas y sobre todo la flor de la planta *Cannabis sativa*. Se han identificado dos fenotipos de la planta: una rica en cannabidiol (CBD) y prácticamente carente de THC, utilizada fundamentalmente para uso textil, y otra rica en THC y por tanto con potentes efectos psicoactivos que ha sido utilizada desde hace 5000 años con fines recreativos o medicinales (*Appendino G et al. 2011*). Esta planta contiene aproximadamente 100 tipos diferentes de cannabinoides, incluido el THC, que se acumulan en pequeñas glándulas epidérmicas resinosas. Las investigaciones sobre los mecanismos de la acción psicotrópica del THC condujeron al descubrimiento de un receptor cannabinoide (*Howlett AC et al. 1988*) y posteriormente de su ligando específico, la anandamida (*Devane WA et al. 1992*).

En efecto, la definición de la estructura del THC y el descubrimiento de un receptor específico para los opioides en los años 60-70, supusieron un gran impulso para la investigación sobre receptores cannabinoides. La idea de que, al igual que con los opiáceos, los elementos psicoactivos del cannabis pudieran actuar a través de la interacción con receptores específicos localizados en el sistema nervioso central había sido desechada basándose en la falsa idea de que el THC y su enantiómero tenían similar actividad psicoactiva. Además, determinadas dificultades técnicas derivadas de la naturaleza altamente hidrofóbica de los cannabinoides y el escaso impacto social y de salud de los cannabinoides en comparación con los opioides, contribuyeron al enlentecimiento de la investigación sobre receptores cannabinoides (*Appendino G et al. 2011*). Sin embargo, el descubrimiento por parte de los laboratorios Pfizer de una molécula sintética, el CP 55,940, 20 veces más potente que el THC (*Rinaldi-Carmona M et al. 1995*), supuso un impulso decisivo ya que fue utilizado para valorar la presencia y distribución de receptores cannabinoides en SNC (*Herkenham M et. 1990, Devane WA et al. 1998*). De hecho, se encontraron niveles elevados de receptores cannabinoides en córtex, hipocampo, amígdala, ganglios basales y cerebelo.

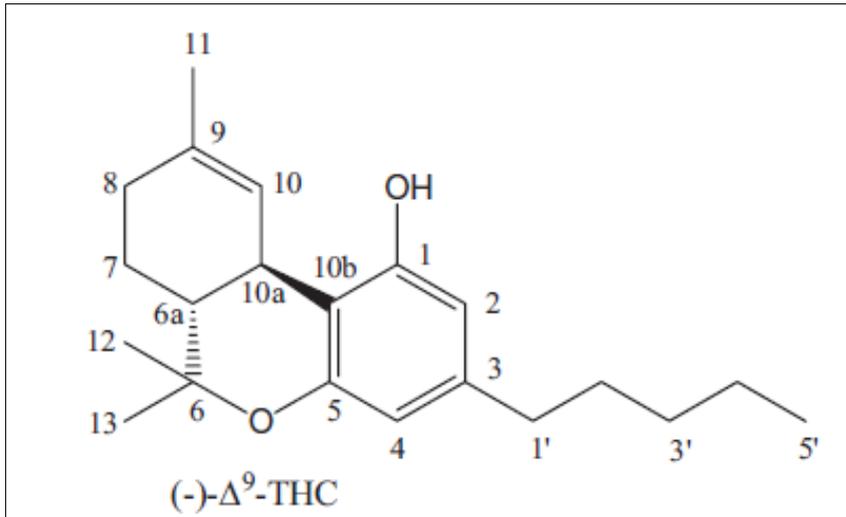


Figura 1. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol

2.2 Receptores cannabinoides

Se han identificado y clonado dos receptores cannabinoides hasta la fecha, CB1 y CB2. Los receptores CB1 se encuentran principalmente en el SNC y participan en la coordinación del movimiento, cognición y respuesta al dolor, entre otras acciones (Pertwee RG *et al.* 2010). Los receptores CB2 se encuentran en tejido linfoide, linfocitos B y T, células NK, macrófagos, monocitos, microglía y mastocitos, participando en la modulación de la respuesta inmunológica (Martínez Orgado JA *et al.* 2005, Begg M *et al.* 2005, Pertwee RG *et al.* 2010). CB2 también se localiza en células del cerebro (Van Sickle MD *et al.* 2005) y en células endoteliales de diversos órganos como el pulmón (Zoratti C *et al.* 2003). Desde un punto de vista estructural (figura 2), los receptores CB1 y CB2 presentan una homología del 40% y ambos comparten la estructura heptahelicoidal de los receptores unidos a proteínas G (Xie XQ *et al.* 2003). El resultado de la interacción con el receptor cannabinoide está mediado por una cascada de vías de transducción de señal que incluye la interacción con

canales de calcio y potasio (CB1) y diversas kinasas como MAPK (Pertwee RG et al. 2010) (Figura 3).

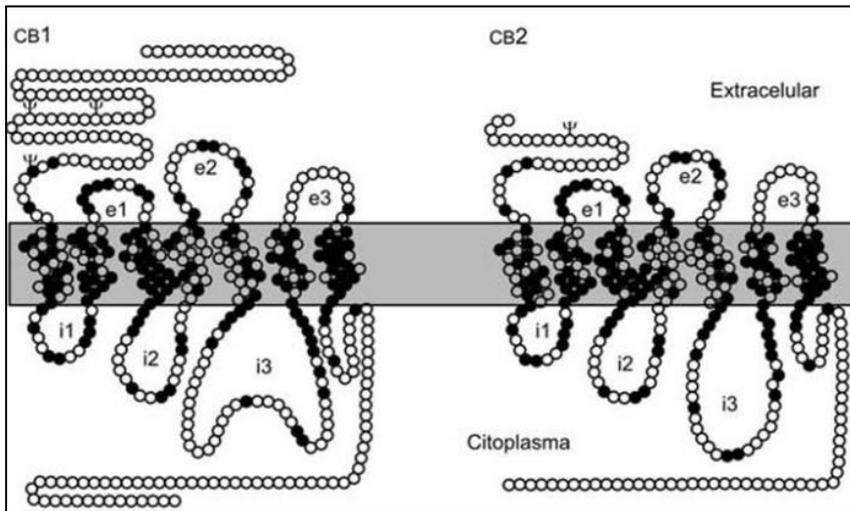


Figura 2. Estructura molecular de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.

Desde un punto de vista filogenético, los receptores cannabinoides se asemejan a otros receptores implicados en la regulación de la supervivencia y el crecimiento celular (Huwiler A y Pfeilschifter J. 2008). Los receptores CB1 y CB2 están acoplados a través de proteínas G, negativamente a adenilato ciclasa y positivamente a MAPK. Además pueden regular canales iónicos a través de las proteínas G. En concreto, activan canales de potasio transitorios de tipo A (colaboran en la repolarización) y canales de potasio rectificadores del interior, mientras que inhiben canales de potasio de tipo D (activan la onda inicial de entrada de calcio) y canales de calcio de tipo N y P/Q. La activación de estos mecanismos de señalización por parte de CB1 en las

terminales presinápticas ocasiona la inhibición de la neurotransmisión y de la excitabilidad neuronal (Díaz Laviada I. 2009). Además, los ligandos cannabinoides pueden incrementar la concentración intracelular de calcio. Esta acción se produce fundamentalmente mediante la activación de fosfolipasa C y receptores IP3 del retículo (Díaz-Laviada I y Ruiz-Llorente L. 2005, De Petrocellis L et al. 2007). Entre los mecanismos de señalización intracelular activados por cannabinoides se encuentran tanto cascadas promitógenas como de estrés. Los cannabinoides activan raf/MEK/ERK en multitud de células y tejidos in vitro e in vivo (Demuth DG y Molleman A. 2006, Moranta D et al 2007). En algunas ocasiones esta vía se activa por la disminución del AMPc intracelular con la consiguiente inhibición de PKA, lo que produce la activación de la ruta ERK. Otras posibles vías incluyen la interacción con β -arrestinas y la activación de PI3K/Akt. Los cannabinoides activan las cascada IP3/Akt en distintos tipos celulares lo que se relaciona con respuestas de supervivencia y protección celular (Díaz-Laviada I y Ruiz-Llorente L. 2005, Ozaita A et al. 2007). Sin embargo, y en concordancia con el efecto bifásico de los cannabinoides, también hay estudios que demuestran una inhibición tanto de MEK/ERK como de PI3/Akt (Ellert-Miklaszewska A et al. 2005, Greenhough A et al. 2007). Por otro lado, los cannabinoides también activan vías de estrés, como la acumulación de ceramida y la cascada p38/MAPK, a través de la cual inhiben el crecimiento celular (Gustafsson K et al. 2006).

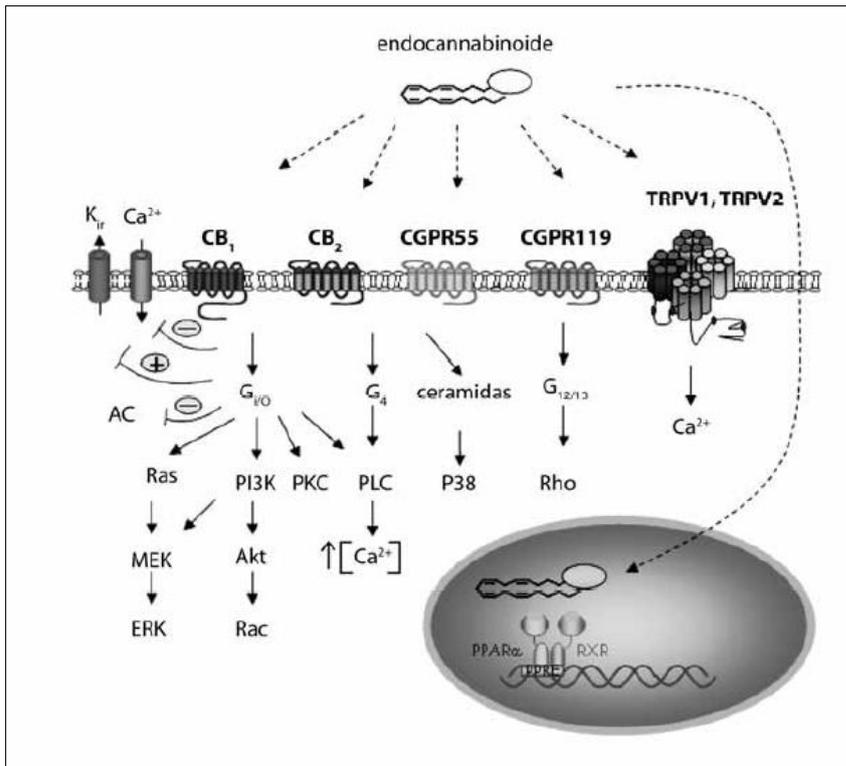


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de transducción de señal tras la activación de receptores cannabinoides.

2.3 Otros receptores relacionados con los cannabinoides

Algunos endocannabinoides pueden unirse al receptor de vanilloides tipo 1 (TRPV1), canal catiónico no selectivo (permeable a Na⁺, Ca²⁺ y H⁺) que pertenece a la familia de los receptores activados por potencial transitorio (TRPs). TRPV1 media la sensación de dolor en respuesta al calor y farmacológicamente se activa por capsaicina, cannabinoides endógenos y metabolitos de la lipooxigenasa (Vennekens R et al. 2008). Así los endocannabinoides podrían regular algunas funciones fisiopatológicas a través de este receptor. Por ejemplo, recientemente se ha descrito que la N-estearoiletanolamida inhibe la reacción alérgica inflamatoria mediante la activación de

TRPV1 (*Dalle Carbonare M et al. 2008*). Además de unirse a receptores de membrana, los endocannabinoides son ligandos potenciales de los receptores nucleares activados por proliferados de peroxisomas (PPAR). Los PPAR son una familia de receptores nucleares o factores de transcripción activados por ligandos que juegan un papel importante en el metabolismo lipídico, homeostasis de la glucosa y sensibilidad a la insulina. Estos receptores dimerizan con el receptor de retinoides RXR para regular la transcripción de aquellos genes con elementos de respuesta a PPAR. Los ligandos endógenos de estos receptores son ácidos grasos y derivados eicosanoides (*Díaz-Laviada I. 2009*). Recientemente se ha demostrado que algunos cannabinoides ejercen sus efectos orexígenos y antiinflamatorios a través de la unión a estos receptores (*Burstein S. 2005, Sun Y y Bennett A. 2007*).

También se ha descrito recientemente la participación de otro receptor, el GPR55, en algunos de los efectos de los cannabinoides (*Pertwee et al, 2010*), aunque su papel en las acciones farmacológicas de THC y en los efectos fisiológicos de los cannabinoides endógenos resulta todavía controvertido (*Sawzdargo M et al. 1999*).

Los receptores de adenosina también han sido implicados en las acciones de algunos cannabinoides. Así, recientemente se ha sugerido que los efectos antiinflamatorios de CBD podrían estar relacionados con la inhibición de la recaptación de adenosina incrementando por tanto su unión al receptor A_{2A} (*Carrier EJ et al. 2006, Durst R et al. 2007*). De la misma manera, CBD interacciona con receptores de serotonina (*Russo EB et al. 2005*) habiéndose encontrado una relación entre los efectos ansiolíticos de CBD y

la interacción con el receptor serotoninérgico 5HT1A (*Campos AC y Guimarães FS. 2008*).

2.4 Efectos de los cannabinoides dependientes o no de receptores

Muchos de los efectos psicoactivos del THC parecen estar mediados a través de CB1, mientras que los cannabinoides no psicoactivos, como CBD, se considera que presentan muy baja afinidad tanto por CB1 como por CB2 (*Pertwee RG et al. 2010*), aunque otros autores ponen en duda este punto (*Castillo A et al 2010*), tema sobre el que se volverá más adelante en el texto. CBD ha demostrado actividad agonista inversa del receptor CB1 (*Thomas A et al. 2007*). Como se ha dicho previamente, los receptores CB2 están presentes en algunas células del sistema inmune y se cree que juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmune (*Martínez Orgado JA et al. 2005*). Los efectos inmunomoduladores de los cannabinoides no solo están mediados a través de receptores CB2, sino también a través de receptores vanilloides (VR1), receptores de adenosina, PPAR y también por mecanismos independientes de receptor (*Martínez Orgado JA et al. 2005, Burstein S. 2005, Castillo A et al. 2010*). En modelos animales inmaduros de lesión cerebral hipóxico-isquémica se ha observado una disminución de la concentración de IL-6 y TNF- α , así como de la expresión de COX-2 e iNOS, mediada por receptores CB2 (*Castillo A et al. 2010*). La presencia de CB2 en células endoteliales de diversos órganos (*Zoratti C et al. 2003*) parece desempeñar también un papel importante en la modulación de la inflamación, ya que la estimulación de este receptor atenúa la activación de las células endoteliales humanas mediada por TNF- α , la migración transendotelial de monocitos y la adhesión

de éstos al endotelio (*Rajesh M et al. 2007*). El potente efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de los cannabinoides es la base de las investigaciones sobre su posible papel terapéutico en enfermedades tales como la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal, la esclerosis múltiple, el Alzheimer o la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras (*Capasso R et al. 2008, Alvarez FJ et al. 2008, Arévalo-Martín A. 2008, Castillo A et al. 2010, Martín-Moreno AM et al. 2011*).

La interacción con receptores cannabinoides se ha asociado a otros efectos farmacológicos como son los psicotrópicos, antieméticos, analgésicos y motores. Los efectos psicoactivos del THC se deben a la unión presináptica con el receptor CB1 mientras que los efectos sobre la memoria y sobre el control del movimiento parecen estar en relación con la presencia de este receptor en otras áreas del cerebro como hipocampo, ganglios de la base y cerebelo (*Fernández-Ruiz J y González S. 2005, Zarrindast MR et al. 2006*). La presencia de receptores CB1 en nervios colinérgicos del tracto gastrointestinal y en tronco cerebral es responsable respectivamente de los efectos de inhibición de la motilidad intestinal y antieméticos mediados por THC (*Di Carlo G e Izzo AA. 2003, Coutts AA e Izzo AA. 2004*). Otro efecto de THC es el estímulo del apetito que también parece estar en relación con la unión a CB1 (*Lewis DY y Brett RR. 2010*). Uno de los efectos terapéuticos más importantes de la interacción con receptores cannabinoides es el analgésico, derivado de la participación de CB1 en la transmisión de la información nociceptiva (*Mao J et al. 2000*). Se piensa que el potencial clínico de los cannabinoides va más allá de la interacción con los receptores cannabinoides, especialmente para los compuestos no psicoactivos. Así, por ejemplo, CBD estimula PPAR-gamma, el receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) y el receptor

serotoninérgico 5HT1A (*Appendino G et al. 2011*). La activación de los receptores 5HT1A por parte de CBD sería responsable de los efectos antidepresivos observados en ratones (*Zanelati TV et al. 2010*).

2.5 Endocannabinoides

La existencia de receptores cannabinoides implica la existencia de ligandos endógenos. La primera de estas moléculas fue descubierta en 1992 (*Devane WA et al. 1992*) y recibió el nombre de araquinodoil etanolamina (AEA) (Figura 4), también llamada anandamida (palabra cuya raíz *ananda* significa felicidad en sánscrito). A partir de ese momento, varios agonistas endógenos de CB1 fueron añadiéndose a la lista, de los cuales el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Figura 5), demostró ser más potente que la anandamida (*Mechoulam R et al. 1995*). Otros compuestos mono o diinsaturados endógenos comparten propiedades químicas con AEA o 2-AG, pero no actúan a través de receptores CB1 o CB2; el más relevante es la palmitoiletanolamida, que ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y analgésicos no mediados a través de estos receptores (*Costa B et al. 2008*). Se piensa que estos efectos podrían deberse a la interacción con el receptor GPR55 (*Godlewski G et al. 2009*). Estas moléculas parecen potenciar los efectos de la AEA y del 2-AG (*García MC et al. 2009*). En humanos se ha descrito la presencia de AEA en cerebro y en tejidos periféricos como bazo, corazón, testículos, útero y endotelio vascular (*Felder CC et al. 1996, Randall MD. 2007*). Las áreas de cerebro que presentan mayor concentración de AEA, corteza hipocámpal, estriado y cerebelo, son precisamente las zonas en las que la expresión de CB1 es

mayor (Felder CC et al. 1996). Sin embargo, los niveles encontrados en fluidos corporales, plasma, suero o líquido cefalorraquídeo son relativamente bajos, lo que apoya la idea de que la AEA actúa localmente, produciéndose cerca de sus lugares de acción. Uno de los tejidos con mayor concentración de AEA es el útero, lo cual indica el papel relevante esta sustancia en la reproducción. Por otra parte, se ha detectado la presencia de 2-AG en cerebro, intestino, páncreas, bazo, hígado, pulmón y riñón (Sugiura T y Waku K. 2002). El hecho de que los niveles de 2-AG en cerebro sean unas 200 veces mayores que los de AEA, y que el 2-AG se comporte como un agonista total frente a CB1 y CB2 hace proponer a algunos autores que este compuesto sea el verdadero agonista endógeno (Sugiura T et al. 2006). Los niveles de endocannabinoides varían en respuesta a diferentes estímulos, en los distintos estadios del desarrollo y en diversas situaciones patológicas, lo cual resalta la importancia fisiopatológica del sistema cannabinoide endógeno, convirtiéndolo en una atractiva diana terapéutica (Di Marzo V y Petrosino S. 2007).

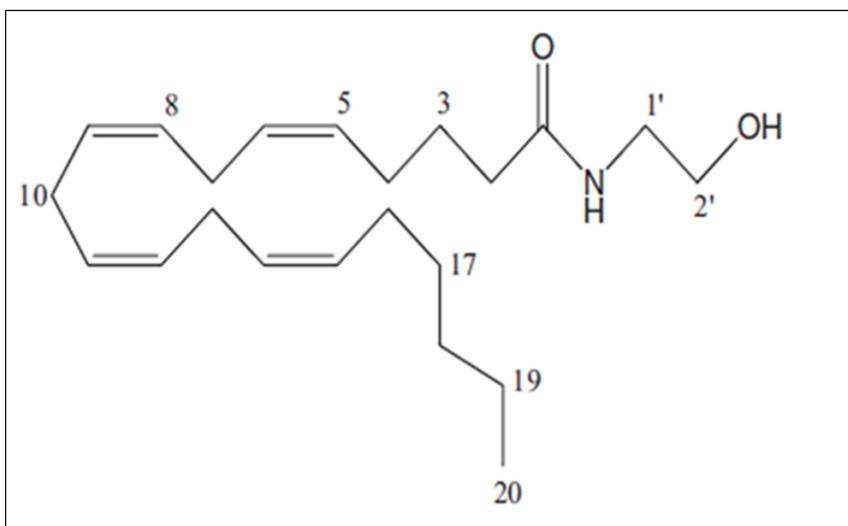


Figura 4. Estructura química de la AEA (anandamida).

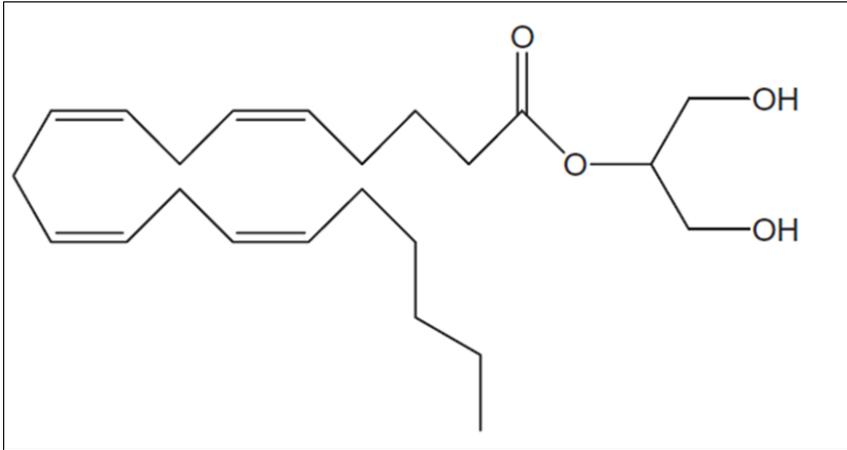


Figura 5. Estructura química del 2-araquidonoil glicerol (2-AG).

2.6 El cannabidiol

El CBD (Figura 6) es un fitocannabinoide carente de efectos psicotrópico debido a su escasa afinidad por los receptores CB1 (*Pertwee RG et al. 2010*). CBD ha demostrado tener un potente efecto antiinflamatorio, modulando la producción de citokinas y la actividad COX, junto con una capacidad antioxidante superior incluso a la del ácido ascórbico o el tocoferol (*Hampson AJ et al. 1998, Pertwee RG. 2004, Sumariwalla PF et al. 2004, Esposito G et al. 2007, Castillo A et al 2010*). Además inhibe el transporte de calcio a través de las membranas, la recaptación y la hidrólisis enzimática de anandamida, la expresión proteica de la iNOS y la activación de NK-K β (*Pertwee RG. 2004, Esposito G et al. 2006, Mechoulam R et al. 2007*).

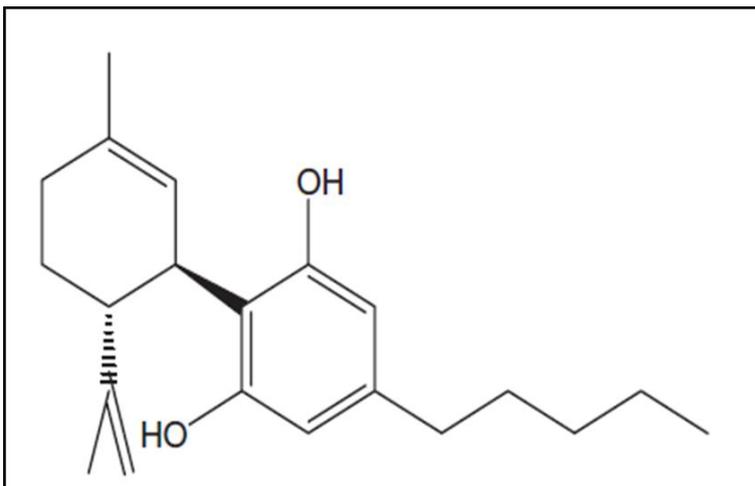


Figura 6. Estructura química del cannabidiol.

Aunque clásicamente se ha atribuido a CBD una baja afinidad por los receptores CB2 (Pertwee RG et al. 2010), como se ha mencionado anteriormente en el texto, estudios en cerebro de animales inmaduros demuestran un importante papel modulador de CBD sobre la inflamación mediado por CB2, regulando la producción de citocinas y la expresión de COX-2 e iNOS (Castillo A et al 2010), lo cual sugiere una posible modificación de la afinidad de este receptor relacionada con el desarrollo. Recientemente se ha propuesto que la actividad antiinflamatoria de CBD puede estar mediada también a través de la interacción con receptores de adenosina (Carrier EJ et al. 2006). CBD ha demostrado actividad antiinflamatoria en modelos animales de artritis, de hipermotilidad intestinal y de diabetes (Sumariwalla PF et al. 2004, Rajesh M et al. 2007, Capasso R et al. 2008). Además, el uso combinado de CBD y THC reduce el dolor articular en la artritis reumatoide (Blake DR et al 2006). El efecto antioxidante del CBD no depende exclusivamente de su interacción con receptores cannabinoides, ya que la administración de antagonistas de éstos no inhibe el efecto antioxidante (Hampson AJ et al. 1998). La molécula de CBD, al contrario de lo que ocurre con

cannabinoides sintéticos como el WIN 55,212-2, contiene una estructura fenólica típica de muchos antioxidantes obtenidos de plantas (Figura 7) en la cual radica de su efecto antioxidante independiente de receptor (*Chen Y y Buck J. 2000*).

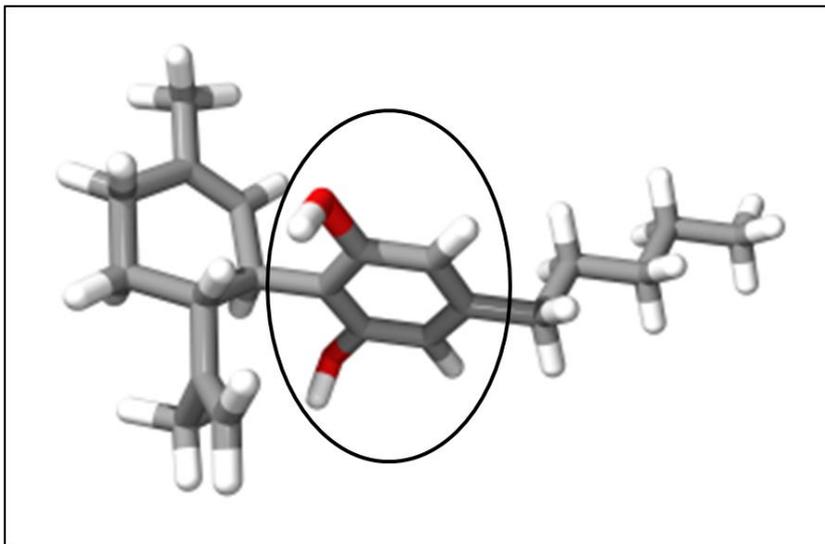


Figura 7. Esquema tridimensional de la molécula de CBD con el grupo fenol señalado en el círculo.

CBD ha demostrado tener un potente efecto neuroprotector tras el daño cerebral hipóxico-isquémico en diversos modelos animales inmaduros, tanto in vivo como in vitro, derivado principalmente de su acción antiinflamatoria y antioxidante mediada por CB2 y de la unión a receptores de adenosina (*Martínez-Orgado J et al. 2007, Alvarez FJ et al. 2008, Castillo A et al 2010, Lafuente H et al. 2011*). Por tanto, la actividad neuroprotectora de CBD y de otros cannabinoides no depende totalmente de la activación de receptores cannabinoides sino que también se debe a un mecanismo independiente de ésta (*Appendino G et al. 2011*). Por ejemplo, la

activación de receptores 5HT_{1A} por parte de CBD se acompaña de un incremento del flujo cerebral y de un efecto neuroprotector (*Russo EB et al. 2005*). En cualquier caso, independientemente del mecanismo de acción, los cannabinoides y particularmente CBD, se han propuesto como tratamiento neuroprotector en enfermedades como la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal, el Parkinson, la esclerosis múltiple o la esclerosis lateral amiotrófica (*Pertwee RG. 2004, Lastres-Becker I et al. 2005, Esposito G et al. 2006, Alvarez FJ et al. 2008, Arévalo-Martín A. 2008, Castillo A et al. 2010*).

II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal se acompaña con frecuencia de afectación de otros órganos y entre ellos el pulmón. En la actualidad no existe ningún tratamiento para la afectación multiorgánica secundaria a la EHI salvo la terapia de soporte. A pesar de que la lesión de órganos extracerebrales en esta patología se atribuye a un mecanismo compensatorio de redistribución del flujo sanguíneo, estudios en otros modelos de daño cerebral sugieren la existencia de una interacción entre órganos distantes basado en mediadores de la inflamación y radicales de oxígeno que condicionaría el desarrollo de lesión tisular a distancia de origen inflamatorio. A la vista de esto, la utilización de agentes antiinflamatorios podría jugar un papel en el manejo de esta complicación de la EHI. El potente efecto neuroprotector y antiinflamatorio demostrado por el cannabidiol convierten a esta molécula en una candidata ideal para este fin.

III. HIPÓTESIS

La lesión cerebral por hipoxia-isquemia induce lesión pulmonar a distancia de origen inflamatorio en el recién nacido. En este escenario, la administración de un potente antiinflamatorio como el cannabidiol disminuirá el daño pulmonar.

IV. OBJETIVOS

1. Diseñar un modelo de daño pulmonar secundario a lesión cerebral hipóxico-isquémica en recién nacido. Para ello se utilizará un modelo de hipoxia-isquemia cerebral en cerdo recién nacido, en el que se determinará la presencia de daño pulmonar mediante:
 - 1.1. Estudio durante las 6 horas posteriores al daño hipóxico-isquémico cerebral de la variación de parámetros de edema pulmonar, distensibilidad e intercambio gaseoso.
 - 1.2. Estudio histológico de cortes de diversas áreas pulmonares, cuantificando el daño mediante una puntuación histopatológica.
 - 1.3. Estudio de parámetros de inflamación pulmonar mediante lavados broncoalveolares.
 - 1.4. Estudio de parámetros de inflamación pulmonar mediante valoración de producción de citoquinas en tejido.
2. Estudiar la capacidad del tratamiento con cannabidiol tras el episodio hipóxico-isquémico para reducir el daño pulmonar, mediante:
 - 2.1. La comparación de la evolución de los parámetros de edema, distensibilidad e intercambio gaseoso según el tratamiento con vehículo o cannabidiol.
 - 2.2. La comparación de la evolución de los parámetros de daño histológico según el tratamiento con vehículo o cannabidiol.

2.3. La comparación de la evolución de los parámetros de inflamación pulmonar estudiados mediante lavados broncoalveolares según el tratamiento con vehículo o cannabidiol.

2.4. La comparación de la evolución de los parámetros de inflamación pulmonar valorados mediante estudio de producción de citoquinas en tejido según el tratamiento con vehículo o cannabidiol.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó de acuerdo a la normativa europea y española sobre investigación en animales (EU 86/609 and RD 1201/2005).

1. Preparación de los animales:

Se utilizaron lechones de 1-3 días de vida que fueron anestesiados con sevoflurano (5% para la inducción y 1% como mantenimiento) y posteriormente mantenidos con una perfusión de propofol (14 mg/Kg/h), suspendiéndose el sevoflurano. Se indujo relajación muscular con vecuronio (0,6 mg/Kg/h). Los animales fueron intubados orotraquealmente con un tubo Portex del 2.5-3 y ventilados mecánicamente con presión positiva intermitente (Evita 4. Dräger. Lubeck, Alemania) utilizando los siguientes parámetros iniciales: PEEP 5 cmH₂O, frecuencia respiratoria 30 rpm, tiempo inspiratorio 0,5 seg. Se ajustó el pico inspiratorio de presión (PIP) para obtener volúmenes corrientes (Vt) de 6 mL/Kg. La FiO₂ se fijó inicialmente en 0,21 y posteriormente se ajustó para mantener presiones arteriales de oxígeno (PaO₂) de 60-90 mmHg y saturaciones de O₂ (SatO₂) de 90-95%. La frecuencia respiratoria se modificó para mantener la PaCO₂ entre 35 y 45 mmHg. Se disecó y canuló la arteria femoral derecha con un catéter Pulsioath de 3F de diámetro externo (Pulsion. Munich, Alemania) para monitorización hemodinámica y para la obtención de muestras de sangre arteriales. Se disecó y canuló la vena yugular derecha con un catéter de doble luz Nutriline Twinflo de 2F de diámetro externo (Vygon. Valencia, España) para la infusión de medicaciones y para medición de gasto cardiaco (GC) y

agua extravascular pulmonar (EVLW, extravascular lung water) en combinación con la arteria femoral. Se canalizó una vena periférica en la oreja con un catéter Abbocath 21F de diámetro externo (Vygon. Valencia, España) para administración de fluidoterapia. Se mantuvo la temperatura corporal entre 37,5 y 38,5°C mediante el uso de sábanas de aire caliente (Bair Hugger. Agustine Medical Inc. Eden Prairie. MN. USA).

2. Monitorización respiratoria y hemodinámica:

Se midió de forma continua V_t , presión media en la vía aérea (PMVA), distensibilidad dinámica (C_{din}) y resistencia en la vía aérea mediante un neumotacógrafo integrado en el respirador Evita 4. Se monitorizó el CO_2 exhalado ($EtCO_2$) y la $SatO_2$ mediante un monitor con capnógrafo y pulsioxímetro integrados (Ohmeda 5250 RGM. Louisville. CO. USA). Se midió de forma continua el GC, tensión arterial media (TAM) y la frecuencia cardíaca (PiCCO. Pulsion Medical Systems. Munich, Alemania). Mediante el PiCCO se midió EVLW en situación basal, al final de la hipoxia-isquemia (HI) y de forma horaria durante el experimento.

3. Monitorización cerebral:

Se monitorizó la actividad cerebral (amplitud integrada) y la impedancia mediante un monitor de EEG de dos canales (BRM2, BrainZ Instruments. Auckland, Nueva Zelanda). Se determinó la saturación regional de oxígeno cerebral (rSO_2) mediante espectroscopia cercana al infrarrojo (Invos. Colorado. USA).

4. *Protocolo experimental:*

Tras la estabilización posterior a la instrumentación, los animales fueron asignados de forma aleatoria a uno de los siguientes grupos experimentales:

- Grupo de tratamiento con vehículo (VEH) (n=8): se indujo hipoxia-isquemia (HI) mediante la compresión de ambas carótidas con ocluidores vasculares (Vessel Loops. Bard Nordic. Helsingborg. Sweden) y con la reducción de la FiO₂ a 0,10 durante 30 minutos. Tras los 30 min de HI se permitió que los animales se recuperaran con O₂ ambiental. 30 minutos tras la finalización del periodo de HI se administró una solución de etanol:solutol:salino 2:1:17.

- Grupo de tratamiento con cannabidiol (CBD) (n=10): Se procedió de forma idéntica al grupo VEH, salvo que 30 minutos tras la finalización del periodo de HI se administró 1 mg/Kg de CBD iv, mediante una solución de CBD en vehículo a 5 mg/mL.

- Grupo control o sham (SHM) (n= 5): se utilizaron lechones instrumentados pero no sometidos a HI como grupo control.

Seis horas tras la HI o el periodo equivalente en SHM, los animales fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de cloruro potásico.

5. *Obtención y procesamiento de líquido de lavado broncoalveolar:*

Se realizó lavado broncoalveolar (LBA) en situación basal y tras el sacrificio mediante la técnica descrita por la *ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. (2000)*. Se

instilaron 3 mL/Kg de suero salino fisiológico dividido en 3 alícuotas a través del tubo endotraqueal mediante una sonda de aspiración controlada de 6 F (Vygon. Valencia, España) y una jeringa de 5 mL BD Plastipak (Becton Dickinson. Madrid, España). Cada una de las alícuotas se recuperó inmediatamente tras su instilación utilizando la misma jeringa con que fue administrada. Se desechó la primera alícuota, que tiene un origen predominantemente bronquial, y las otras dos se agruparon. Se centrifugó la muestra (1000 rpm durante 10 min a 4°C), se recogió el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta su procesamiento definitivo.

5.1 Determinación de la concentración de proteínas totales en LBA:

Para la medida de proteínas se utilizó el BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se realizó una curva estándar de BSA (2 mg/mL). A continuación se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se atemperaron las muestras a temperatura ambiente. Tras ello se analizó la absorbancia a 562 nm mediante espectrofotometría. Los datos obtenidos de las muestras se extrapolaron a la curva estándar calculando así la concentración total de proteínas. Se determinó el incremento de concentración de proteínas en el lavado final con respecto al lavado basal.

6. Procesamiento de los pulmones:

Tras el sacrificio, los pulmones y el corazón fueron extraídos en bloque. Los pulmones fueron hinchados con una presión continua de distensión de 30 cmH₂O y posteriormente la tráquea fue ligada. Tras realizar una incisión en la aurícula izquierda se infundió suero salino a través de la arteria pulmonar para extraer la sangre del lecho vascular pulmonar. Posteriormente el pulmón izquierdo fue extraído y congelado a -80°C para el análisis posterior de citokinas proinflamatorias. El pulmón derecho fue infundido con paraformaldehído al 4% a través de la arteria pulmonar y fijado en un baño de paraformaldehído al 4% durante 24h. Una vez fijados los pulmones, éstos fueron incluidos en parafina. Se obtuvieron secciones de los lóbulos superior, inferior y porciones anterior y posterior del medio que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

6.1 Histología de los pulmones:

Se aplicó un sistema de puntuación semicuantitativo basado en la severidad de la lesión (negativo = 0, leve = 1, moderado = 2, severo = 3) tal como ha descrito Merz U et al. (2000). Se evaluaron 4 características principales que comprenden un total de 15 apartados: atelectasia, edema (edema septal, edema intersticial, linfangiectasia, exudado intralveolar), inflamación (infiltración alveolar de neutrófilos, infiltración intersticial de neutrófilos, infiltración intersticial de linfocitos, adhesión de granulocitos) y otros (hemorragia alveolar, hiperemia congestiva, agregación de plaquetas, depósito de fibrina, formación de membranas hialinas, descamación del

epitelio bronquial y bronquiolar). La suma del total de los 15 parámetros obtenida en todos los animales de cada grupo se dividió por el número de animales en cada grupo para calcular la puntuación total de daño pulmonar.

7. Procesamiento del cerebro:

Tras el sacrificio, los cerebros fueron perfundidos con suero salino frío heparinizado a través de las arterias carótidas y a continuación extraídos. Un hemisferio fue dividido en cuatro secciones de 1.5 cm de grosor y fijado con paraformaldehído al 4% para ser almacenado a 4°C. El otro hemisferio fue seccionado de forma similar, y los segmentos congelados inmediatamente y guardados a -80°C.

7.1 Histología cerebral:

Los cerebros una vez fijados, fueron cortados en secciones de 5 mm de anchura e incluidos en parafina. Se hicieron cortes coronales de 4 µm que se tiñeron en portas con la técnica de Nissl. Para la preparación de la tinción de Nissl se calentaron en horno a 60° durante 10 minutos, 10 mL de violeta de cresilo con una gota de ácido acético para cada 8 preparaciones. Se desparafinaron las secciones manteniéndolas durante una noche en horno a 60° y lavándolas secuencialmente mediante xilol, etanol 100%, etanol 98%, etanol 80% y agua. Cada lavado duró 20 minutos. A continuación las secciones se cubrieron con la tinción de Nissl durante 1 minuto y posteriormente fueron calentadas en horno a 60° durante 5 minutos. Tras ello, las secciones fueron

lavadas secuencialmente con H₂O, etanol 96% y etanol 100%. Cada lavado duró 1 minuto. Finalmente, las secciones se introdujeron en xilol durante 2 minutos y fueron colocadas en portas. Para determinar necrosis neuronal precoz se examinaron áreas de 1mm² de los tres lóbulos centrales del córtex parietal a 3 mm del plano posterior, tal como se muestran en el atlas estereotáxico del cerebro del cerdo de Felix B et al. (1999), centrándose en las capas II-III, utilizando un microscopio óptico (400x) y una cuadrícula de 50 compartimentos; se calculó la media de 3 compartimentos. Se identificaron las neuronas normales por la presencia de los típicos núcleos con nucleoplasma claro y un nucléolo diferenciado rodeado por un citoplasma teñido de púrpura. Se identificaron las neuronas dañadas cuando no era posible la distinción entre núcleo y citoplasma (picnótico o necrótico).

8. Valoración de citocinas proinflamatorias en tejidos pulmonar y cerebral:

Se utilizaron 30 mg de tejido para la extracción de proteínas y posterior cuantificación de distintas citoquinas mediante un panel que nos permitió medir hasta 10 citoquinas en cada muestra. Para la extracción se utilizó el T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent. Thermo Scientific). Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas de cada muestra utilizando el BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), para ajustar la concentración de proteínas a 500µg/ml por pocillo. Para detectar y cuantificar las citoquinas en tejido, se utilizó un panel de citoquinas específico para muestras de tejido porcino (Quantibody Porcine Cytokine Array, RayBiotech, Inc.).

9. Análisis estadístico:

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar. Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que los datos no seguían una distribución normal, por lo que se seleccionaron desde entonces tests no paramétricos para el análisis estadístico. Así, para la comparación entre dos medias se empleó el test de Mann-Whitney. En caso de comparaciones múltiples, se compararon las medias mediante el test de Kruskal-Wallis para análisis de rangos con el test post-hoc de Dunn para comparaciones múltiples. Para el análisis de la correlación entre variables numéricas se empleó la R de Spearman. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete informático SPSS 15.0.0.

VI. RESULTADOS

1. GENERALIDADES

Todos los animales fueron machos. Los del grupo SHAM tuvieron una media de edad de $1.8 \pm 0,2$ días y un peso medio de 1.8 ± 0.1 kg; los el grupo VEH fueron de $1,7 \pm 0,2$ d y $1.7 \pm 0,1$ kg. Los del grupo CBD fueron de $2 \pm 0,1$ d y $1,8 \pm 0,1$ Kg. (todos $p > 0.05$). Las características de edad y peso de los diversos grupos experimentales se muestran en la Tabla 1.

Tabla I. Características de los grupos de estudio.

Grupo	SHM (n=5)	VEH (n=8)	CBD (n=10)	p
Macho	5 (100%)	8 (100%)	10 (100%)	$p > 0.05$
Edad (días)	$1.8 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$2 \pm 0,1$	$p > 0.05$
Peso (Kg)	1.8 ± 0.1	$1.7 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$p > 0.05$

Datos de edad y peso expresados como media \pm desviación estándar. SHM, sham; VEH, vehículo; CBD, cannabidiol.

2. DISEÑO DE UN MODELO DE DAÑO PULMONAR SECUNDARIO A LESION CEREBRAL HIPOXICO-ISQUEMICA

2.1 Daño cerebral hipóxico-isquémico

2.1.1. Alteración de la función y flujo cerebrales

Todos los animales en el grupo de VEH desarrollaron una alteración profunda de la actividad eléctrica y de la oxigenación cerebral durante el periodo de HI, evidenciada por una disminución de la amplitud media en el aEEG y de las rSO2 respectivamente respecto a los valores basales (Figuras 8 y 9). En el grupo SHAM hubo un discreto descenso de la amplitud del aEEG respecto al basal al final del periodo de estudio, atribuible a la sedación; en el grupo VEH, la amplitud cayó hasta valores inferiores a 5 μ V durante la HI, sin que se apreciara una recuperación significativa durante el período de estudio ($p < 0,05$) (Figura 8).

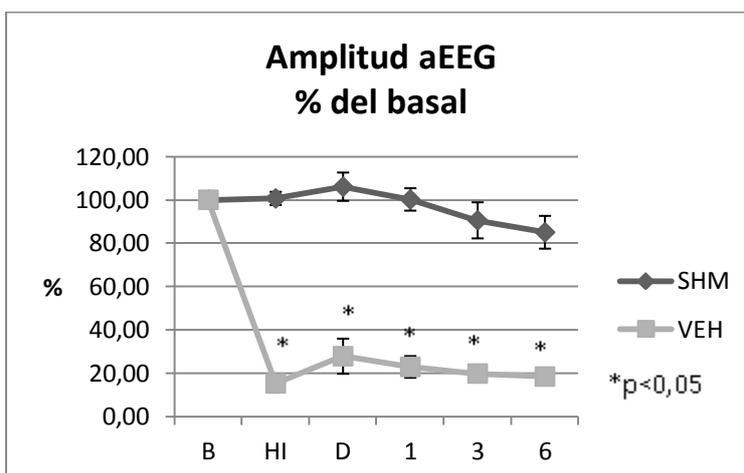


Figura 8. Porcentaje de cambio de la amplitud media del aEEG durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos de hipoxia-isquemia (VEH) y control (SHM). B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

La rSO₂ cerebral, que se mantuvo estable en SHAM, cayó de forma significativa durante la HI en los VEH (Figura 9). Sin embargo, tras este episodio retornó a los valores basales y se mantuvo sin cambios significativos durante el resto del estudio.

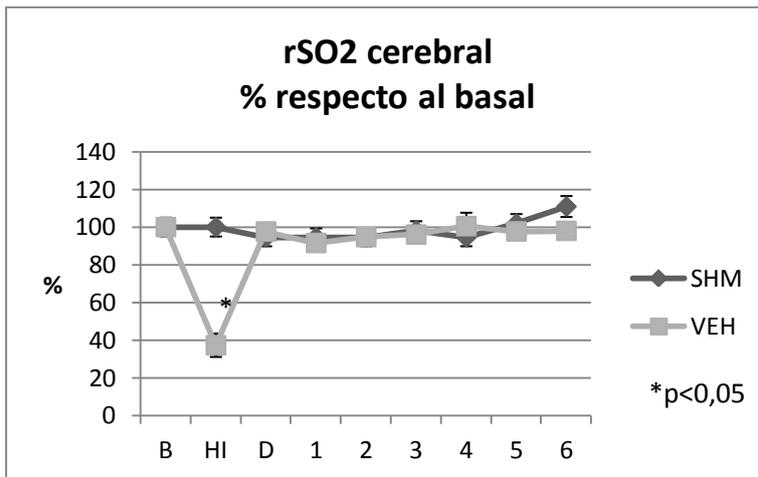


Figura 9. Porcentaje de cambio de la saturación regional de oxígeno cerebral (rSO₂) durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos vehículo (VEH) y control (SHM).

B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

2.1.2. Alteración de la histología cerebral:

La proporción de neuronas muertas (picnóticas), respecto a las viables observadas en las secciones de cerebro teñidas con Nissl fue 5 veces superior en VEH que en SHAM en la corteza frontoparietal, y más de 10 veces superior en hipocampo (figuras 10a, 10b y 10c).

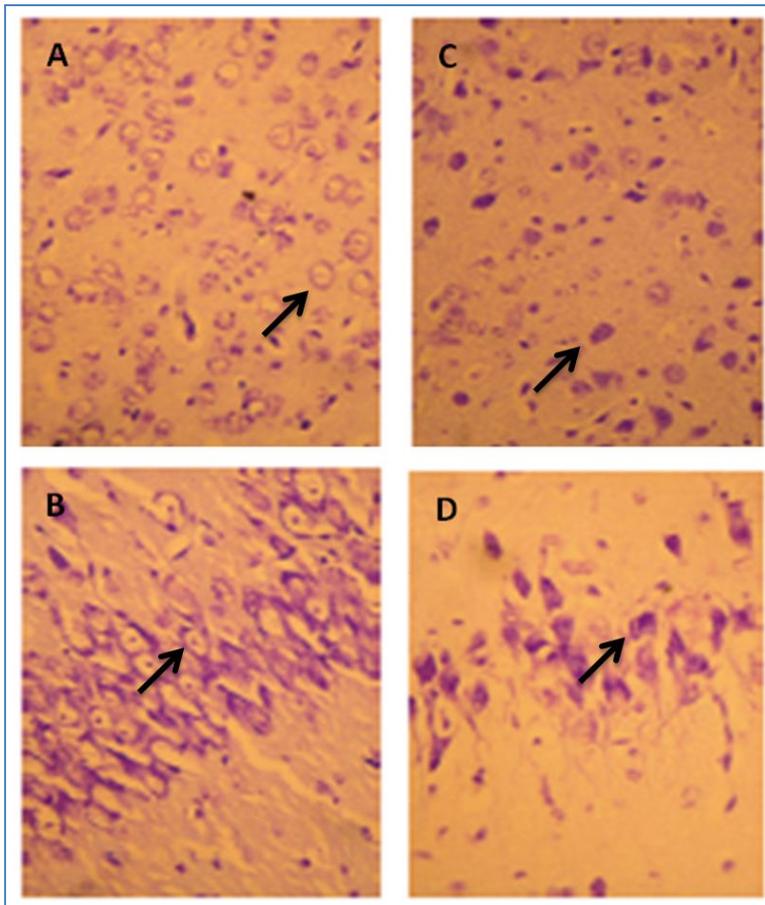
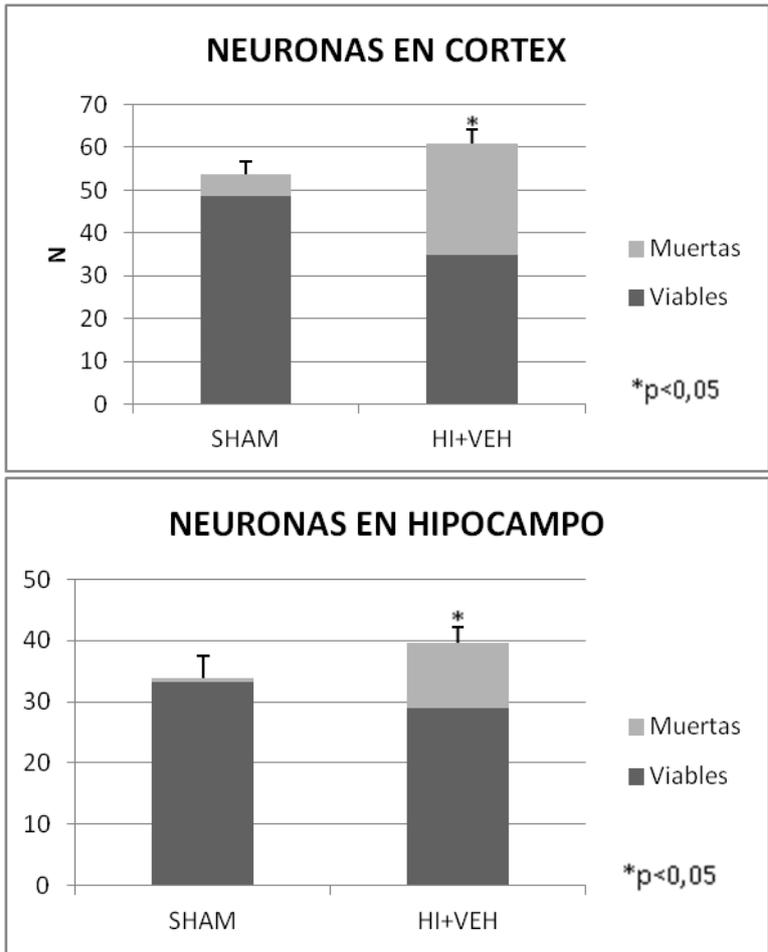


Figura 10a. Microfotografías de tejido cerebral con tinción de Nissl. A y B muestran respectivamente córtex cerebral e hipocampo de animal del grupo SHM con neuronas viables de aspecto normal (flechas). C y D muestran córtex cerebral e hipocampo de animal del grupo HI+VEH con neuronas picnóticas no viables (flechas).



Figuras 10b y 10c. Relación entre el número de neuronas muertas y viables con la tinción de Nissl, en córtex frontoparietal y en el área CA1 de hipocampo en los grupos VEH y SHAM, al final del experimento.

2.1.3. Expresión de citocinas proinflamatorias en tejido cerebral:

La concentración de IL-1, IL-6 y TNF- α fue significativamente más alta en tejido cerebral de los animales sometidos a hipoxia-isquemia y tratados con vehículo que en los controles ($p < 0,05$) (figuras 11 a 13).

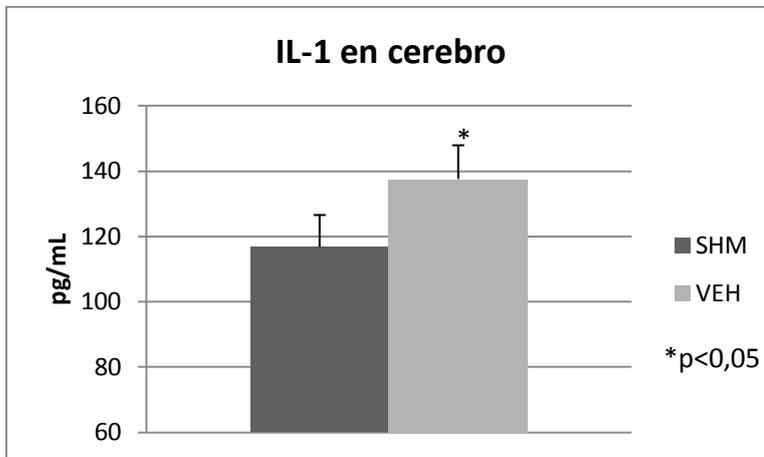


Figura 11. Concentración de IL-1 en cerebro en los grupos VEH y SHM.

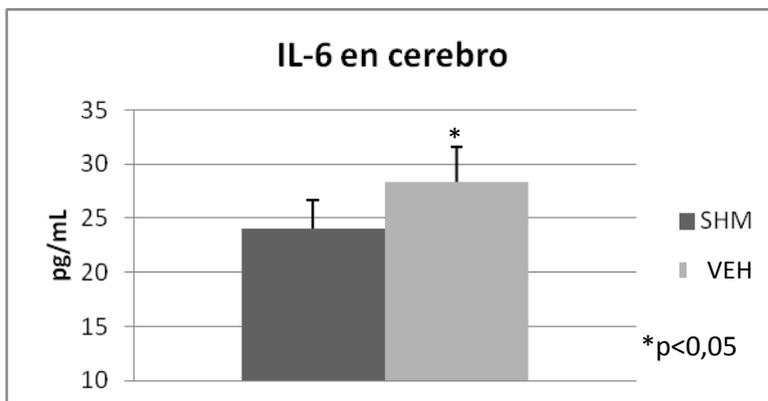


Figura 12. Concentración de IL-6 en cerebro en los grupos VEH y SHM.

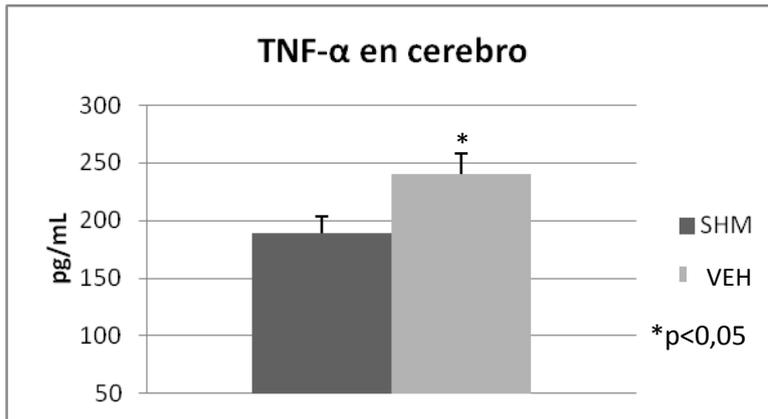


Figura 13. Concentración de TNF- α en cerebro en los grupos VEH y SHM.

2.2. Repercusión hemodinámica de la hipoxia-isquemia cerebral

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al gasto cardiaco o la frecuencia cardiaca entre los grupos VEH y SHM a lo largo del estudio (Tabla 2). Sin embargo, la tensión arterial media cayó significativamente durante el periodo de observación en el grupo VEH en comparación con el grupo control ($-21,1\% \pm 5,5\%$ frente a $16,4\% \pm 5,1\%$; $p < 0,05$) (Figura 14), pese a que recibieran fármacos vasoactivos (dopamina y/o dobutamina) en la mitad de los casos (4 de 8), frente a ningún caso en los SHM (0/6; $p < 0,05$).

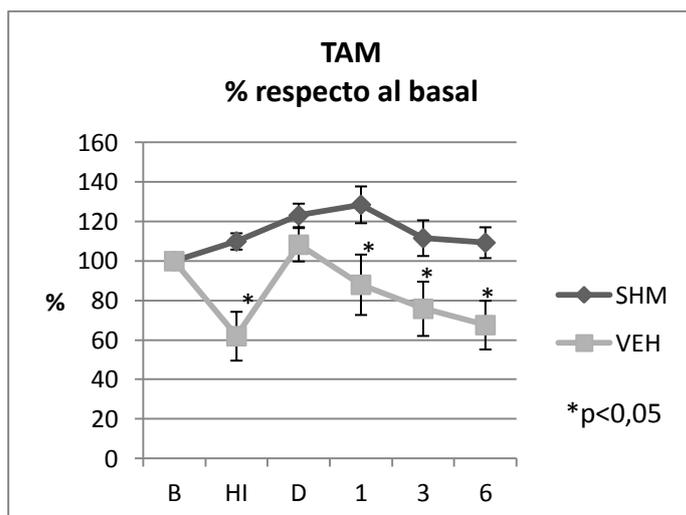


Figura 14. Porcentaje de cambio de la tensión arterial media durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos de hipoxia-isquemia + vehículo (VEH) y control (SHM).

B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

Tabla II. Variables hemodinámicas

Parámetro	Grupo	Basal	D	HI	1h	3h	6h
FC (lpm)	VEH	162,1±20,2	189,9±18,3	173,4±15	189,6±14,2	183,9±20,1	163,1±13,2
	SHM	150,8±11,9	167±16,1	174,2±18	166,6±16,1	166,2±15	174,8±13,4
GC (mL/Kg/min)	VEH	35,6±1,7	39,9±6,2	35,6±4,5	36,5±6,2	35,1±4,3	34,4±4,4
	SHM	34,8±1,9	35,5±2,7	34±2,9	35,4±2,7	32,9±3,5	35,0±4

Datos expresados como media ± desviación estándar. FC, frecuencia cardiaca; GC, gasto cardiaco; HI, hipoxia-isquemia; VEH, vehículo; SHM, sham. Todos p>0,05 frente a sham.

2.3. Daño pulmonar en la hipoxia-isquemia cerebral

2.3.1. Afectación de la distensibilidad pulmonar y el intercambio de gases; edema pulmonar

La distensibilidad dinámica (Cdin) permaneció estable a lo largo del estudio en SHM, mientras que cayó casi un tercio en VEH ($p < 0,05$) (Figura 15). Similarmente, el índice de oxigenación (IO) se mantuvo sin cambios significativos con respecto a la situación basal durante el periodo de observación en SHAM, mientras que aumentó progresivamente hasta casi un 50% en los animales sometidos a hipoxia-isquemia y tratados con vehículo ($p < 0,05$) (Figura 16).

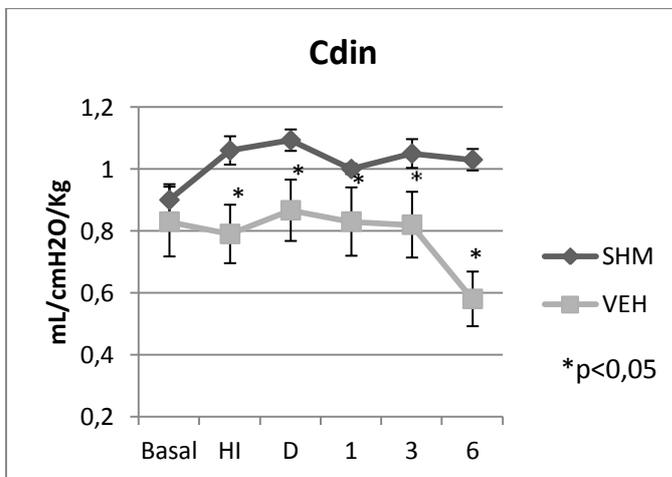


Figura 15. Distensibilidad dinámica (Cdin). Evolución de la Cdin en los grupos VEH y SHM a lo largo del periodo de observación.

HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

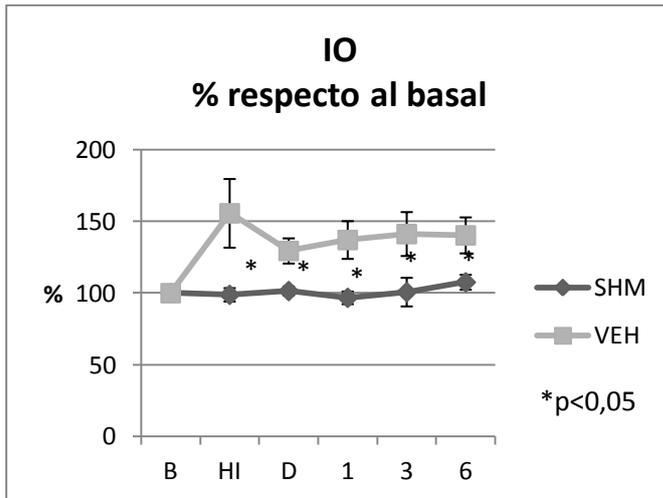


Figura 16. Índice de oxigenación (IO). Porcentaje de cambio del IO durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos de hipoxia-isquemia + vehículo (VEH) y control (SHM).

El agua extravascular pulmonar (EVLW) aumentó discretamente a lo largo del estudio en el grupo SHM; este aumento fue más del doble en VEH ($p<0,05$) (Figura 17).

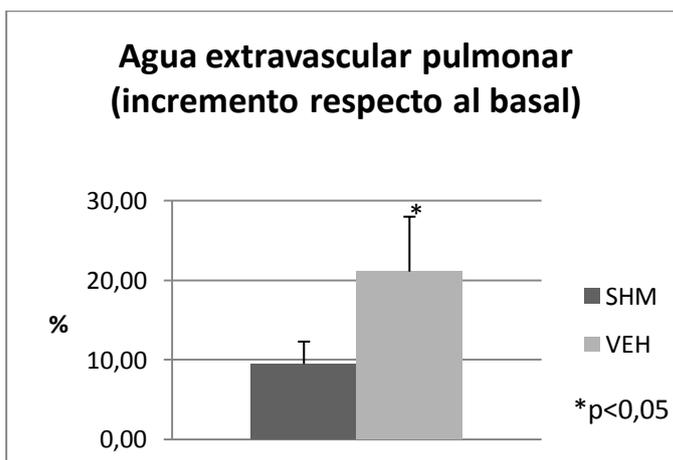


Figura 17. Agua extravascular pulmonar (EVLW). Incremento del EVLW durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos vehículo (VEH) y control (SHM).

2.3.2 Valoración del daño histológico pulmonar

Los animales del grupo VEH evidenciaron signos de daño pulmonar histológico leve-moderado (Figura 19). La puntuación media de severidad en VEH casi duplicó la de SHM ($p < 0,05$).

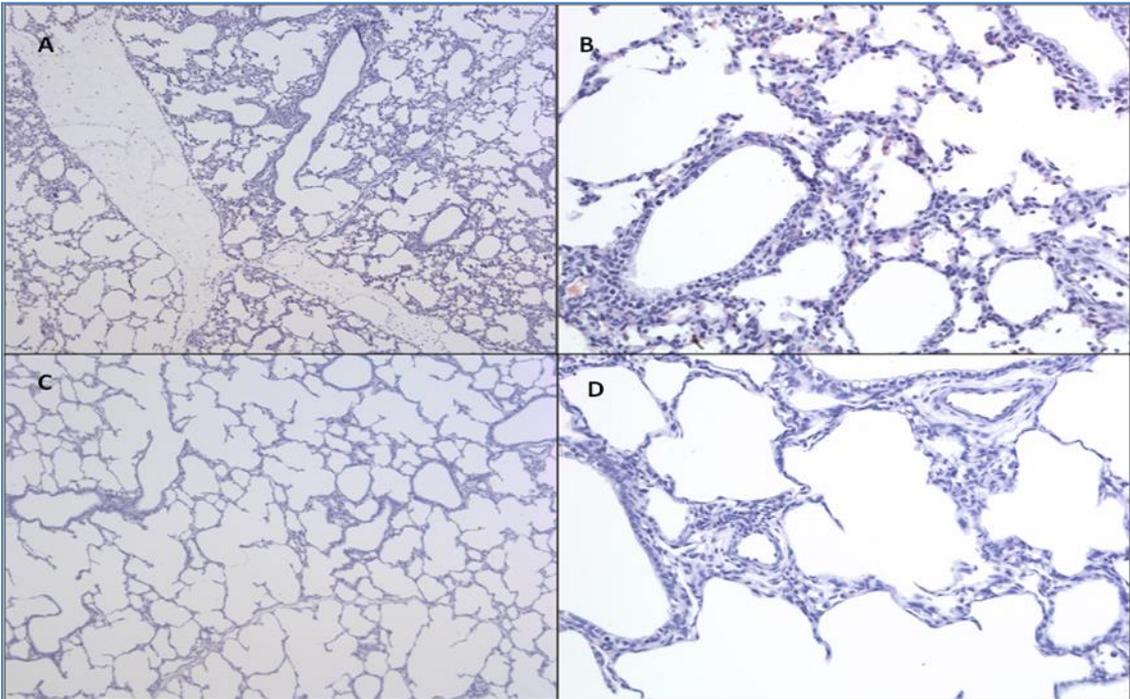


Figura 18. Histología pulmonar. (A y B) Animal del grupo VEH en el que se objetiva edema bronquial e infiltración celular intersticial. (C y D) Histología pulmonar normal en animal del grupo control.

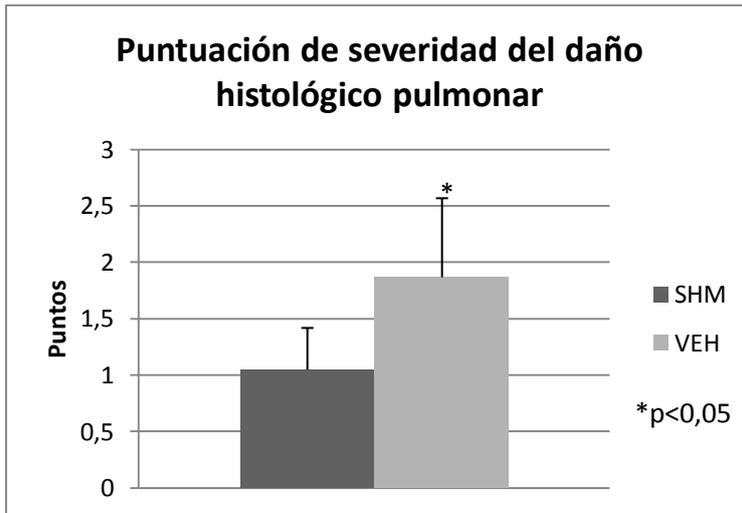


Figura 19. Puntuación de severidad del daño histológico pulmonar. Puntuación de severidad del daño histológico pulmonar en los grupos VEH y SHM al final del estudio.

2.3.3. Estudio de parámetros de inflamación pulmonar

2.3.3.1 Concentración de proteínas en lavado broncoalveolar

La concentración de proteínas en LBA durante el experimento aumentó 4 veces más en VEH que en SHM ($p < 0,05$) (Figura 20).

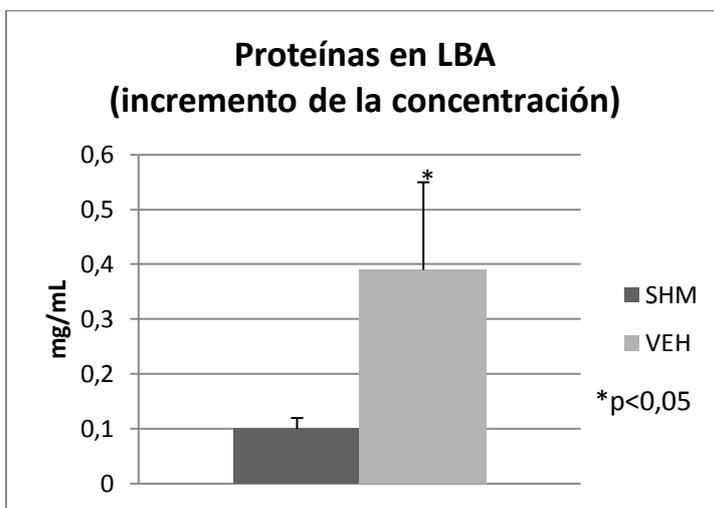


Figura 20. Variación de la concentración de proteínas medida en LBA, al inicio y al final del estudio, en los grupos VEH y SHM.

2.3.3.2. Expresión de citocinas proinflamatorias en tejido pulmonar

Se encontró un aumento significativo de la expresión tanto de IL-1 como de IL-6 en tejido pulmonar en el grupo VEH (Figuras 21 y 22) en comparación con los animales del grupo control ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de TNF- α en pulmón entre ambos grupos (Figura 23).

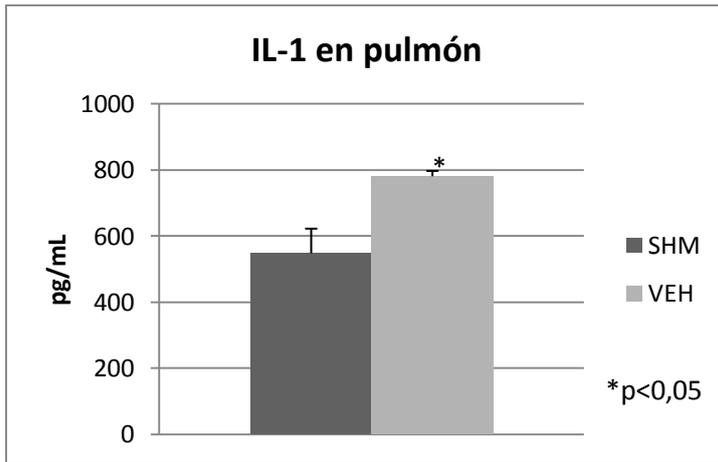


Figura 21. Concentración de IL-1 en pulmón en los grupos VEH y SHM.

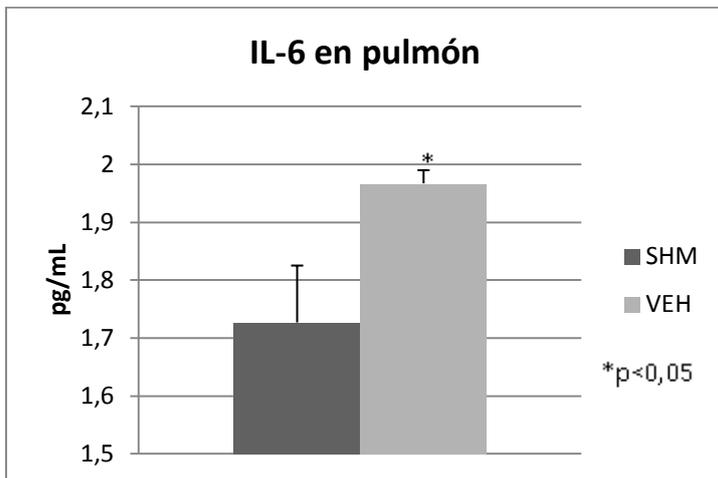


Figura 22. Concentración de IL-6 en pulmón en los grupos VEH y SHM.

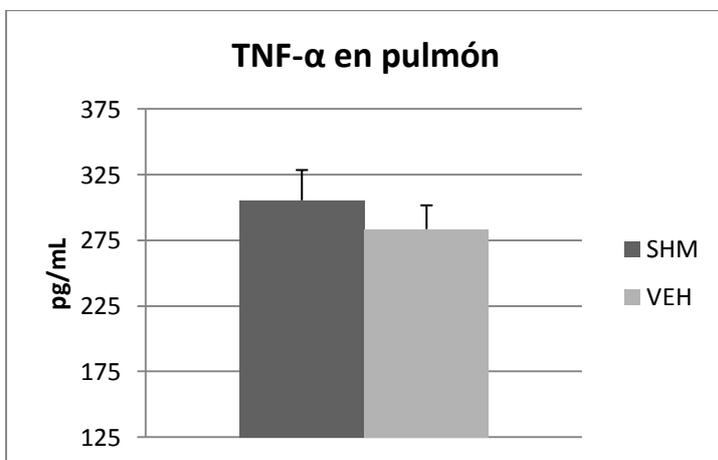


Figura 23. Concentración de TNF-α en pulmón en los grupos VEH y SHM.

2.3.3.3. Relación entre inflamación cerebral y pulmonar

Al comparar la expresión de citocinas proinflamatorias en tejidos pulmonar y cerebral, se encontró una correlación directa entre las concentraciones de IL-1 en cerebro y pulmón (figura 24).

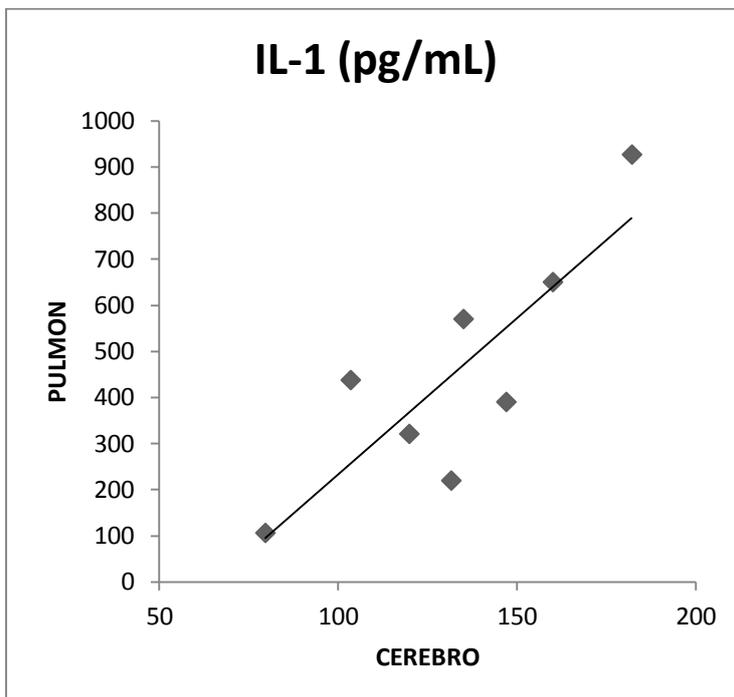


Figura 24. Correlación entre las concentraciones de IL-1 en pulmón y cerebro. ($y=6.77x+443,5$; $R^2=0,68$; $p<0,05$).

3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CANNABIDIOL SOBRE EL DAÑO PULMONAR TRAS HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL

3.1. EFECTO NEUROPROTECTOR DEL CANNABIDIOL

3.1.1. Efecto del cannabidiol sobre la alteración de la función y flujo cerebrales

A diferencia de los tratados con vehículo, los animales tratados con CBD experimentaron un aumento progresivo de la amplitud del aEEG tras la HI, acercándose a los valores observados en los SHM (Figura 25).

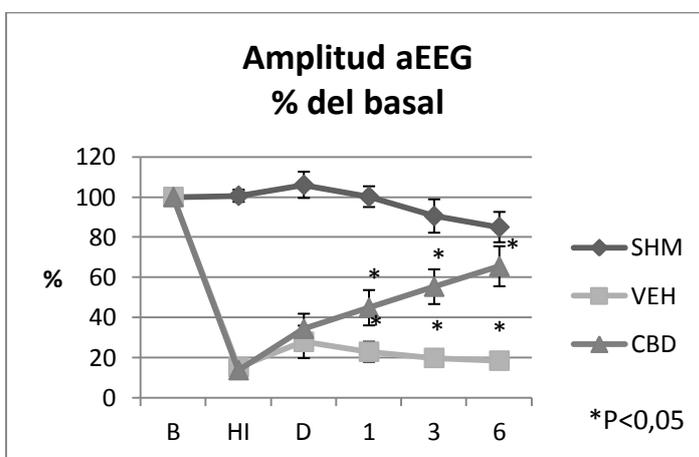


Figura 25. Porcentaje de cambio de la amplitud media del aEEG durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos control (SHM), hipoxia-isquemia + vehículo (VEH) e hipoxia-isquemia + CBD.

B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

No se encontraron diferencias significativas en la evolución de la rSO2 entre los grupos VEH y CBD durante el experimento (Figura 26).

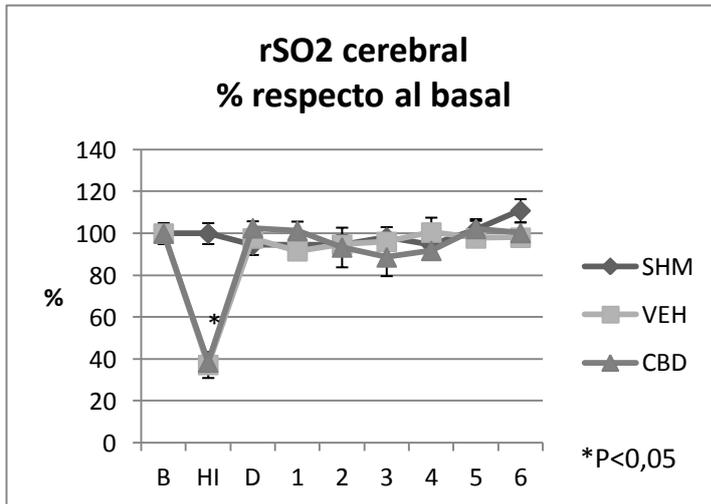


Figura 26. Porcentaje de cambio de la saturación regional de oxígeno cerebral (rSO2) durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos vehículo (VEH), cannabidiol (CBD) y control (SHM).

B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

3.1.2. Efecto del cannabidiol sobre la alteración de la histología cerebral

La administración de CBD redujo significativamente el daño cerebral tras la HI, de modo que la proporción de neuronas picnóticas, tanto corteza frontoparietal como en hipocampo, fue similar a la del grupo SHM, y de 3 a 10 veces menor que en VEH (Figuras 27a, 27b y 27c).

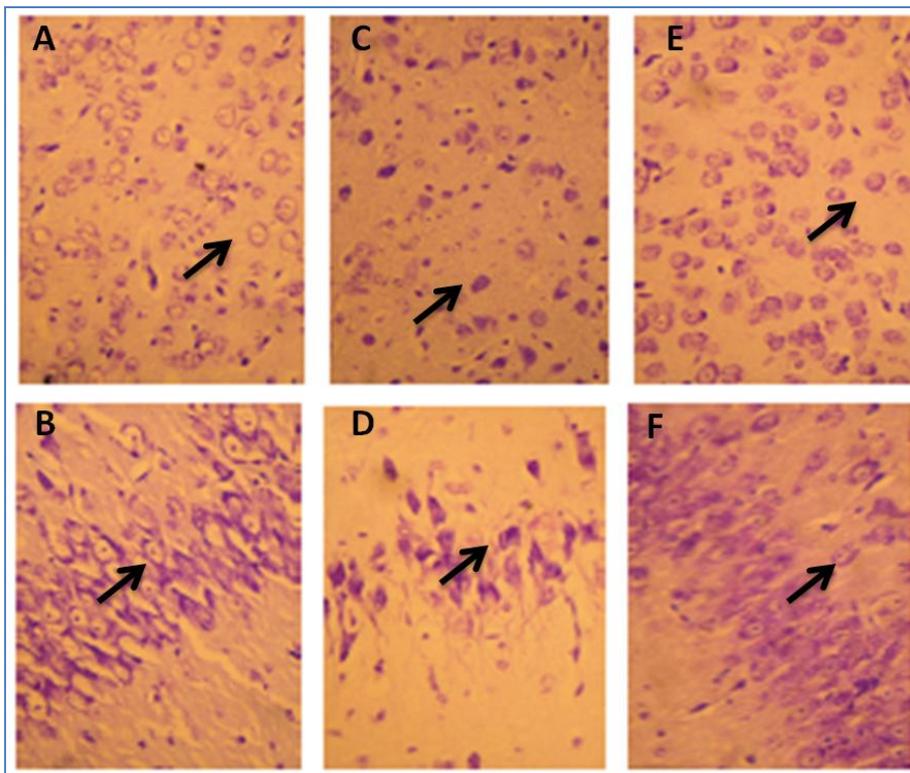


Figura 27a. Microfotografías de tejido cerebral con tinción de Nissl. A y B muestran respectivamente córtex cerebral e hipocampo de animal del grupo SHM con neuronas viables de aspecto normal (flechas). C y D muestran córtex cerebral e hipocampo de animal del grupo HI+VEH con neuronas picnóticas no viables (flechas). D y E muestran respectivamente córtex cerebral e hipocampo de animal del grupo CBD con neuronas viables de aspecto normal (flechas).

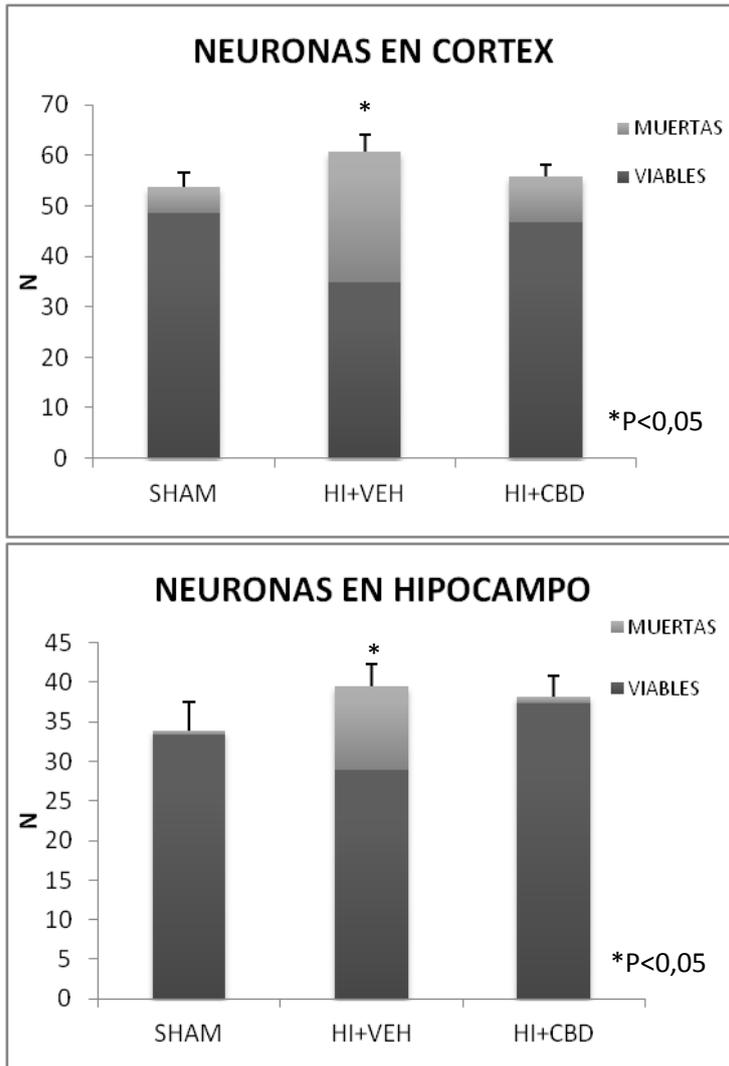


Figura 27b y 27c. Relación entre el número de neuronas muertas y viables con la tinción de Nissl, en córtex frontoparietal y en el área CA1 del hipocampo, en los grupos CBD, VEH y SHAM, al final del experimento.

3.1.3. Efecto del cannabidiol sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en tejido cerebral

La administración de CBD tras la HI previno el aumento de la concentración de IL-1 e IL-6 observado en tejido cerebral en VEH (Figuras 28 y 29). Este efecto, sin embargo, no fue visible en relación al TNF α (Figura 30).

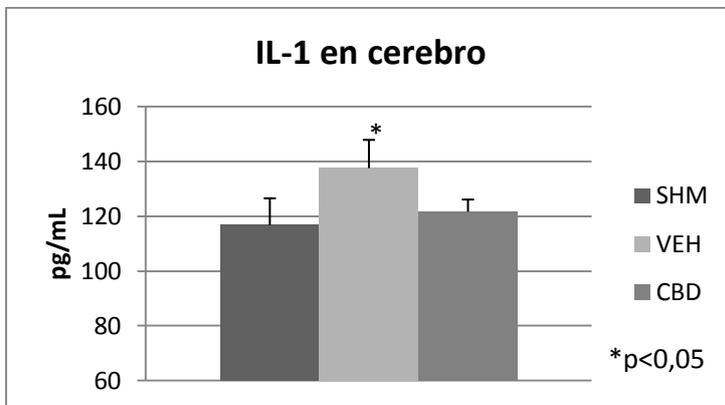


Figura 28. Concentración de IL-1 en cerebro en los grupos VEH, CBD y SHM.

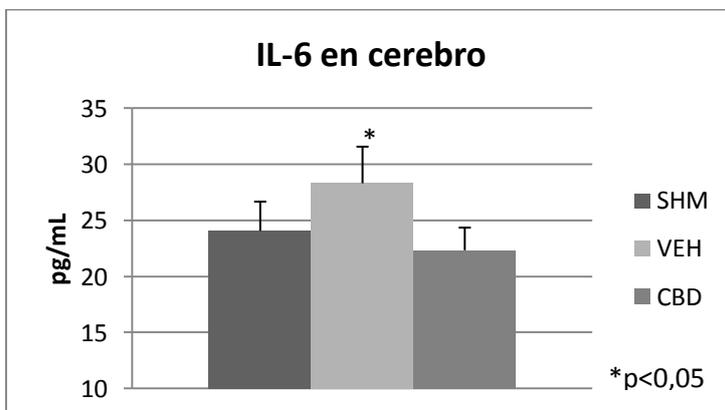


Figura 29. Concentración de IL-6 en cerebro en los grupos VEH, CBD y SHM.

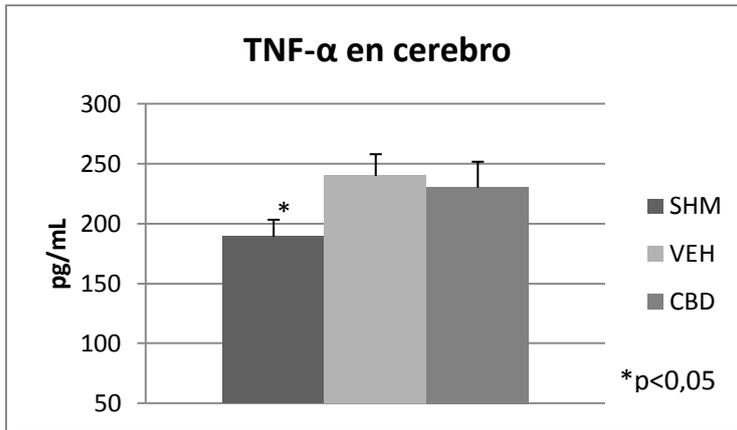


Figura 30. Concentración de TNF- α en cerebro en los grupos VEH, CBD y SHM.

3.2. Efecto del cannabidiol sobre la repercusión hemodinámica de la hipoxia-isquemia cerebral

Los animales tratados con CBD presentaron una mayor estabilidad hemodinámica, de modo que la caída de la tensión arterial media fue significativamente menor que en los tratados con vehículo (Figura 31). Ningún animal del grupo CBD recibió fármacos vasoactivos (dopamina y/o dobutamina) al contrario que el grupo VEH en el que fue necesario en la mitad de los casos (4 de 8) ($p < 0,05$).

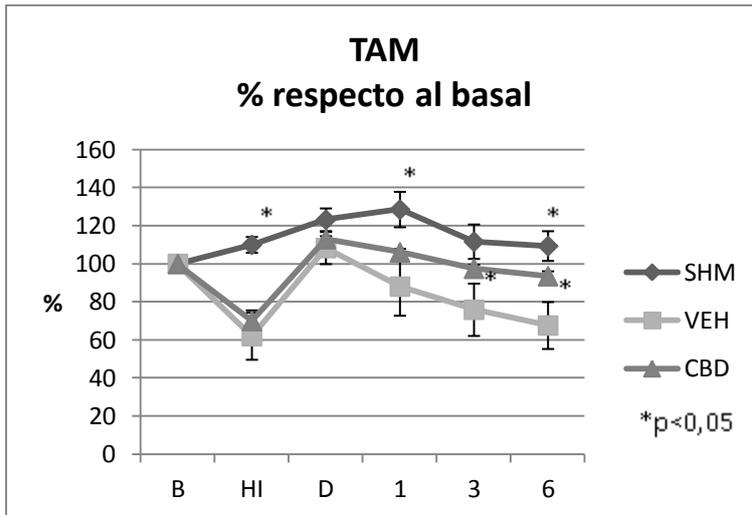


Figura 31. Porcentaje de cambio de la tensión arterial media (TAM) durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos de HI + vehículo (VEH), HI + cannabidiol (CBD) y control (SHM).

B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

3.3. Efecto del cannabidiol sobre el daño pulmonar en la hipoxia-isquemia cerebral

3.3.1. Efecto del cannabidiol sobre la afectación de la distensibilidad pulmonar y del intercambio de gases y el edema pulmonar

Tras la caída inicial de distensibilidad tras la HI, ésta se mantuvo estable en los animales tratados con CBD, en los que no se apreció la caída observada en VEH a las 6 horas de la HI ($p<0,05$) (Figura 32). Similarmente, el índice de oxigenación disminuyó progresivamente en los animales tratados con CBD tras la HI hasta valores similares a los SHM ($p<0,05$ respecto de VEH) (Figura 33).

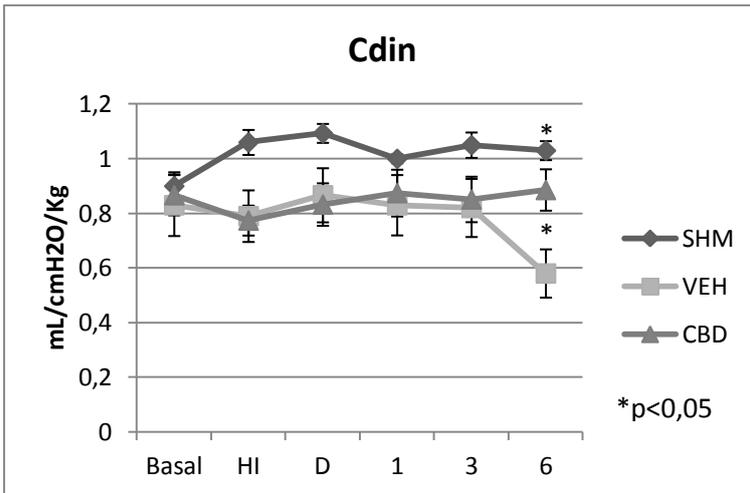


Figura 32. Distensibilidad dinámica (Cdin). Evolución de la Cdin en los grupos VEH, CBD y SHM a lo largo del periodo de observación.

HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

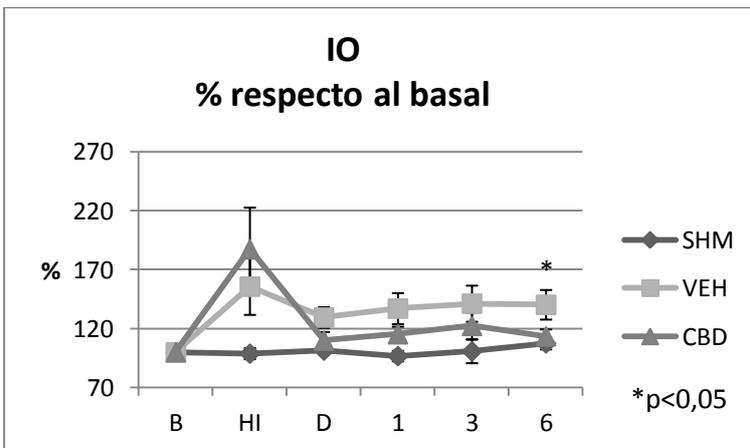


Figura 33. Índice de oxigenación (IO). Porcentaje de cambio del IO durante el periodo de estudio respecto a los valores basales en los grupos de hipoxia-isquemia + vehículo (VEH), hipoxia-isquemia + cannabidiol (CBD) y control (SHM).

B= basal; HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

Los animales tratados con CBD experimentaron una disminución progresiva del agua extravascular pulmonar, que llegó a ser inferior al basal al final del experimento, lo que no sólo resultó significativamente diferente de lo observado en VEH, sino también en SHM (Figura 34).

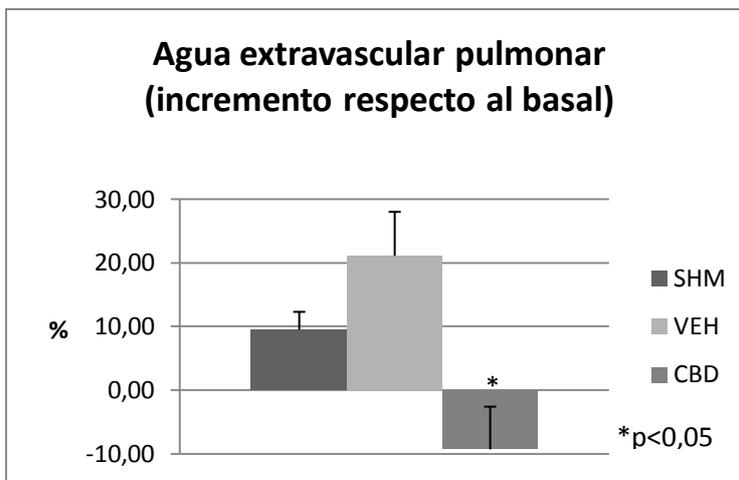


Figura 34. Agua extravascular pulmonar (EVLW). Incremento del EVLW respecto a los valores basales durante el periodo de estudio en los grupos vehículo (VEH), cannabidiol (CBD) y control (SHM).

HI= hipoxia-isquemia; D= administración de droga

3.3.2. Efecto del cannabidiol sobre el daño histológico pulmonar

El tratamiento con CBD redujo la lesión histológica pulmonar observada en los VEH, de modo que la puntuación de daño histológico pulmonar fue similar en CBD y SHM (Figuras 35a y 35b).

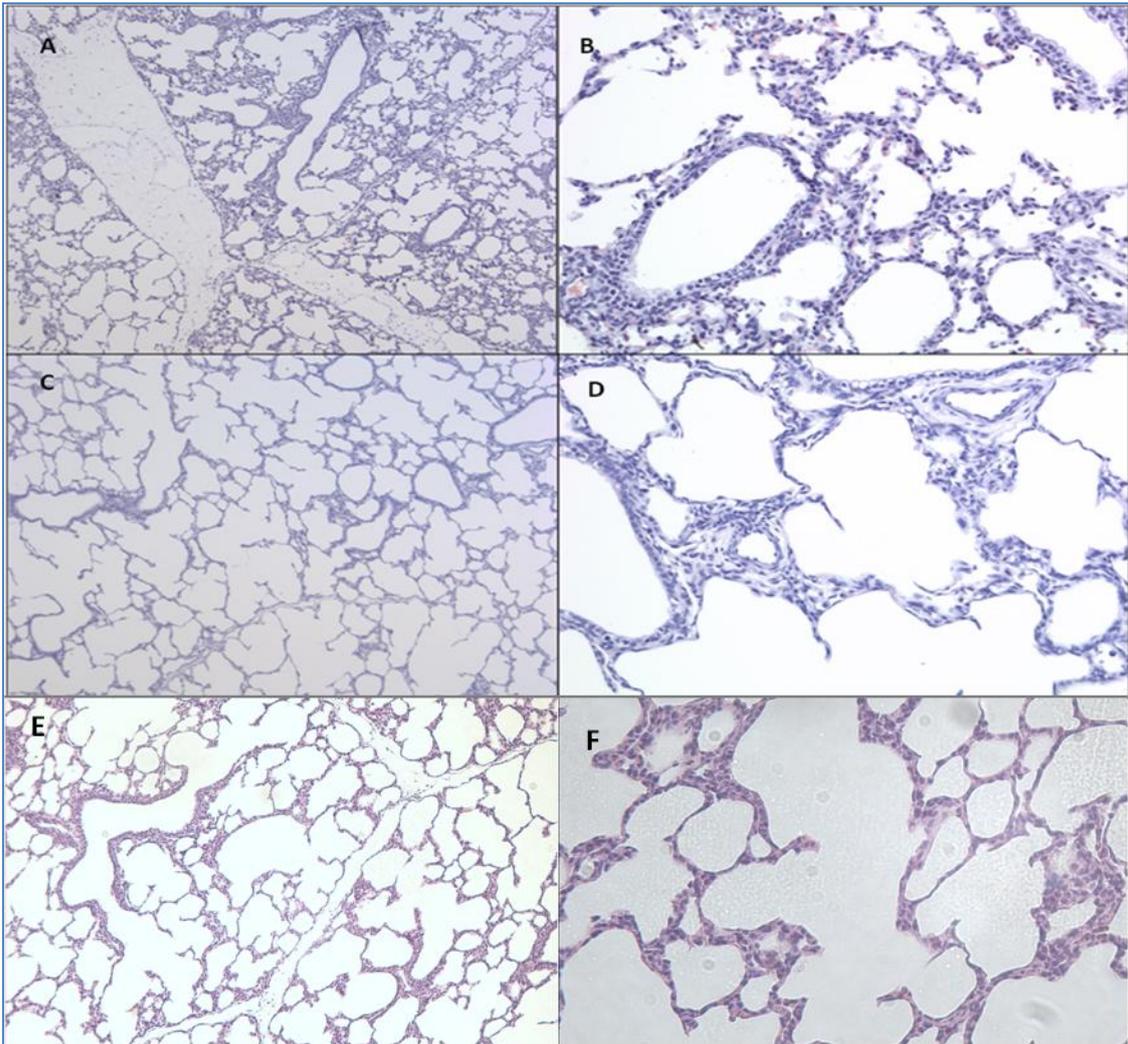


Figura 35a. Histología pulmonar. (A y B) Animal del grupo VEH en el que se objetiva edema bronquial e infiltración celular intersticial (10x y 20x aumentos respectivamente). (C y D) Histología pulmonar normal en animal del grupo control (10x y 20x aumentos respectivamente). (E y F) Histología pulmonar normal en animal del grupo CBD (10x y 20x aumentos respectivamente).

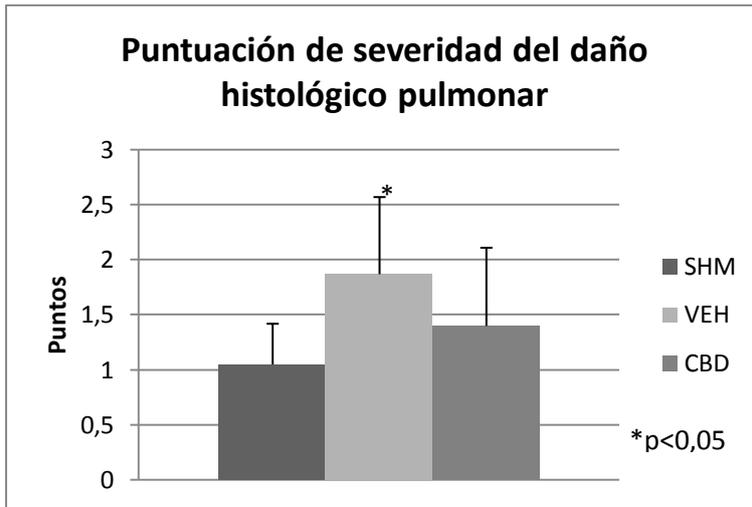


Figura 35b. Puntuación de severidad del daño histológico pulmonar. Puntuación de severidad del daño histológico pulmonar en los grupos VEH, CBD y SHM al final del estudio.

3.3.3. Efectos del cannabidiol sobre los parámetros de inflamación pulmonar

3.3.3.1. *Efectos del cannabidiol sobre la variación de concentración de proteínas en lavado broncoalveolar*

El tratamiento con CBD previno el incremento en la concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar observado en VEH al final del experimento respecto a la concentración ($p<0,05$) (Figura 36).

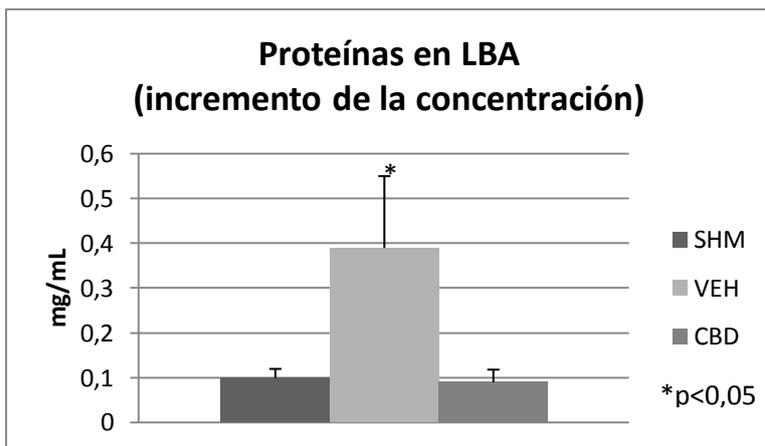


Figura 36. Variación de la concentración de proteínas medida en LBA, al inicio y al final del estudio, en los grupos VEH, CBD y SHM.

3.3.3.2. *Efectos del cannabidiol sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en tejido pulmonar*

El tratamiento con CBD previno el aumento de concentración de IL-1 observado en tejido pulmonar en VEH (Figura 37). En relación con IL-6, el efecto protector de CBD fue tan intenso que la concentración pulmonar de esta citoquina fue incluso menor que en SHM (Figura 38). Sin embargo, y al igual que en cerebro, el CBD no modificó la concentración de TNF- α en pulmón (Figura 39).

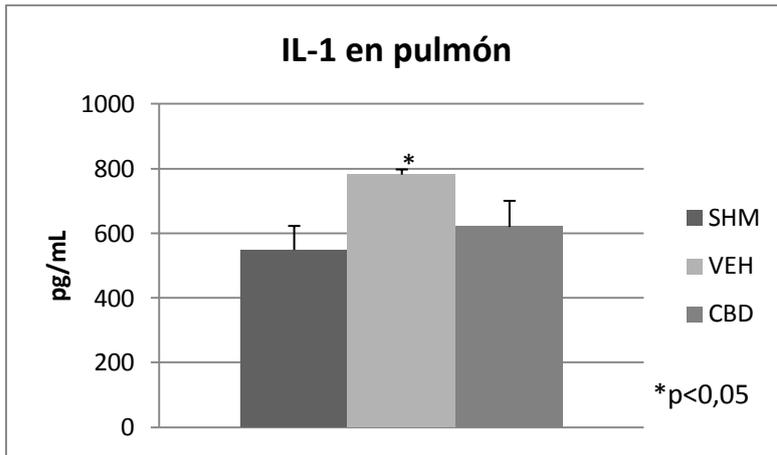


Figura 37. Concentración de IL-1 en pulmón en los grupos VEH, CBD y SHM.

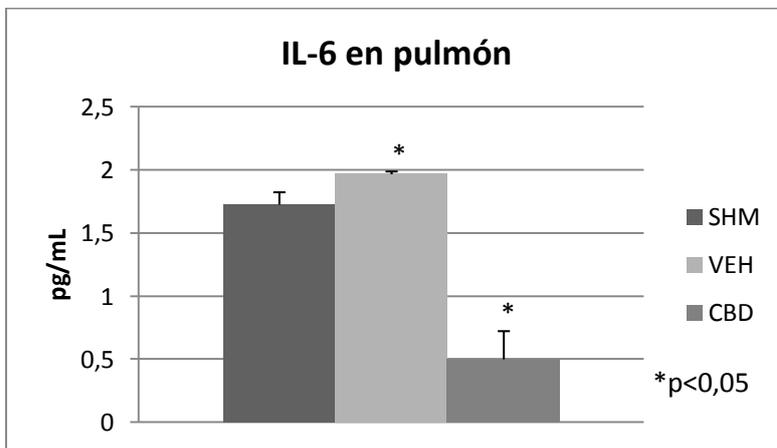


Figura 38. Concentración de IL-6 en pulmón en los grupos VEH, CBD y SHM.

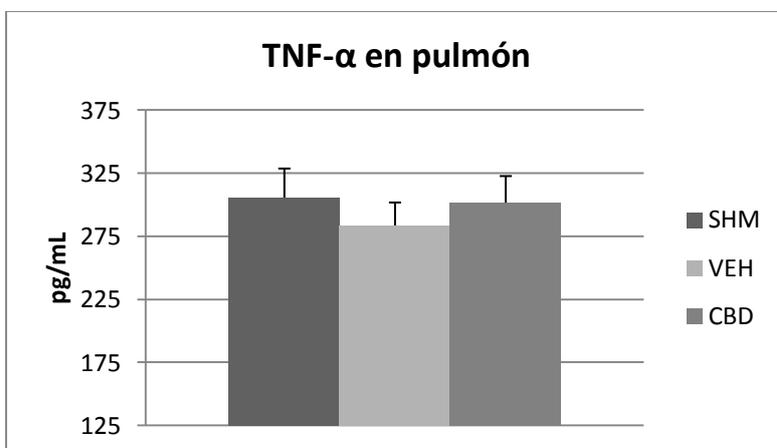


Figura 39. Concentración de TNF-α en pulmón en los grupos VEH, CBD y SHM.

VII. DISCUSION

1. LA HIPOXIA-ISQUEMIA PRODUCE DAÑO PULMONAR DE ORIGEN INFLAMATORIO

1.1. Daño cerebral

Como se esperaba y de la misma forma que en estudios previos (*Alvarez FJ et al. 2008, Kurth CD et al. 2009, Lafuente H et al. 2011*), la exposición de los animales a HI durante 30 minutos produjo daño cerebral severo, tanto desde el punto de vista neurofisiológico, con afectación importante de la actividad eléctrica (aEEG) y de la oxigenación cerebral (NIRS), como desde el punto de vista histológico. Al igual que en otros trabajos, en el presente estudio se produjo una disminución severa de la amplitud del aEEG que no se recuperó en las 6 horas de observación tras la HI en los animales que recibieron vehículo frente a los controles (*Alvarez FJ et al. 2008, Lafuente H et al. 2011*). Sin embargo, la rSO₂, tras una caída inicial durante la HI, se recuperó hasta valores basales. Este hallazgo es similar al encontrado por otros grupos (*Alvarez FJ et al. 2008, Kurth CD et al. 2009, Lafuente H et al. 2011*), e indica el restablecimiento del flujo cerebral y por tanto del aporte de oxígeno al cerebro. De hecho, Kurth et al (2009) encuentran un incremento de la rSO₂ por encima de los valores basales durante la fase de reperfusión que traduce el desbalance entre aporte de O₂ y actividad metabólica cerebral. Lafuente et al (2011) observan una caída progresiva de la extracción fraccional tisular de oxígeno (FTOE, Fractional Tissue Oxygen Extraction) medida por NIRS a lo largo de las 6 horas siguientes a la HI, mientras que en el

presente trabajo, tras la recuperación de la HI no se encontraron cambios significativos en la oxigenación cerebral respecto a los niveles basales en ninguno de los grupos a lo largo del periodo de 6 horas de observación. Estudios en recién nacidos con EHI relacionan las alteraciones de la oxigenación cerebral, tanto FTOE como rSO₂ con el fallo energético secundario, mientras que el aEEG se correlaciona estrechamente con el pronóstico (*Toet MC et al. 2006*). Desde un punto de vista histológico, en el presente estudio, los animales sometidos a HI cerebral presentaron un menor número de neuronas viables y un incremento de células muertas tanto en corteza frontoparietal como en hipocampo, en comparación con los controles. Estas áreas son especialmente vulnerables a la lesión HI en recién nacido, y particularmente la región del hipocampo (*Volpe JJ. 2001*). De la misma manera, Lafuente et al (2011), observaron 6 horas tras el insulto HI en lechones, una pérdida de neuronas viables y un mayor número de neuronas muertas, hallazgo que resultó más evidente a las 72 horas. La apoptosis es un fenómeno característico del daño cerebral por HI en el cerebro inmaduro que aparece poco después de la agresión y que coexiste con la necrosis (*Alvarez-Díaz A et al. 2007*). La necrosis neuronal selectiva es la variedad de lesión más frecuente en la EHI neonatal y se demuestra de forma precoz, entre 5 y 30 minutos tras el inicio de la HI, por la aparición de vacuolización citoplasmática (*Brown AW y Brierley JB. 1973, Levy DE et al. 1975*). Son hallazgos más tardíos la pérdida del retículo endoplásmico o la condensación y fragmentación del núcleo, que pueden aparecer en el humano a las 24-36 horas del insulto (*Volpe JJ. 2001*).

En el presente estudio, la HI cerebral indujo una respuesta inflamatoria local con aumento de la concentración de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α , así

como daño histológico. En efecto, la agresión sobre el cerebro, ya sea de origen hipóxico-isquémico, hemorrágico, o traumático, provoca una respuesta inflamatoria con activación de la microglia, liberación de aminoácidos excitatorios, ROS, óxido nítrico, proteasas y citokinas proinflamatorias (*Allan SM y Rothwell NJ. 2001, Volpe JJ. 2001, Martínez-Orgado J et al. 2007, A Castillo et al. 2010*). Entre estas últimas, la IL-1 β juega un papel importante en la activación de moléculas de adhesión como ICAM-1, y TNF- α presenta un efecto citotóxico directo. La acumulación de neutrófilos favorece, a su vez, la liberación local de ROS y citokinas. (*Allan SM y Rothwell NJ. 2001, Volpe JJ. 2001*).

1.2. Afectación hemodinámica

La HI cerebral se acompañó de afectación hemodinámica evidenciada por una caída de la tensión arterial media a lo largo del periodo de observación de 6 horas. De hecho, la mitad de los animales del grupo VEH precisaron soporte inotrópico mientras que este tratamiento no fue necesario en ninguno de los controles. Por el contrario, no se encontraron diferencias en cuanto al gasto cardiaco o la frecuencia cardiaca entre los grupos. De igual modo, estudios experimentales previos demuestran que la HI cerebral induce hipotensión arterial y daño miocárdico evidenciado por un incremento de la concentración plasmática de troponina cardiaca T, este último hallazgo atribuido a lesión cardiaca por isquemia-reperfusión (*Alvarez FJ et al. 2008*). Es conocido el hecho de que la afectación hemodinámica es una de las manifestaciones de la repercusión extracerebral de la EHI y diversos estudios clínicos encuentran una frecuencia variable

de aparición de hipotensión arterial en recién nacidos en esta situación (*Perlman JM et al. 1989, Shankaran S et al. 1991, Martin-Ancel A et al. 1995, Shah P et al. 2004*). La inestabilidad hemodinámica, al igual que el resto de las complicaciones extracerebrales de la EHI, se atribuye a un mecanismo compensatorio de redistribución del flujo sanguíneo (*Peeters LL et al. 1979, Sheldon RE et al. 1979, Bocking AD et al. 1988*) y, como se ha dicho en otros lugares del texto, no se han investigado mecanismos alternativos para explicar su aparición. Aunque no es el objetivo de este trabajo, cabe especular que el desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica tras el daño cerebral podría provocar alteración hemodinámica, ya sea por disfunción endotelial o por lesión miocárdica (*Wort SJ y Evans TW. 1999, Alvarez FJ et al. 2008, Kitamura Y et al. 2010*).

1.3. Daño pulmonar

La agresión hipóxico-isquémica sobre el cerebro dio lugar a un daño histológico pulmonar, que se tradujo clínicamente en una alteración de la mecánica respiratoria, evidenciada por una caída en la distensibilidad pulmonar, así como por una alteración en el intercambio de gases con un aumento del índice de oxigenación. No hay evidencias de trabajos previos que describan un estudio histológico pulmonar en modelos animales de HI cerebral. A pesar de que la severidad del daño histológico fue mayor en los animales sometidos a HI en comparación con los controles, el grado de lesión fue, en conjunto, leve-moderado. Esto puede explicarse por la corta duración del periodo de observación, que fue de tan solo 6 horas. No existen precedentes de

estudios que relacionen fisiopatológicamente el daño cerebral HI neonatal con daño pulmonar, más allá de la consabida redistribución del flujo sanguíneo. Alvarez et al (2008) encontraron una caída de la distensibilidad y un aumento del índice de oxigenación en lechones sometidos a HI cerebral, aunque estos hallazgos fueron atribuidos a daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica y éste no era el objetivo principal del estudio. El presente trabajo, sin embargo, demuestra que la afectación histológica, del intercambio de gases y de la mecánica pulmonar, no pueden ser atribuidos exclusivamente a la ventilación mecánica, ya que todos los grupos de estudio fueron sometidos al mismo protocolo de soporte ventilatorio. En modelos animales adultos de daño cerebral de distinta etiología, como hemorragia cerebral o daño cerebral traumático (*Le Tulzo. 1997, Wu S et al. 2006, Kalsotra A et al. 2007*), sí se ha establecido esta relación y se comentará a continuación.

1.4. La lesión pulmonar tras la hipoxia-isquemia es de origen inflamatorio

Se observó un incremento significativo de la concentración de proteínas totales en el lavado broncoalveolar en los animales sometidos a HI. La concentración de proteínas totales en lavado broncoalveolar es un indicador directo de la integridad del epitelio alveolar y de la permeabilidad vascular (*Kalsotra A et al. 2007, Dodd JM et al. 2009*). Este incremento de la permeabilidad vascular puede producirse como consecuencia de la lesión vascular o debido a la respuesta inflamatoria mediada por células (*Martin TR et al. 1989*). En este sentido, en el presente estudio también se objetivó un aumento del EVLW en el grupo HI en comparación con los controles. La medición de

EVLW se correlaciona con el grado de edema pulmonar, siendo una medida más sensible que la radiografía de tórax o el índice de oxigenación (*Baudendistel L et al. 1882, Halperin BD et al. 1985*). De hecho, en pacientes politraumatizados el incremento de EVLW es un indicador de extravasación de albúmina que se altera precozmente cuando otros parámetros, como la oxigenación, no muestran signos de deterioro respiratorio (*Sturm JA et al. 1986*). Por otro lado, el aumento de EVLW se correlaciona con una disminución de la supervivencia en el paciente adulto crítico (*Sakka SG et al. 2002*). Los animales en el grupo HI mostraron concentraciones significativamente más altas de IL-1 e IL-6 en pulmón, dato que apoya el origen inflamatorio de la lesión. De la misma manera, el daño cerebral traumático provoca un aumento de la expresión de IL-1 e IL-6 en pulmón (*Kalostra A et al. 2007*). En el presente estudio no se encontró un aumento de la concentración de TNF- α en pulmón, a pesar de que sus niveles estaban elevados de forma significativa en cerebro. Este hallazgo es similar al encontrado por otros autores (*Wu S et al. 2006*) que especulan que puede ser debido, bien a que esta citokina quizá no juega un papel significativo en el desarrollo de esta lesión pulmonar, o bien a que su elevación podría ser más tardía, pasadas 24 horas de la lesión. Otros mediadores inflamatorios como COX-2, LTB4 o ICAM-1, se encuentran elevados en tejido pulmonar tras lesión cerebral (*Wu S et al. 2006, Kalostra A et al. 2007*).

Como ya se ha mencionado, es conocido el hecho de que la EHI neonatal se acompaña en un alto porcentaje de casos de lesión tisular a distancia (*Perlman JM et al. 1989, Shankaran S et al. 1991, Martin-Ancel A et al. 1995, Shah P et al. 2004*). Si bien, el desarrollo de esta complicación se ha relacionado con un fenómeno de redistribución

del flujo sanguíneo (diving reflex) a órganos como el cerebro, miocardio o suprarrenales (*Peeters LL et al. 1979, Sheldon RE et al. 1979, Bocking AD et al. 1988*), estudios en modelos animales de lesión cerebral sugieren que la respuesta inflamatoria antes referida no se limita solo al cerebro sino que por el contrario se extiende a otros órganos (*Wu S et al. 2006, Kalsotra A et al. 2007*). De hecho, se ha demostrado que el daño cerebral severo estimula la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- α , interleukinas e ICAM-1, a la circulación sistémica (*Donnelly SC et al. 1996, Gong C et al. 2000*). Se ha visto que determinadas agresiones sobre el cerebro, se acompañan de un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo cual apoyaría la hipótesis de que la liberación sistémica de mediadores inflamatorios tras el daño cerebral conduce al desarrollo de daño tisular a distancia (*Fisher AJ et al. 1999, Lampl Y et al. 2005, Kalsotra A et al. 2007*).

Hasta este trabajo no se había investigado la relación entre la lesión cerebral por hipoxia-isquemia y la lesión pulmonar a distancia. Sin embargo, sí que se ha estudiado el efecto de la isquemia-reperfusión en otros órganos sobre el desarrollo de daño pulmonar. La lesión renal aguda por isquemia-reperfusión, por ejemplo, produce lesión histológica pulmonar, alteración en la expresión de citocinas en pulmón y aumento de la permeabilidad vascular pulmonar (*Kramer AA et al. 1999, Hoke TS et al. 2007*). De la misma manera, varios estudios demuestran una relación entre isquemia-reperfusión intestinal y daño pulmonar (*Schmeling DJ et al. 1989, Kadesky KM et al. 1995*).

1.5. Relación entre inflamación cerebral y pulmonar

En este estudio se objetivó una correlación positiva entre las concentraciones de IL-1 en cerebro y pulmón. En consonancia, se ha descrito en ratas expuestas a un daño cerebral hemorrágico que también se produce un incremento transitorio de los niveles de IL-1 β en pulmón, que coinciden con un aumento significativo de esta citokina en cerebro (*Wu S et al. 2006*). Esto apoyaría la hipótesis de que el incremento de citokinas en cerebro originadas durante la respuesta inflamatoria secundaria a la hipoxia-isquemia, serían liberadas a la circulación sistémica induciendo, en último término, daño pulmonar.

2. EL TRATAMIENTO CON CANNABIDIOL REDUCE EL DAÑO PULMONAR TRAS HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL

2.1. El tratamiento con cannabidiol mejora el daño cerebral de origen inflamatorio secundario a hipoxia-isquemia

En el presente estudio, la administración de CBD tras la agresión hipóxico-isquémica se acompañó de una mejoría progresiva de la amplitud del aEEG, de un descenso de la concentración de IL-1, IL-6 y TNF- α en cerebro y de una disminución de la muerte neuronal en la histología. De la misma forma, trabajos previos en lechones sometidos a HI cerebral, demuestran una mejoría progresiva del aEEG y una disminución del daño histológico cerebral con la administración de CBD (*Alvarez FJ et al. 2008, Lafuente H et*

al. 2011). El efecto neuroprotector del CBD tras el daño cerebral por hipoxia-isquemia se ha relacionado con su acción antiinflamatoria y antioxidante (*Martínez-Orgado J et al. 2007, Alvarez FJ et al. 2008, Castillo A et al 2010, Lafuente H et al. 2011*). Así, la administración de CBD tras el daño cerebral por HI disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión de COX-2 e iNOS, mejora la actividad metabólica cerebral, disminuye la alteración hemodinámica, así como el desarrollo de edema y la aparición de convulsiones (*Alvarez FJ et al. 2008, Castillo A et al 2010*). Estos efectos parecen mediados a través del receptor CB2 y por la activación de receptores de adenosina en el animal inmaduro (*Castillo A et al 2010*).

2.2. El tratamiento con cannabidiol mejora la situación hemodinámica tras la hipoxia-isquemia cerebral

Los animales tratados con CBD experimentaron una menor caída de la tensión arterial media a lo largo del periodo de observación que los que recibieron vehículo. Además, ninguno de los animales que recibieron CBD precisó soporte inotrópico. Estudios previos demuestran un beneficio del uso de CBD sobre la situación hemodinámica en lechones sometidos a HI cerebral, así como en modelos animales de isquemia miocárdica (*Durst R et al. 2007, Alvarez FJ et al. 2008*). Este efecto se ha atribuido a la activación de receptores de adenosina (*Durst R et al. 2007*). Por otro lado, varios trabajos demuestran un efecto protector miocárdico y de preservación de la función endotelial coronaria de los endocannabinoides que parece mediado a través de receptores CB1 y CB2 (*Krylatov AV et al. 2001, Ugdyzhekova DS et al. 2001*). Aunque

se considera que CBD tiene muy baja afinidad por receptores CB1 y CB2, estudios en modelos animales inmaduros demuestran que los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de CBD están en parte mediados por CB2 (*Castillo A et al. 2010*). Por tanto, los efectos hemodinámicos observados en el presente estudio tras la administración de CBD podrían estar relacionados tanto con receptores de adenosina como CB2. Sin embargo, al no ser éste un objetivo del estudio, esto pertenece al terreno de la especulación.

2.3. El tratamiento con cannabidiol mejora el daño pulmonar secundario a la hipoxia-isquemia cerebral

La administración de CBD tras la HI cerebral produjo un incremento significativo de la distensibilidad pulmonar dinámica y un mejor intercambio de gases, con una disminución del índice de oxigenación tras la administración de la droga hasta alcanzar valores similares a los de los controles. Así mismo, el daño histológico fue inferior en los animales tratados con CBD en comparación con los que recibieron vehículo. El único antecedente en la literatura del beneficio de los cannabinoides en el daño pulmonar a distancia proviene de un estudio realizado en lechones sometidos a hipoxia-isquemia cerebral (*Alvarez FJ et al. 2008*). En ese trabajo, se evidenció una mejoría de la mecánica pulmonar y del intercambio de gases tras la administración de CBD, sugiriendo la hipótesis de que esto podría deberse al efecto antiinflamatorio de esta droga, aunque al no ser el objetivo del estudio esta posibilidad no pudo ser confirmada. Además, la aparición de afectación respiratoria en este modelo de HI

cerebral fue atribuida a daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. Curiosamente, un trabajo previo con perros adultos ventilados mecánicamente describió que el CBD a 1 mg/kg IV reducía la distensibilidad pulmonar (Pertwee RG, 2004); las diferencias en especie animal, grado de maduración y método de ventilación, sin embargo, impiden la comparación de estos resultados con los nuestros.

2.4. El tratamiento con cannabidiol disminuye la inflamación pulmonar secundaria a hipoxia-isquemia cerebral

La administración de CBD se acompañó de una disminución de los parámetros inflamatorios antes referidos. Observamos un descenso de la concentración de proteínas en LBA y del EVLW, lo cual sugiere una disminución de la permeabilidad vascular, así como una disminución de la expresión de IL-1 e IL-6 en pulmón y una disminución del daño histológico. No hay estudios en la literatura que valoren el efecto antiinflamatorio del CBD en pulmón. Las citocinas proinflamatorias inducen la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 por parte de las células endoteliales favoreciendo la adhesión y extravasación de leucocitos (*Kataoka H et al. 2004*). Rajesh et al demostraron que la estimulación del receptor CB2 atenúa la activación de las células endoteliales humanas mediada por TNF- α , la migración transendotelial de monocitos y la adhesión de éstos al endotelio (*Rajesh M et al. 2007*). Dado que se ha descrito la presencia de receptores CB2 en células endoteliales de pulmón (*Zoratti C et al. 2003*), cabe especular que la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias derivada del tratamiento con CBD podría ser responsable

de la disminución de la permeabilidad vascular observada en el presente estudio a través de este mecanismo. La disminución de la expresión de citokinas proinflamatorias y la reducción del daño histológico en pulmón observada en este estudio tras la administración de CBD es similar a la encontrada en modelos de lesión en otros órganos (*Borrelli F et al. 2009, Pan H et al. 2009, Castillo A et al. 2010*), aunque como se ha dicho previamente es la primera vez que se describe en pulmón. Queda por determinar si la disminución de la concentración de IL1 e IL-6 en pulmón, la reducción del daño histológico y de la permeabilidad vascular observados con el tratamiento con CBD se deben a un efecto local en el pulmón o a la disminución del proceso inflamatorio en cerebro. La presencia de una correlación positiva en este trabajo entre la concentración de IL-1 en cerebro y pulmón sugiere que la liberación de citokinas en cerebro es en parte responsable del daño pulmonar, y que por tanto, la reducción de la inflamación en cerebro con el tratamiento con CBD tendría como efecto una reducción del daño pulmonar. Por otro lado, en el presente estudio se observó que los animales tratados con CBD presentaron una concentración de IL-6 y un incremento del EVLW significativamente menor que los controles, lo cual sugeriría un efecto protector antiinflamatorio local sobre el daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica independiente de su acción sobre el cerebro. En favor de esta hipótesis, varios estudios han demostrado efectos antiinflamatorios de CBD fuera del SNC (*Borrelli F et al. 2009, Pan H et al. 2009*).

VIII. CONCLUSIONES

1. El daño cerebral hipóxico-isquémico induce lesión pulmonar a distancia de origen inflamatorio:
 - 1.1 Disminuye la distensibilidad pulmonar dinámica, altera el intercambio de gases e induce edema pulmonar.
 - 1.2 Provoca lesión histológica pulmonar.
 - 1.3 Da lugar a un incremento de la permeabilidad vascular pulmonar.
- 2 Provoca incremento de citoquinas proinflamatorias en pulmón.
- 3 El tratamiento con cannabidiol tras el episodio hipóxico-isquémico cerebral reduce el daño pulmonar:
 - 3.1 Disminuye el edema pulmonar, mejora el intercambio de gases e incrementa la distensibilidad dinámica.
 - 3.2 Disminuye el daño histológico pulmonar.
 - 3.3 Disminuye la alteración de la permeabilidad vascular pulmonar.
 - 3.4 Disminuye la inflamación pulmonar con reducción de las citoquinas en tejido.

- 4 Se ha caracterizado un nuevo modelo de daño pulmonar secundario a lesión cerebral hipóxico-isquémica en lechones recién nacidos que induce eficazmente lesión cerebral y pulmonar demostrable funcional e histológicamente.

IX. SÍNTESIS FINAL

La lesión cerebral por hipoxia-isquemia produce una respuesta inflamatoria en el pulmón caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular, edema pulmonar, alteración histológica e incremento de la concentración de citocinas proinflamatorias. En este escenario, el tratamiento con CBD disminuye el daño pulmonar, efecto que podría derivarse de la reducción del daño cerebral, pero que también podría ser resultado de una acción antiinflamatoria local en pulmón, o de una combinación de ambos mecanismos.

Este trabajo fue financiado mediante becas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PS09/01900) y de GW Pharmaceuticals (GWCRI09119-2).

X. BIBLIOGRAFÍA

- Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:734–744
- Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, Pertwee RG, Castillo AI, Romero J, Martínez-Orgado J. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res.* 2008; 64(6):653-8.
- Alvarez-Díaz A, Hilario E, de Cerio FG, Valls-i-Soler A, Alvarez-Díaz FJ. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology.* 2007; 92(4):227-35.
- Appendino G, Chianese G, Tagliatela-Scafati O. Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Curr Med Chem.* 2011;18(7):1085-99.
- Arévalo-Martín A, García-Ovejero D, Gómez O, Rubio-Araiz A, Navarro-Galve B, Guaza C, Molina-Holgado E, Molina-Holgado F. CB2 cannabinoid receptors as an emerging target for demyelinating diseases: from neuroimmune interactions to cell replacement strategies. *Br J Pharmacol* 2008; 153(2):216-25.
- Baudendistel L, Shields JB, Kaminski DL. Comparison of double indicator thermodilution measurements of extravascular lung water (EVLW) with radiographic estimation of lung water in trauma patients. *J Trauma* 1982; 22:983–988

- Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharm Ther.* 2005; 106(2):133-45
- Bifulco M, Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med.* 2002; 8(6):547-50.
- Blake DR, Robson P, Ho M, Jubb RW, McCabe CS. Preliminary assessment of the efficacy, tolerability and safety of a cannabis-based medicine (Sativex) in the treatment of pain caused by rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006; 45(1):50-2.
- Bocking AD, Gagnon R, White SE, et al. Circulatory responses to prolonged hypoxemia in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:1418–24.
- Borrelli F, Aviello G, Romano B, Orlando P, Capasso R, Maiello F, Guadagno F, Petrosino S, Capasso F, Di Marzo V, Izzo AA. Cannabidiol, a safe and non-psychoactive ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *J Mol Med (Berl).* 2009; 87(11):1111-21.
- Brown AW, Brierley JB. The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischaemia. *Acta Neuropathol.* 1973; 23(1):9-22.
- Burstein S. PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci.* 2005; 77(14):1674-84.
- Campos AC, Guimarães FS. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2008; 199(2):223-30.

- Capasso R, Borrelli F, Aviello G, Romano B, Scalisi C, Capasso F, Izzo AA. Cannabidiol, extracted from *Cannabis sativa*, selectively inhibits inflammatory hypermotility in mice. *Br J Pharmacol*. 2008; 154(5):1001-8.
- Capasso R, Borrelli F, Aviello G, Romano B, Scalisi C, Capasso F, Izzo AA. Cannabidiol, extracted from *Cannabis sativa*, selectively inhibits inflammatory hypermotility in mice. *Br J Pharmacol*. 2008; 154(5):1001-8.
- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(20):7895-900.
- Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 2010; 37(2):434-40.
- Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, Longar SM. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*. 1984 Mar; 34(3):315-20.
- Chen Y, Buck J. Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 293(3):807-12.
- Committee on Obstetric Practice, ACOG. ACOG Committee Opinion. Number 326, December 2005. Inappropriate Use of the Terms Fetal Distress and Birth Asphyxia. *Obstet Gynecol*. 2005 Dec; 106(6): 1469-70.

- Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 2008; 139(3):541-50.
- Coutts AA, Izzo AA. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Dec;4(6):572-9.
- Dalle Carbonare M, Del Giudice E, Stecca A, Colavito D, Fabris M, D'Arrigo A, Bernardini D, Dam M, Leon A. A saturated N-acylethanolamine other than N-palmitoyl ethanolamine with anti-inflammatory properties: a neglected story. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20 Suppl 1:26-34.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V. Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res*. 2007; 313(14):2993-3004.
- Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci*. 2006; 78(6):549-63.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988 Nov; 34(5):605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1946-9.

- Di Carlo G, Izzo AA. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003; 12(1):39-49.
- Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18(2):129-40.
- Díaz Laviada I. Sistema cannabinoide endógeno: aspectos bioquímicos e implicación fisiológica. En: Ramos JA, Fernández-Ruíz J y Guzmán M (Ed). *Actualización Sobre el Potencial Terapéutico de los Cannabinoides*. SEIC, Madrid, 2009; pp 9-27.
- Díaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem*. 2005; 5(7):619-30.
- Dodd JM, Hristopoulos M, Scharfstein D, Brower R, Hassoun P, King LS, Becker P, Liu M, Wang W, Hassoun HT, Rabb H. Interactive effects of mechanical ventilation and kidney health on lung function in an in vivo mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L3–L11, 2009.
- Donnelly, S.C., Strieter, R.M., Reid, P.T., Kunkel, S.L., Burdick, M.D., Armstrong, I., Mackenzie, A., Haslett, C., 1996. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann. Intern. Med.* 125, 191–196.
- Durst R, Danenberg H, Gallily R, Mechoulam R, Meir K, Grad E, Beerli R, Pugatsch T, Tarsish E, Lotan C. Cannabidiol, a nonpsychoactive Cannabis constituent, protects against myocardial ischemic reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(6):H3602-7.

- Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L. Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal*. 2005; 17(1):25-37.
- ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. Bronchoalveolar lavage in children. *Eur Respir J* 2000; 15: 217±231.
- Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Luvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett*. 2006; 399(1-2):91-5.
- Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L jr, De Filippis D, Cottone P, Luvone T, Cuomo V, Steardo L. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br. J. Pharmacol* 2007; 151(8):1272–1279.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett*. 1996; 393(2-3):231-5.
- Felix B, Leger ME, Albe-Fessard D, Marcilloux JC, Rampin O, Laplace JP 1999. Stereotaxic atlas of the pig brain. *Brain Res Bull* 49: 1-137
- Fernández-Ruiz J, González S. Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):479-507.

- Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N, Burdick MD, Strieter RM, Dark JH, Corris PA (1999). Enhanced pulmonary inflammation in organ donors following fatal nontraumatic brain injury. *Lancet* 353:1412–3.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995 Aug 15;232(1):54-61.
- Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 1964; 86(8): 1646–1647.
- García MC, Adler-Graschinsky E, Celuch SM. Enhancement of the hypotensive effects of intrathecally injected endocannabinoids by the entourage compound palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* 2009; 610(1-3):75-80.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 89(3-4):105-11.
- Gong, C., Hoff, J.T., Keep, R.F., 2000. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. *Brain Res.* 871, 57–65.
- Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* 2007; 121(10):2172-80.

- Gruber A, Reinprecht A, Görzer H, Fridrich P, Czech T, Illievich UM, Richling B. Pulmonary function and radiographic abnormalities related to neurological outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1998; 88(1): 28–37
- Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J. Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(5):1612-20.
- Halperin BD, Feeley TW, Mihm FG, et al. Evaluation of the portable chest roentgenogram for quantitating extravascular lung water in critically ill adults. *Chest* 1985; 88:649–652
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 8268–8273.
- Hankins GD, Speer M. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol.* 2003 Sep; 102(3): 628-636.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5):1932-6.

- Hill J, Lindsay T, Rusche J, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. A Mac-1 antibody reduces liver and lung injury but not neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery*. 1992; 112(2):166-72.
- Hoke TS, Douglas IS, Klein CL, He Z, Fang W, Thurman JM, Tao Y, Dursun B, Voelkel NF, Edelstein CL, Faubel S. Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Jan;18(1):155-64
- Holland MC, Mackersie RC, Morabito D, Campbell AR, Kivett VA, Patel R, Erickson VR, Pittet JF. The Development of Acute Lung Injury Is Associated with Worse Neurologic Outcome in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *J Trauma*. 2003; 55:106 –111.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 2004; 47:345-358.
- Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS, Milne GM. Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol*. 1988 Mar;33(3):297-302.
- Huwiler A, Pfeilschifter J. New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75(10):1893-900.

- Kadesky KM, Turnage RH, Rogers TE, Inman L, Myers SI. In vitro evidence of neutrophil-mediated lung injury after intestinal reperfusion. *Shock*. 1995; 4(2):102-6.
- Kahn JM, Caldwell EC, Deem S, Newell DW, Heckbert SR, Rubenfeld GD. Acute lung injury in patients with subarachnoid hemorrhage: Incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care Med*. 2006; 34(1): 196-202
- Kalsotra A, Zhao J, Anakk S, Dash PK, HW Strobel. Brain trauma leads to enhanced lung inflammation and injury: evidence for role of P4504Fs in resolution. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27(5): 963–974
- Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte–endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:668–76.
- Kitamura Y, Nomura M, Shima H, Kuwana N, Kuramitsu T, Chang CC, Bando K, Shibata L, Nishikawa H. Acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome following subarachnoid haemorrhage: a survey by the Shonan Neurosurgical Association. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2010; 50: 456-460.
- Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J Biol Chem*. 2010; 285(3):1616-26.

- Kramer AA, Postler G, Salhab KF, Mendez C, Carey LC, Rabb H. Renal ischemia/reperfusion leads to macrophage-mediated increase in pulmonary vascular permeability. *Kidney Int* 1999; 55: 2362–2367.
- Krylatov AV, Ugdyzhekova DS, Bernatskaya NA, Maslov LN, Mekhoulam R, Pertwee RG, Stephano GB. Activation of type II cannabinoid receptors improves myocardial tolerance to arrhythmogenic effects of coronary occlusion and reperfusion. *Bull Exp Biol Med*. 2001; 131(6):523-5.
- Kurth CD, McCann JC, Wu J, Miles L, Loepke AW. Cerebral oxygen saturation-time threshold for hypoxic-ischemic injury in piglets. *Anesth Analg*. 2009; 108(4):1268-77.
- Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, Alvarez A, Rey-Santano MC, Mielgo V, Murgia-Esteve X, Hilario E, Martinez-Orgado J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res*. 2011; 70(3):272-7.
- Lampl, Y., Shmuilovich, O., Lockman, J., Sadeh, M., Lorberboym, M., 2005. Prognostic significance of blood brain barrier permeability in acute hemorrhagic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 20, 433–437.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2005; 19(1-2):96-107.

- Le Tulzo Y, Shenkar R, Kaneko D, Moine P, Fantuzzi G, Dinarello CA, Abraham E. Hemorrhage Increases Cytokine Expression in Lung Mononuclear Cells in Mice Involvement of Catecholamines in Nuclear Factor- κ B Regulation and Cytokine Expression. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:1516–1524
- Levy DE, Brierley JB, Silverman DG, Plum F. Brief hypoxia-ischemia initially damages cerebral neurons. *Arch Neurol.* 1975 Jul; 32(7):450-6.
- Lewis DY, Brett RR. Activity-based anorexia in C57/BL6 mice: effects of the phytocannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and the anandamide analogue, OMDM-2. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2010; 20(9):622-31.
- Macmillan CS, Grant IS, Andrews PJ. Pulmonary and cardiac sequelae of subarachnoid haemorrhage: time for active management?. *Intensive Care Med.* 2002; 28: 1012-1023.
- Mao J, Price DD, Lu J, Keniston L, Mayer DJ. Two distinctive antinociceptive systems in rats with pathological pain. *Neurosci Lett.* 2000; 280(1):13-6.
- Martin TR, Pistoresse BP, Chi EY, Goodman RB, Matthay MA (1989) Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. *J Clin Invest* 84:1609–19
- Martin-Ancel A, Garcia-Alix A, Gaya F, Cabañas F, Burgueros M, Quero J. Multiple organ involvement in perinatal asphyxia. *J Pediatr.* 1995; 127(5): 786-

- Martínez Orgado JA, Fernández López D, Bonet Serra B, Lizasoain Hernández I, Romero Paredes J. El sistema cannabinoide y su importancia en el período perinatal. *An Pediatr (Barc)*. 2005 Nov;63(5):433-40.
- Martínez-Orgado J, Fernández-López D, Lizasoain I, Romero J. The seek of neuroprotection: introducing cannabinoids. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2007; 2(2):131-9.
- Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol*. 2011; 79(6):964-73.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346:561-564.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):83-90.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO. Cannabidiol—recent advances. *Chem. Biodivers* 2007; 4: 1678–1692.
- Merz U, Kellinghaus M, Häusler M, Pakrawan N, Klosterhalfen B, Hörnchen H. Partial liquid ventilation with surfactant: effects on gas exchange and lung

pathology in surfactant-depleted piglets. *Intensive Care Med* (2000) 26: 109±116

- Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA. Acute, chronic and withdrawal effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on the sequential activation of MAPK/Raf-MEK-ERK signaling in the rat cerebral frontal cortex: short-term regulation by intrinsic and extrinsic pathways. *J Neurosci Res*. 2007; 85(3):656-67.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365:61-65.
- Ozaita A, Puighermanal E, Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem*. 2007; 102(4):1105-14.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58:389–462.
- Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Patel V, Mukhopadhyay B, Gao B, Haskó G, Pacher P. Cannabidiol Attenuates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Decreasing Oxidative/Nitrosative Stress, Inflammation, and Cell Death. *J Pharmacol Exp Ther* 2009. 328(3): 708-714.
- Peeters LL, Sheldon RE, Jones MD, et al. Blood flow to fetal organs as a function of arterial oxygen content. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:637–46.
- Perlman JM, Tack ED, Martin T, Shackelford G, Amon E. Acute systemic organ injury in term infants after asphyxia. *American Journal of Diseases of Children*. 1989; 143(5): 617-620

- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev* 2010; 62:588–631.
- Pertwee RG. Pharmacological and therapeutic targets for Δ^9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Euphytica*. 2004; 140(1-2): 73-82.
- Pertwee, RG, 2004. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In: Di Marzo, V. (Ed.), *Cannabinoids*. Kluwer Academic Plenum Publishers, pp. 32–83.
- Phelan JP, Ahn MO, Korst L, Martin GI, Wang YM. Intrapartum fetal asphyxia brain injury with absent multiorgan system dysfunction. *J Matern Fetal Med*. 1998; 7(1): 19-22.
- Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg*. 1992; 127(2):175-9.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Haskó G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF- α -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2210–H2218.
- Randall MD. Endocannabinoids and the haematological system. *Br J Pharmacol*. 2007; 152(5):671-5.

- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrié P, Brelière JC, Le Fur G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* 1995; 56(23-24):1941-7.
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res.* 2005; 30(8):1037-43.
- Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem Res.* 2005; 30(8):1037-43.
- Sakka SG, Klein M, Reinhart K, Meier-Hellmann A. Prognostic Value of Extravascular Lung Water in Critically Ill Patients. *Chest* 2002;122;2080-2086.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 5: 64(2):193-8.
- Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1989; 106(2):195-201.
- Shankaran S, Woldt E, Koepke T, Bedard MP, Nandyal R. Acute neonatal morbidity and long-term central nervous system sequelae of perinatal asphyxia in term infants. *Early Hum Dev.* 1991; 25(2): 135-48.

- Sheldon RE, Peeters LL, Jones MD, et al. Redistribution of cardiac output and oxygen delivery in the hypoxemic fetal lamb. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135:1071–8.
- Shen M, Thayer SA. Delta9-tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic synaptic transmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol*. 1999; 55(1):8-13.
- Stevens RD, Nyquist PA. The systemic implications of aneurismal subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Sci*. 2007; 261: 143-156
- Sturm JA, Wisner DH, Oestern H-J, et al. Increased lung capillary permeability after trauma: a prospective study. *J Trauma* 1986; 26:411–418
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*. 2006; 45(5):405-46.
- Sugiura T, Waku K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *J Biochem*. 2002;132(1):7-12.
- Sumariwalla PF, Gallily R, Tchilibon S, Fride E, Mechoulam R, Feldmann M. A novel synthetic, nonpsychoactive cannabinoid acid (HU-320) with anti-inflammatory properties in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(3):985–998.
- Sumariwalla PF, Gallily R, Tchilibon S, Fride E, Mechoulam R, Feldmann M. A novel synthetic, nonpsychoactive cannabinoid acid (HU-320) with

- antiinflammatory properties in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(3):985-98.
- Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res.* 2007; 2007:23513.
 - Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007; 150(5):613-23.
 - Toet MC, Lemmers PM, van Schelven LJ, van Bel F. Cerebral oxygenation and electrical activity after birth asphyxia: their relation to outcome. *Pediatrics.* 2006; 117(2):333-9.
 - Ugdyzhekova DS, Bernatskaya NA, Stefano JB, Graier VF, Tam SW, Mekhoulam R. Endogenous cannabinoid anandamide increases heart resistance to arrhythmogenic effects of epinephrine: role of CB(1) and CB(2) receptors. *Bull Exp Biol Med.* 2001; 131(3):251-3.
 - Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; 310: 329–332.
 - Vennekens R, Owsianik G, Nilius B. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(1):18-31.
 - Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (ed), *Neurology of the Newborn.* WB Saunders Co, Philadelphia, 2001; pp 331–394.

- Wort SJ, Evans TW. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *Br Med Bull.* 1999; 55(1):30-48.
- Wu S, Fang CX, Kim J, Ren J. Enhanced pulmonary inflammation following experimental intracerebral hemorrhage. *Experimental Neurology.* 2006; 200(1): 245–249.
- Xie XQ, Chen JZ, Billings EM. 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins.* 2003; 1:53(2):307-19.
- Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol.* 2010; 159(1):122-8.
- Zarrindast MR, Kangarlu-Haghighi K, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S. Influence of intracerebroventricular administration of cannabinergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Behav Pharmacol.* 2006; 17(3):231-7.
- Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1351–1362.

X. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	<u>Pág.</u>
Tabla I. Características de los grupos de estudio.....	37
Tabla II. Variables hemodinámicas.....	44
FIGURAS	
Figura 1. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol.....	12
Figura 2. Estructura molecular de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.....	13
Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de transducción de señal tras la activación de receptores cannabinoides.....	15
Figura 4. Estructura química de la AEA (anandamida).....	20
Figura 5. Estructura química del 2-araquidonoil glicerol (2-AG).....	21
Figura 6. Estructura química del cannabidiol.....	22
Figura 7. Esquema tridimensional de la molécula de CBD. Detalle del grupo fenol..	23
Figura 8. Porcentaje de cambio de la amplitud media del aEEG en los grupos de hipoxia-isquemia (VEH) y control (SHM).....	38

Figura 9. Porcentaje de cambio de la saturación regional de oxígeno cerebral (rSO ₂) en los grupos vehículo (VEH) y control (SHM).....	39
Figuras 10a, 10b y 10c. Histología cerebral. Figura 10a: microfotografías de tejido cerebral con tinción de Nissl. Figuras 10b y 10c: Relación entre el número de neuronas muertas y viables con la tinción de Nissl, en córtex frontoparietal y en el área CA1 de hipocampo en los grupos VEH y SHAM.....	40,41
Figura 11. Concentración de IL-1 en cerebro en los grupos VEH y SHM.....	42
Figura 12. Concentración de IL-6 en cerebro en los grupos VEH y SHM.....	42
Figura 13. Concentración de TNF- α en cerebro en los grupos VEH y SHM.....	43
Figura 14. Porcentaje de cambio de la tensión arterial media VEH y control SHM..	44
Figura 15. Evolución de la distensibilidad dinámica en los grupos VEH y SHM.....	45
Figura 16. Porcentaje de cambio del índice de oxigenación VEH y control SHM.....	46
Figura 17. Incremento del agua extravascular pulmonar VEH y control SHM.....	46
Figura 18. Histología pulmonar de animal del grupo VEH y del grupo control.....	47
Figura 19. Puntuación de severidad del daño histológico pulmonar en los grupos VEH y SHM.....	48
Figura 20. Variación de la concentración de proteínas en lavado broncoalveolar en los grupos VEH y SHM.....	49
Figura 21. Concentración de IL-1 en pulmón en los grupos VEH y SHM.....	50

Figura 22. Concentración de IL-6 en pulmón en los grupos VEH y SHM.....	50
Figura 23. Concentración de TNF- α en pulmón en los grupos VEH y SHM.....	50
Figura 24. Correlación entre las concentraciones de IL-1 en pulmón y cerebro.....	51
Figura 25. Porcentaje de cambio de la amplitud media del aEEG en los grupos SHM, VEH y CBD.....	52
Figura 26. Porcentaje de cambio de la saturación regional de oxígeno cerebral (rSO ₂) en los grupos VEH, CBD y SHM.....	53
Figura 27a, 27b y 27c. Histología cerebral. Figura 27a: microfotografías de tejido cerebral con tinción de Nissl de los grupos CBD, VEH y SHAM. Figuras 27b y 27c: relación entre el número de neuronas muertas y viables con la tinción de Nissl, en córtex frontoparietal y en el área CA1 del hipocampo, en CBD, VEH y SHAM.....	54,55
Figura 28. Concentración de IL-1 en cerebro en los grupos VEH, CBD y SHM.....	56
Figura 29. Concentración de IL-6 en cerebro en los grupos VEH, CBD y SHM.....	56
Figura 30. Concentración de TNF- α en cerebro en los grupos VEH, CBD y SHM.....	57
Figura 31. Porcentaje de cambio de la tensión arterial media en los grupos VEH, CBD y SHM.....	58
Figura 32. Evolución de la distensibilidad dinámica en VEH, CBD y SHM.....	59
Figura 33. Porcentaje de cambio del índice de oxigenación en los grupos VEH, CBD y SHM.....	59

Figura 34. Incremento del agua extravascular pulmonar en los grupos vehículo VEH, CBD y SHM.....	60
Figura 35a. Histología pulmonar de animales del grupo VEH, control y CBD.....	61
Figura 35b. Puntuación de severidad del daño histológico pulmonar en los grupos VEH, CBD y SHM.....	62
Figura 36. Variación de la concentración de proteínas medida en lavado broncoalveolar en los grupos VEH, CBD y SHM.....	63
Figura 37. Concentración de IL-1 en pulmón en los grupos VEH, CBD y SHM.....	64
Figura 38. Concentración de IL-6 en pulmón en los grupos VEH, CBD y SHM.....	64
Figura 39. Concentración de TNF- α en pulmón en los grupos VEH, CBD y SHM....	64