

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



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto del cannabidiol sobre la hemorragia de la matriz  
germinal producida en neonatos prematuros**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Aaron del Pozo Sanz**

**Directores**

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

**Madrid**

**© Aaron del Pozo Sanz, 2021**

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



**TESIS DOCTORAL**

EFFECTO DEL CANNABIDIOL SOBRE LA HEMORRAGIA DE LA MATRIZ GERMINAL  
PRODUCIDA EN NEONATOS PREMATUROS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

AARÓN DEL POZO SANZ

DIRECTOR

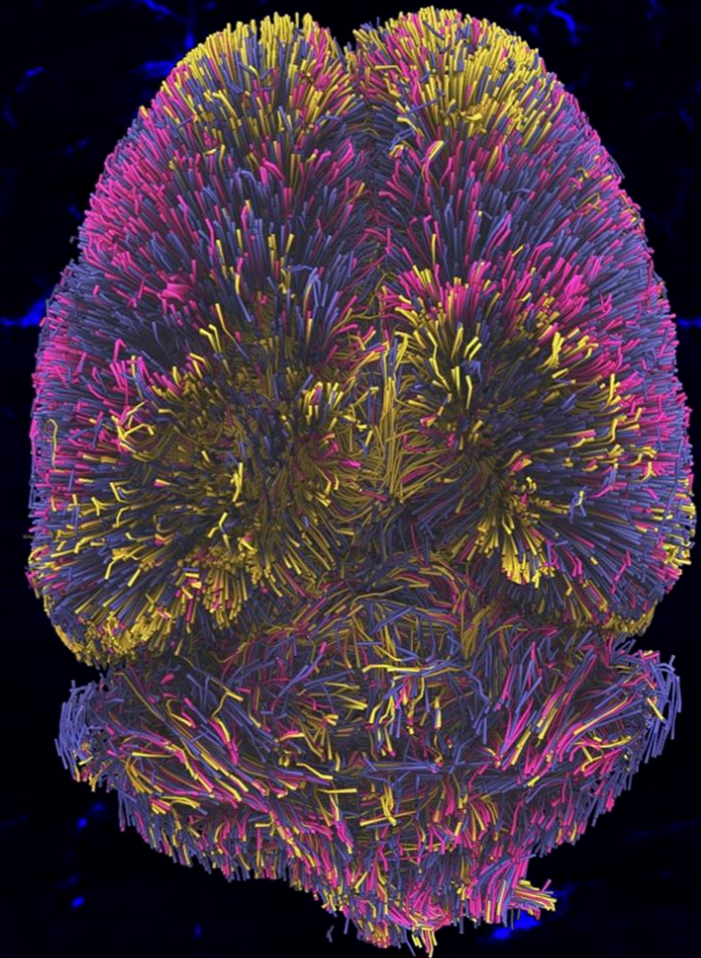
JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ ORGADO  
ANA GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Medicina

## EFFECTO DEL CANNABIDIOL SOBRE LA HEMORRAGIA DE LA MATRIZ GERMINAL PRODUCIDA EN NEONATOS PREMATUROS



**Aarón del Pozo Sanz**

Bajo la dirección de:

Dr. José Antonio Martínez Orgado

Dra. Ana Gutiérrez Rodríguez

EFFECTO DEL CANNABIDIOL SOBRE LA HEMORRAGIA DE LA MATRIZ  
GERMINAL PRODUCIDA EN NEONATOS PREMATUROS

JUNIO 2021

# **ABREVIATURAS**



- 2-AG: 2-araquidonilglicerol
- ACV: Accidente cerebrovascular
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AEA: Anandamida
- ARM: Angiografía de Resonancia Magnética
- BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*)
- BHE: Barrera hematoencefálica
- BPN: Nacimiento de bajo peso
- BQ: Bioquímica
- BW: Beam walking
- CA: Anhidrasa carbónica (del inglés, *carbonic anhydrase*)
- CB<sub>1</sub>: Receptor cannabinoide 1
- CB<sub>2</sub>: Receptor cannabinoide 2
- CBD: Cannabidiol
- CC: Cuerpo calloso
- CEs: Células endoteliales
- CF: Citometría de flujo
- CIR: Crecimiento intrauterino restringido
- CKs: Citoquinas
- CO: Monóxido de carbono
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- Cr: Creatina
- CRT: Test del cilindro (del inglés, *cylinder rear test*)
- CTX: Corteza
- DCE: Imágenes dinámicas de contraste realizado (*Dynamic Contrast Enhanced*)
- DVPH: Dilatación ventricular post-hemorrágica
- EBPN: Nacimientos de extremado bajo peso
- EG: Edad gestacional
- EHI: Encefalopatía hipóxica isquémica
- FA: Ángulo de excitación (*Flip Angle*)
- FOV: Campo de visión (*Field of View*)
- FSC: Flujo sanguíneo cerebral
- FSE: Eco de espín rápido (*Fast Spin-Echo*)
- FST: Test de la natación forzada (del inglés, *forced swimming test*)
- Gd: Gadolinio
- GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales (del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*)
- GE: Eminencia ganglionar (del inglés, *Ganglionic eminence*)
- GFAP: proteína ácida fibrilar glial
- Hb: Hemoglobina
- HC: Hidrocefalia
- HI: Hemisferio ipsilateral
- HIC: Hemorragia intracraneal
- HIV: Hemorragia intraventricular
- H-MRS: Espectroscopía de resonancia magnética
- HO-1: Hemo oxigenasa 1
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés, *high*)

- performance*                      *liquid*  
*chromatography*)
- HRP: Peroxidasa de rábano
  - IFN: Interferon
  - IHQ: Inmunohistoquímica
  - IL: Interleuquina
  - iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, *inducible nitric oxygen syntase*)
  - IR: Inversión-recuperación
  - IRM: Imagen de Resonancia Magnética
  - Lac: Lactato
  - LC-MS: cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (del inglés, *liquid chromatography–mass spectrometry*)
  - LCR: Líquido cefalorraquídeo
  - MAC: Moléculas de adhesión celular
  - MB: Membrana basal
  - MBP: Proteína básica de mielina (del inglés, *myelin basic protein*)
  - MEC: Matriz extracelular
  - Mfsd2a: Major facilitator superfamily domain-containing protein 2
  - MG: Matriz germinal
  - MMP: Metaloproteasa
  - NA: Número de experimentos promediados (*Number of Averages*)
  - NAA: N-acetilaspártato
  - NAPE: N-acil-fosfatidiletanolamina
  - NFκ-B: Factor nuclear *kappa* B (del inglés, nuclear factor *kappa* B)
  - NOR: Reconocimiento de objetos nuevo (del inglés, *novel object recognition*)
  - NrF-2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (del inglés, *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*)
  - NT: Neurotransmisor
  - OEA: Oleoiletanolamida
  - OMS: Organización mundial de la salud
  - PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate-buffered saline*)
  - PCI: Parálisis cerebral infantil
  - PCOH: Parálisis cerebral de origen hemorrágico
  - PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (en inglés, *platelet derived growth factor*)
  - PE: Prematuro extremo
  - PEA: Palmitoiletanolamida
  - PEG: Pequeño para su edad gestacional
  - PIC: Presión intracraneal
  - PND: Postnatal (del inglés, *postnatal day*)
  - PPAR: Receptores activados por proliferadores peroxisomales (del inglés, *peroxisome proliferator activated receptors*)
  - RM: Resonancia magnética
  - RN: Recién nacido

- ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)
- RT: Temperatura ambiente (del inglés, *room temperatura*)
- SB: Sustancia blanca
- SE: Eco de espín (*Spin-echo*)
- SEC: Sistema endocannabinoide
- SEM: Medial del error standard (del inglés, *standard error media*)
- SG: Sustancia gris
- SLTH: Anchura del corte (*Slice Thickness*)
- SNC: Sistema nervioso central
- SNP: Sistema nervioso periférico
- SOD: Superóxido dismutasa
- SVZ: Zona subventricular (del inglés, *subventricular zone*)
- T1WI: imágenes potenciadas en T1 (*T1 weighted imaging*)
- T2WI: imágenes potenciadas en T2 (*T2 weighted imaging*)
- TAC: Tomografía axial computarizada
- TBI: Traumatismo craneoencefálico (del inglés, *traumatic brain injury*)
- TBS: solución salina tamponada con Tris (del inglés, *Tris buffer saline*)
- TDAH: Trastorno de déficit de atención e hiperactividad
- TE: Tiempo de eco
- TGF: Factor de crecimiento tumoral (del inglés, *tumoral growing factor*)
- THC: Tetrahidrocannabinol
- TI: Tiempo de inversión
- TLR: Receptor tipo toll (del inglés, *Toll-like receptor*)
- TLR-4: Receptor tipo toll 4 (del inglés, *Toll-like receptor 4*)
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (del inglés, *tumoral necrosis factor  $\alpha$* )
- TR: Tiempo de Repetición
- TS: Tail suspension
- UEs: Uniones estrechas
- WB: Western blot
- ZO: Zonula occludens



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>9</b>
RESUMEN	11
ABSTRACT	15
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>LA PARÁLISIS CEREBRAL INFANTIL</b>	<b>21</b>
<i>Aspectos Generales</i>	21
<i>Parálisis cerebral en el prematuro extremo y de muy bajo peso</i>	24
<i>Vulnerabilidad del cerebro inmaduro</i>	29
<b>LA PARÁLISIS CEREBRAL DE ORIGEN HEMORRÁGICO</b>	<b>37</b>
<i>¿Qué es la Hemorragia Intraventricular?</i>	37
<i>Daño primario: el efecto mecánico de la hemorragia</i>	43
<i>Daño secundario: principales eventos fisiopatológicos implicados</i>	44
<i>Consecuencias de la HIV: Daño en la estructura y funcionalidad del SNC</i>	55
<b>BUSQUEDA DE UN TRATAMIENTO QUE PREVenga LA PCOH</b>	<b>59</b>
<i>Tratamientos actuales</i>	59
<i>Dianas terapéuticas endógenas implicadas en la HIV</i>	61
<i>El SEC como posible herramienta para reducir la fisiopatología de la HIV</i>	63
<i>CBD como posible estrategia terapéutica</i>	66
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>73</b>
<b>DISEÑOS EXPERIMENTALES: JUSTIFICACIÓN Y BASES TEÓRICAS</b>	<b>75</b>
<i>Diseño experimental 1: Validación de un modelo animal de HIV</i>	75
<i>Diseño experimental 2: Efecto terapéutico del CBD</i>	77
<i>Diseño experimental 3: Posibles mecanismos de acción del CBD</i>	79
<b>MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES</b>	<b>80</b>
<i>Animales de experimentación</i>	80
<i>Inducción de la HIV y asignación de grupos</i>	80
<i>Estudios de resonancia magnética</i>	88
<i>Estudios de espectroscopía de resonancia magnética</i>	91
<i>Análisis histoquímicos</i>	94
<i>Microscopía y cuantificación de las imágenes</i>	96
<i>Estudios bioquímicos</i>	97
<i>Estudios citometría de flujo</i>	99
<i>Análisis estadístico</i>	102
<b>RESULTADOS</b>	<b>103</b>
<b>Validación de un modelo animal de HIV</b>	<b>105</b>
<i>Variabilidad en el porcentaje de casos producidos por la administración intraventricular de Colagenasa de Clostridium</i>	105

<i>Consecuencias neuroanatómicas de la HIV a largo plazo: el daño en la SB</i> .....	108
<i>Fisiopatología de la HIV en nuestro modelo animal</i> .....	111
<b>Efecto terapéutico del CBD</b> .....	<b>129</b>
<i>Tratamiento postnatal con CBD</i> .....	129
<i>Tratamiento prenatal con CBD</i> .....	143
<i>Administración combinada de CBD pre y postnatalmente</i> .....	149
<i>Comparación entre las distintas formas de tratamiento de CBD en la PCOH</i> .....	154
<b>Posibles mecanismos de acción del CBD</b> .....	<b>156</b>
<i>Efectos del CBD sobre la fisiopatología a corto plazo</i> .....	156
<i>Efectos del CBD sobre la fisiopatología a medio plazo</i> .....	160
<i>Efectos del CBD sobre la fisiopatología a largo plazo</i> .....	165
<i>Efectos del CBD sobre el linaje oligodendroglial</i> .....	169
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>173</b>
<i>Desarrollo de un modelo animal de HIV</i> .....	175
<i>Efecto terapéutico del CBD</i> .....	184
<i>Posibles mecanismos de acción del CBD</i> .....	188
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>195</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>199</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>227</b>



# **RESUMEN/ABSTRACT**



# RESUMEN

La Parálisis Cerebral Infantil (PCI) es la discapacidad más severa y frecuente durante la infancia, y conlleva una serie de secuelas de tipo motor, cognitivo y sensorial. El carácter multifactorial de esta patología hace que el estudio de su etiología sea especialmente complejo, no obstante, una de las principales causas de PCI es la prematuridad y el peso del recién nacido. Se consideran prematuros extremos (PE) y de extremado bajo peso al nacer (EBPN) a aquellos que nacen antes de la semana 25 y que pesan menos de 1000 g, respectivamente. Debido a la inmadurez de su sistema nervioso central (SNC), tanto los PE como los EBPN son considerados el grupo más susceptible a desarrollar esta patología.

Una de las principales razones que justifican esta susceptibilidad es la elevada probabilidad de sufrir hemorragia intraventricular (HIV) que presentan estos pacientes. La HIV es el tipo de hemorragia más común en el recién nacido, y es una de las principales causas del daño en la sustancia blanca (SB) y por tanto de desarrollar una PCI. La HIV se produce por la rotura espontánea de los vasos que conforman la matriz germinal (MG), estructura donde ocurre la formación y posterior migración de los progenitores neuronales y oligodendrogiales durante el desarrollo cerebral. Dado que su máxima actividad se produce durante el último trimestre de embarazo, la alta demanda metabólica y de oxígeno junto con la fragilidad de los vasos sanguíneos en esta zona la convierten en una estructura altamente vulnerable y susceptible a dañarse como consecuencia de diversos estímulos extrauterinos. En este sentido, los cambios de presión a los que se somete a los neonatos, la ausencia de autorregulación por parte de los PE y EBPN, así como a la fragilidad y elevada actividad de la MG, la probabilidad de sufrir HIV es bastante probable.

El avance en las técnicas de neuroimagen ha permitido realizar un pronóstico de la enfermedad y las secuelas en función del volumen y localización del sangrado. De este modo, se ha descrito que la dilatación ventricular post-hemorrágica (DVPH) es una de las complicaciones más importantes que determinan el desarrollo de una PCI en el PE. Históricamente, esta complicación se asociaba a los grados más severos (III y IV), sin embargo, recientes estudios realizados en pacientes han demostrado que los grados de lesión más leves también aumentan el riesgo de desarrollo de PCI.

A pesar de su elevada incidencia, el alto coste socioeconómico y su gran impacto a nivel emocional y sanitario, esta enfermedad carece hoy en día de tratamiento. Una de las razones es la ausencia de un modelo animal que la reproduzca eficazmente. Generalmente se han utilizado modelos basados en la inyección de glicerol o sangre autóloga en animales de edad postnatal 1 (del inglés *postnatal day*, PND) y PND 7, sin embargo, estos no han logrado reproducir el efecto de la rotura espontánea de los vasos de la MG. Por otro lado, se ha descubierto que este efecto si se producía cuando se inyectaba paraventricularmente *Colagenasa de Clostridium*, una enzima capaz de desnaturalizar la matriz extracelular que conforman la MG. No obstante, esta técnica solo se ha realizado en ratas PND 7, cuya etapa del neurodesarrollo es equivalente al de un niño a término. En este sentido, el desarrollo de este modelo en ratas PND 1, con un desarrollo cerebral similar al de un PE, ofrecería una posibilidad teórica de conseguir un modelo animal que reproduzca eficazmente la HIV en PE, permitiendo así analizar la eficacia de un tratamiento que permita prevenir el desarrollo de la PC de origen hemorrágico (PCOH).

El Cannabidiol (CBD), uno de los principales componentes del *Cannabis sativa*, es un fitocannabinoide que ha demostrado tener un importante papel neuroprotector en modelos de daño cerebral neonatal hipóxico-isquémico focal y difuso. Este efecto se basa al menos en parte en sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiexcitatorias, gracias a la activación de los receptores de activación de proliferación de peroxisomas (PPAR) o serotoninérgicos 5HT-1A, entre otros mecanismos. El tratamiento con este fármaco en roedores y cerdos recién nacidos ha logrado evitar las secuelas del daño cerebral con tal eficacia que hoy en día se encuentra en las primeras fases de ensayos clínicos.

En este contexto, la **HIPÓTESIS** de este trabajo es que el tratamiento con CBD en ratas PND 1 a las que se indujo una HIV mediante la inyección paraventricular de *Colagenasa de Clostridium* tendrá un efecto neuroprotector, evitando el desarrollo de secuelas similares a las que configuran la PCOH en los PE.

Para desarrollar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Desarrollar y caracterizar un nuevo modelo animal que reproduzca la fisiopatología y manifestaciones clínicas de la PCOH en el EBPN mediante la inyección paraventricular de *Colagenasa de Clostridium*.
2. Determinar si el tratamiento con el fitcannabinoide CBD evita el desarrollo de un cuadro similar a la PCOH. Para ello, este fármaco se administrará tras la inducción del daño (en

una o tres dosis), prenatalmente o combinando ambas estrategias. Posteriormente se determinará cuál es la mejor forma de tratamiento.

3. Caracterizar los mecanismos por los que el fitocannabinoide CBD ejerce su efecto neuroprotector en este modelo animal.

Los resultados obtenidos en el **DISEÑO EXPERIMENTAL 1**, nos muestra que la administración de 0,2 U de *Colagenasa de Clostridium* en ratas PND 1 produjo un sangrado de volumen variable que se mantuvo a lo largo del tiempo. Este daño produjo secuelas motoras y cognitivas tanto a medio (PND 14) como a largo (PND 45) plazo. Al igual que en el ser humano, se demostró que este deterioro funcional se debía a la afectación en el desarrollo y supervivencia de los estadios madurativos más tempranos del linaje oligodendroglial, alterando finalmente la mielinización y la integridad de la sustancia blanca (SB).

Por otro lado, los estudios de neuroimagen y western blot (WB) demostraron que a corto plazo (PND 6), los animales lesionados presentaron un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) como consecuencia principalmente del descenso de los niveles del receptor *Mfsd2a*, uno de los principales integrantes del desarrollo de esta estructura, y el aumento de mediadores de daño endotelial como la metaloproteasa 9 (MMP-9). Como consecuencia de esta disfuncionalidad, se produjo un incremento de la infiltración de macrófagos y reclutamiento de células microgliales, así como la potenciación de la evolución de ambos hacia un fenotipo proinflamatorio (M1). Además, los elevados niveles del metabolito Mioinositol sugieren la existencia de una disfunción en los astrocitos, uno de los principales tipos celulares que en condiciones patológicas modula el daño citotóxico.

En este mismo periodo se produjo un aumento de la oxidación proteica (resultado del estrés oxidativo), en los niveles de Glutamato (lo que se traduce en un aumento de la excitotoxicidad) y de Lactato (lo cual indica daño tisular). Del mismo modo, también se observó un aumento en los niveles de expresión de varios integrantes de la vía proinflamatoria del receptor tipo *toll 4* (TLR-4), entre el que destaca la liberación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), citoquina de gran interés en numerosas enfermedades neurovasculares. Adicionalmente, observamos como las secuelas y el daño producido era independiente del volumen de hemorragia, confirmándose así los últimos estudios descritos en pacientes.

Por otro lado, para llevar a cabo el **DISEÑO EXPERIMENTAL 2**, inicialmente evaluamos el papel neuroprotector del CBD administrado 6 h después de la lesión. Al igual que en otros modelos de daño cerebral adquirido neonatal, este fitocannabinoide fue capaz de evitar parte de las

secuelas reduciendo la inflamación a largo plazo, especialmente cuando el tratamiento se mantuvo durante tres días, aunque no ejerció ningún efecto beneficioso sobre el daño en la SB.

Para evaluar si el tratamiento prenatal con CBD mejoraba los resultados obtenidos hasta el momento, en primer lugar, se determinó la dosis por la que el CBD administrado a ratas gestantes a E21 alcanzaba concentraciones en el cerebro de las crías consideradas como neuroprotectoras (según estudios realizados previamente en nuestro grupo). La dosis fue de 10 mg/kg, cuya administración 24 h antes del parto redujo el daño en la SB aunque solo evitó parcialmente las secuelas secundarias a la HIV. Finalmente, se estudió el efecto de administrar el CBD de forma combinada prenatalmente y después del daño, obteniéndose un efecto óptimo en la reducción del daño cerebral, incluyendo la SB, y en evitar el desarrollo de secuelas.

Por todo ello, en el **DISEÑO EXPERIMENTAL 3** se estudiaron los mecanismos mediante los cuales el CBD administrado de forma combinada ejercía sus efectos neuroprotectores. El tratamiento con este fitocannabinoide fue capaz de evitar el aumento de la permeabilidad de la BHE a corto plazo, así como la infiltración leucocitaria y la disfunción astrocitaria. Como consecuencia de ello, se redujo la neuroinflamación, al menos en parte por la promoción de la evolución de los macrófagos y microglía hacia un fenotipo M2, así como el estrés oxidativo y la excitotoxicidad. Estos efectos se mantuvieron activos a lo largo del tiempo, lo que permitió proteger el linaje oligodendroglial durante todo el desarrollo madurativo, resultando en la preservación del proceso de mielinización.

En **CONCLUSIÓN**, en este trabajo se ha desarrollado un modelo animal que reproduce eficazmente la fisiopatología y consecuencias de la HIV en PE, lo que lo hace eficaz para identificar dianas terapéuticas sobre las que basar un tratamiento para la enfermedad. En este modelo, la administración prenatal y postlesional de CBD redujo el daño secundario a la HIV, preservando la integridad de la SB y evitando el desarrollo de secuelas motoras y cognitivas, modulando inflamación, excitotoxicidad y estrés oxidativo, y preservando la función de la BHE. Estas propiedades neuroprotectoras del CBD le postulan como un buen candidato a la hora de prevenir la PCOH, una enfermedad de gran incidencia y gravedad que hoy en día carece de tratamiento.

# ABSTRACT

Cerebral palsy (CP) is the most severe and frequent disabling disease in childhood, including motor, cognitive and sensorial sequelae. Studies on CP causes are difficult because of its multifactorial etiology. Anyway, low gestational age and/or birth weight are major determinants of CP. Extreme preterm (EP) and extreme low birth weight (ELBW) newborns are those under 25 weeks of gestational age and 1000 g of birth weight, respectively. Due to the immaturity of central nervous system (CNS) in those babies, both EP and ELBW have been considered of highest risk to develop CP. An important factor explaining such a high risk is the high incidence of intraventricular hemorrhage (IVH) in those patients. IVH is the most common type of cerebral hemorrhage in newborns and a major cause of white matter injury (WMI) and then of CP development. HIV in PE usually results from the spontaneous rupture of vessels present at the germinal matrix (GM), the structure where growing and then migration of neuronal and oligodendroglial progenitors takes place during brain development. The high oxygen and metabolic demand together with the extreme fragility of vessels make GM a structure highly vulnerable to damage as a consequence of postnatal stimuli. Thus, blood pressure instability typical from EP and ELBW together with the immature autoregulation and fragility and high activity of the MG makes HIV a frequent complication in those babies.

Advances in neuroimaging techniques have made possible to link short- and long-term prognosis after HIV to the volume and location of bleeding. Thus, HIV is classified into 4 different grades depending on whether it is limited to the GM (grade I), extended into the lateral ventricles without (grade II) or with dilation (grade III), or affecting the brain parenchyma (grade IV). In particular, post-hemorrhagic ventricular dilatation (PHVD), thought to highly increase the risk of developing CP after HIV. Was classically associated to grades III and IV. However, recent clinical studies indicate that even milder grades of injury increase the risk of CP development.

Despite its high incidence, socioeconomic costs and emotional and health impact, there is no current treatment to prevent CP of hemorrhagic origin (CPHO). A determinant factor for this situation is the lack of an experimental model effectively reproducing that condition. Usually, models based on the injection of glycerol or autologous blood have been used in PND 1 and PND 7 animals, but they have failed to reproduce the effects of spontaneous rupture of GM vessels.

Such effects can be reproduced with paraventricular injection of *Chlostridium collagenase*, an enzyme breaking the extracellular matrix at the GM. However, this model has only been performed so far in PND 7 rats, whose neurodevelopmental stage is equivalent to that of a full-term infant. Implementing this model in PND 1 rats, with a neurodevelopmental stage similar to that of EP, would offer the possibility of an experimental model effectively reproducing HIV-induced brain damage in EP, which could make feasible to test the efficacy of treatments aiming to prevent the development of CPHO.

In this regard, Cannabidiol (CBD), one of the main components of *Cannabis sativa*, exerts neuroprotective effects in different models of diffuse and focal hypoxic-ischemic immature brain damage. CBD neuroprotection is related with anti-inflammatory, antioxidant, and anti-excitatory effects, due to mechanisms including the activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) or serotonergic 5HT-1A receptors, among others. Treatment with this drug in newborn rodents and pigs has been as effective in preventing brain damage-induced sequelae as to prompt the start of an ongoing clinical trials.

The **HYPOTHESIS** of the present work is that CBD treatment in PND 1 rats in which HIV was induced by paraventricular injection of *Chlostridium collagenase* will result in neuroprotective effects thus preventing the development of sequelae similar to those conforming the spectrum of CPHO in EP.

To confirm that hypothesis, we set out the following **OBJECTIVES**:

1. To evaluate the pathophysiological events, neuroanatomical consequences, and motor and cognitive sequelae produced after HIV induction in PND 1 rats.
2. To determine the most effective form of CBD treatment, comparing inflammatory activity, White Matter (WM) damage and neurobehavioral sequelae in animals treated with this phytocannabinoid administered prenatally, post-insult or both.
3. To study the mechanisms by which CBD exerted its neuroprotective effect.

Results obtained in **EXPERIMENTAL DESIGN 1** show that paraventricular injection of 0.2 U of *Chlostridium collagenase* in PND 1 rats led to bleeding of diverse volumes which was maintained over time. That damage led to motor and cognitive sequelae in the middle (PND 14) and long (PND 45) term. As described in humans, the functional impairment was associated to the impairment of development and survival of the earliest mature stages of the oligodendroglial lineage, eventually leading to myelination impairment and WM integrity disturbance.

Neuroimaging and western blot (WB) studies demonstrated that in the short term (PND 6), HIV animals showed increased blood-brain barrier (BBB) permeability in a manner linked to decrease of Mfsd2a receptor levels, one of the main components of the development of this structure, and the increase of the expression of mediators of endothelial damage such as metalloprotease 9 (MMP-9). As a consequence, there was an increase in macrophage infiltration and microglial cell recruitment, as well as the enhancement of the derivation of both type of cells to a proinflammatory phenotype (M1). Besides, elevated levels of the metabolite myoinositol suggested the presence of astrocyte dysfunction, cells playing a key role in modulating cytotoxic damage in pathological conditions.

In this context, we observed an increase in protein oxidation (a result of oxidative stress), glutamate (which translates into an increase in excitotoxicity) and lactate levels (indicating tissue damage). We also described an increase in the expression of several factors belonging to the Toll-like receptor 4 (TLR-4) proinflammatory pathway, including the release of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a cytokine of great interest in numerous neurovascular diseases. Besides, we observed that the sequelae and the damage produced were not dependent on HIV volume, thus reproducing clinical data from the latest studies.

To carry out the **EXPERIMENTAL DESIGN 2**, we firstly evaluated the neuroprotective role of CBD administered 6 h after injury. As in other models of acquired immature brain damage, this phytocannabinoid, particularly when administered for three days, reduced the development of sequelae by decreasing long-term inflammation, but with no beneficial effect on WM damage. To evaluate then whether prenatal treatment with CBD would improve the results obtained before, we first determined the dose by which CBD administered to pregnant rats at E21 could reach fetal brain concentrations considered as neuroprotective according to studies previously conducted in our group. Such dose was 10 mg/kg administered 24 h before delivery. Prenatal administration of CBD reduced WM injury but had only partial beneficial effects on the development of neurobehavioral disturbances. Finally, combining prenatal and post-insult administration of CBD resulted in optimal neuroprotective effects, reducing brain damage and preventing WM injury and neurobehavioral sequela development.

In the **EXPERIMENTAL DESIGN 3**, we studied the mechanisms by which combined prenatal and post-insult administration of CBD resulted in such a robust neuroprotective effect. CBD prevented short-term increase in BBB permeability, as well as leukocyte infiltration and astrocyte dysfunction. This resulted in the modulation of neuroinflammation, at least in part through promoting the shift of macrophages and microglia towards an M2 phenotype, as well

as oxidative stress and excitotoxicity reduction. The neuroprotective effects were maintained over time, protecting oligodendroglial cell maturation and thus allowing an appropriate myelination process.

In **CONCLUSION**, in the present work we developed an animal model effectively reproducing the pathophysiology and consequences of IVH in EP, getting thus a valuable tool to identify new therapeutic targets in which to rely new therapeutic strategies. In this model prenatal and post-insult administration of CBD reduced IVH-induced brain damage, preserving WM integrity and thus preventing the development of motor and cognitive sequelae, in a manner related to the modulation of inflammation, excitotoxicity and oxidative stress and the preservation of BBB integrity. Such neuroprotective properties postulate CBD as a promising candidate for the prevention of CPHO, a disease of high incidence and severity with no effective treatment nowadays.

The background features abstract, overlapping teal and light green geometric shapes that create a sense of depth and movement. The shapes are primarily triangular and quadrilateral, with varying opacities that allow some to appear behind others.

# **INTRODUCCIÓN**



# LA PARÁLISIS CEREBRAL INFANTIL

## ***Aspectos Generales***

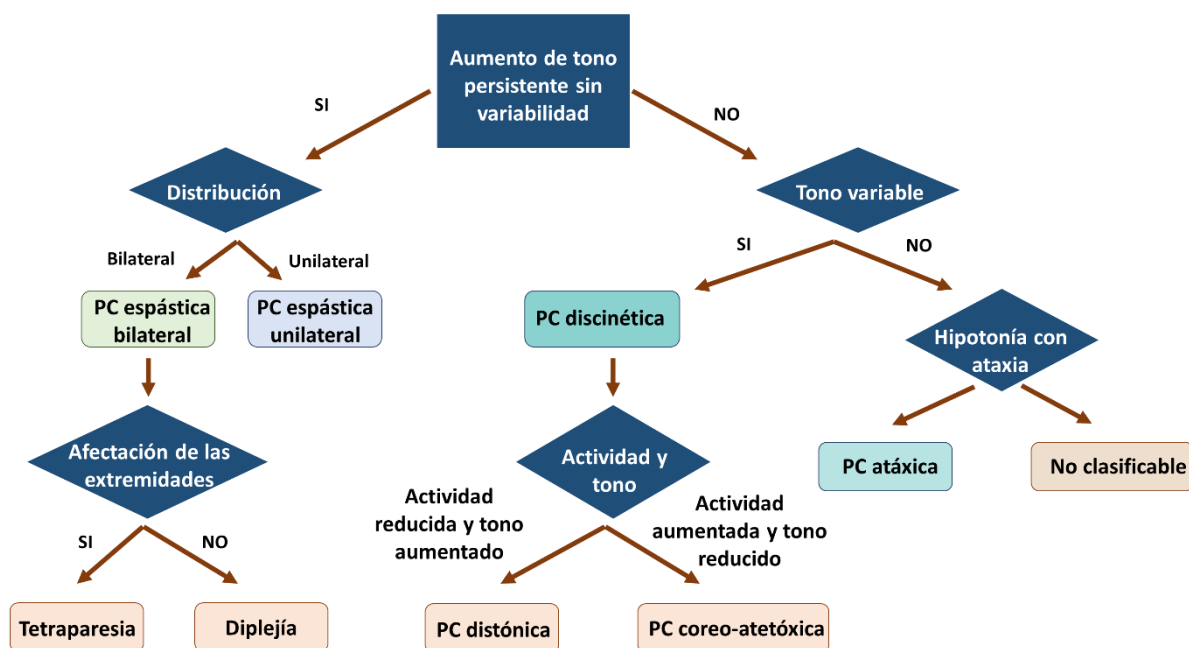
### Definición

El estudio de enfermedades como el ictus (o *stroke*, según el término en inglés universalmente utilizado), el cáncer o el Alzheimer suelen ser habituales debido al gran impacto socioeconómico y sanitario que estas producen. No obstante, existen otros trastornos menos conocidos como la **Parálisis Cerebral Infantil (PCI)** cuyas consecuencias son trascendentales<sup>1,2</sup>. Se define como PCI a un conjunto de trastornos no progresivos de tipo postural y motor cuyo origen se centra en el Sistema Nervioso Central (SNC)<sup>3,4</sup>. Además, según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), la presencia de otras secuelas como la epilepsia, trastornos auditivos y visuales o un evidente deterioro cognitivo, hacen que su gravedad se vea incrementada<sup>3,4</sup>. Debido al escaso conocimiento de su fisiopatología y la ausencia de un tratamiento eficaz, la **PCI de origen hemorrágico (PCOH)** ha sido el objeto de estudio en este trabajo.

### Clasificación y factores de riesgo en la PCI

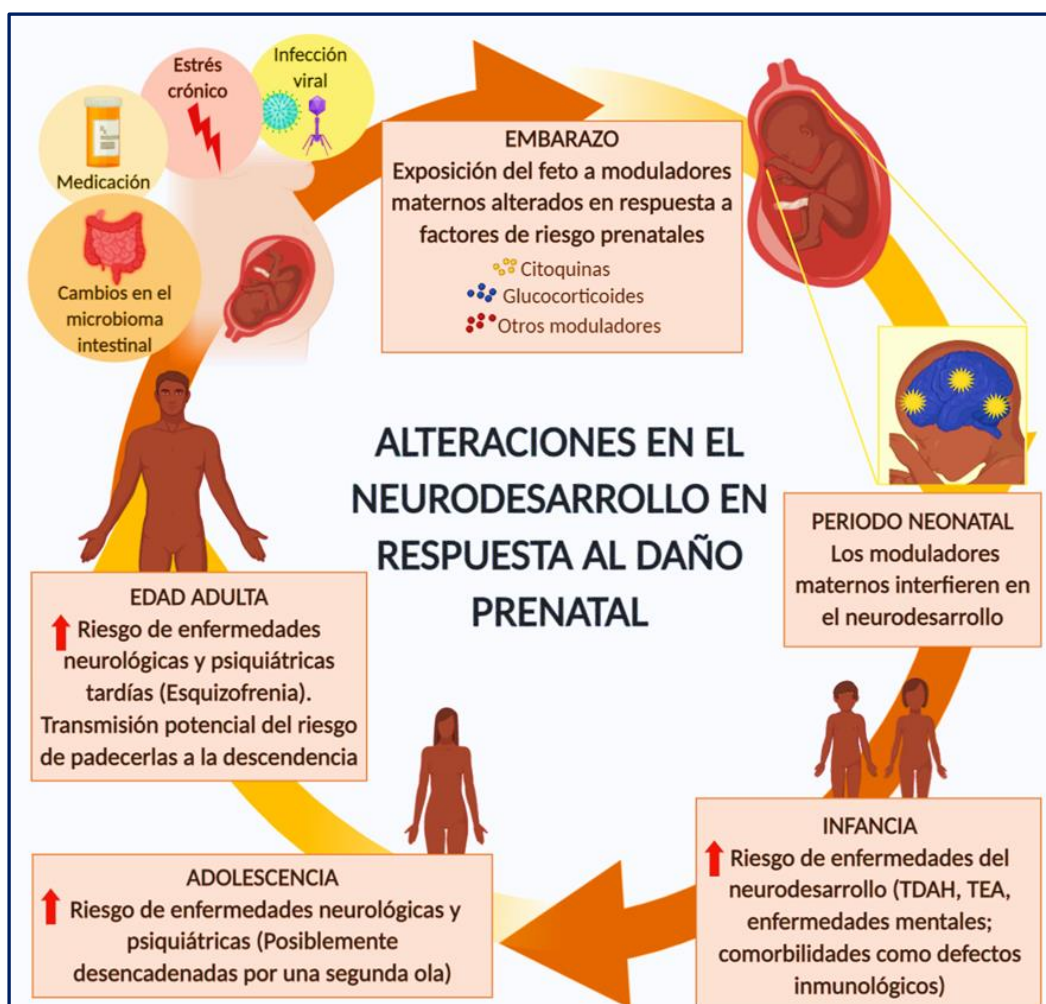
A pesar de ser un trastorno estudiado desde hace cientos de años, la heterogeneidad y complejidad en la etiopatogenia, sumado a la ausencia de unos criterios fijos de diagnóstico, ha impedido llevar a cabo una categorización fiable y objetiva de la PCI<sup>1,5</sup>. Una de las clasificaciones más aceptadas fue la establecida por **Minear (clasificación tradicional)** en 1956, la cual, en función de los aspectos estudiados, agrupa esta patología en varias categorías. En este sentido, la PCI se puede clasificar según su **fisiología**, es decir, define la naturaleza del trastorno motor y postural<sup>6</sup>; **topográfica**, la cual permite localizar las extremidades afectadas; **suplementaria**, la cual hace referencia a otras secuelas diferentes a las motoras; **etiológica**, proporcionando información acerca del origen de la PCI; **neuroanatómica**, lo que nos permite acceder a las posibles alteraciones estructurales del SNC; **terapéutica**, centrada en la búsqueda un tratamiento eficaz; y **funcional**, lo que nos permite agrupar a los individuos en función del grado de limitaciones en las habilidades que presentan<sup>1,5,7,89-111,12</sup>.

Debido a la ambigüedad en estas definiciones y clasificaciones establecidas, recientemente se ha instaurado un sistema de clasificación que permite categorizar de forma más objetiva y fiable la PCI <sup>5,7,13</sup>. Más allá de la propuesta por la Agencia de Vigilancia Europea (del inglés SCPE) (**Fig. 1**), la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** propone un nuevo sistema de agrupación tratando de seguir el modelo de **Clasificación Internacional del Funcionamiento, de la Discapacidad y de la Salud (CIF)**, cuya principal novedad es tratar la PC desde un punto de vista biopsicosocial, en el que la salud y el contexto (factores ambientales, personales, etc.) están íntimamente relacionados <sup>5,14,14</sup>. En este sentido, se describen cuatro sistemas: **sistema de clasificación de según la función motora gruesa (GMFCS, por sus siglas en inglés)**, la cual hace referencia a la capacidad del individuo de iniciar el movimiento <sup>5,13</sup>; **sistema de clasificación según la habilidad manual (del inglés, MACS)**, referida a las destrezas manuales finas <sup>5,15,16</sup>; **sistema de clasificación según la función comunicativa (del inglés, CFSC)** <sup>5,17</sup>; y **sistema de clasificación para la capacidad de Comer y Beber (del inglés, EDACS)**, el cual permite clasificar la **seguridad** (textura y fluidos que un paciente puede ingerir sin riesgo) y **eficacia** (velocidad de masticación o cantidad de pérdida del alimento) con la que un paciente se alimenta <sup>5,18</sup>.



**Figura 1.** Algoritmo utilizado para clasificar el subtipo de PCI según la *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe* (del inglés, SCPE). El principal objetivo de esta clasificación es llevar a cabo una categorización de la PCI según las extremidades y el tipo de alteración motora encontrada.

Una adecuada categorización de la PCI no solo permite la búsqueda de terapias que mejoren el día a día del paciente, sino que posibilita la identificación de los factores de riesgo (que pueden actuar antes, durante y después del parto) que aumentan la probabilidad de sufrir este trastorno (Fig. 2)<sup>19</sup>. Entre los principales factores de riesgo relacionados directamente con la etiología y desarrollo de la PC infantil destacan la **asfixia**<sup>20,21</sup>, la **presencia de malformaciones congénitas**<sup>19</sup>, **infecciones**<sup>22-24</sup>, **stroke** o la **presencia de traumatismos craneales (TBI del inglés)**<sup>25-27</sup>. Otros factores de riesgo indirecto son la **reproducción asistida y la fecundación *in vitro***<sup>28-31</sup>. Además, existen otros factores como el **género del individuo** (es más común en varones) o la existencia de **problemas maternos en la coagulación**<sup>32</sup>. No obstante, los dos factores de riesgo más importantes a la hora de explicar la etiología de esta enfermedad son la **prematuridad y el peso del recién nacido (RN)**, ambos íntimamente relacionados<sup>19</sup>.



**Figura 2. Alteraciones en la madre durante el embarazo pueden afectar al correcto neurodesarrollo del individuo.** Tanto las alteraciones prenatales como las afectaciones en los sistemas inmune y endocrino de la madre pueden alterar el neurodesarrollo posnatal del individuo y aumentar el riesgo de sufrir PCI. *Adaptado de Schepanski et al. 2018*

## Parálisis cerebral en el prematuro extremo y de muy bajo peso

### La prematuridad y el bajo peso del recién nacido

La OMS define un nacimiento **prematuro** o pretérmino como aquel que se produce antes de la semana 37 de gestación, considerándose el inicio de esta como la última menstruación de la mujer <sup>33,34</sup>. Por otro lado, se considera un **RN de bajo peso (RNBP)** aquel que presenta un peso inferior a 2500 gramos durante la primera hora después del parto <sup>35,36</sup>. Aunque generalmente se ha considerado a un niño prematuro aquel que presenta un peso inferior a 2500 g, nuevos informes de la OMS demostraron que la edad gestacional (EG) es un marcador más fiable <sup>37,38</sup>. Tanto la EG como el peso del RN son un **valioso marcador de salud materna, nutrición, atención médica y pobreza**, de forma que la presencia de estos aumenta la mortalidad del individuo, la existencia de discapacidades como las neurológicas y un rendimiento académico deficiente siendo hasta 20 veces menor en comparación con un RN aparentemente sano (**Tabla 1**) <sup>39</sup>.

<b>PRINCIPALES PROBLEMAS ASOCIADOS AL BAJO PESO AL NACER</b>		
<b>Órgano o sistema afectado</b>	<b>Problemas a corto plazo</b>	<b>Problemas a largo plazo</b>
<b>Pulmonar</b>	Síndrome de estrés respiratorio, apnea del prematuro, displasia broncopulmonar	Asma, displasia broncopulmonar
<b>Gastrointestinal</b>	Intolerancias alimentarias, hiperbilirrubinemia, enterocolitis necrotizante	Síndrome del intestino corto, colestasis
<b>Inmunológico</b>	Deficiencia inmunitaria e infecciones	Bronquiolitis
<b>SNC</b>	Hemorragia intraventricular y Leucomalacia periventricular	Parálisis cerebral, retraso mental, hidrocefalia
<b>Oftalmológicos</b>	Retinopatía del prematuro	Ceguera, miopía, estrabismo
<b>Cardiovascular</b>	Hipotensión e hipertensión pulmonar	Hipertensión
<b>Renal</b>	Desequilibrio osmótico	Hipertensión
<b>Hematológico</b>	Anemia y necesidad de transfusiones	-
<b>Endocrinos</b>	Hipoglicemia y deficiencia de cortisol	Resistencia a la insulina

Tabla 1. Lista principales secuelas a corto y largo plazo como consecuencia de la prematuridad y del extremado bajo peso del RN.

A pesar de la existencia de diferentes técnicas utilizadas para calcular la EG (ecografía, último día de periodo menstrual, etc.), la disparidad en los límites de la viabilidad del individuo y la capacidad sanitaria en los distintos países ha hecho necesario clasificar a los individuos con el

objetivo de: conocer las causas, identificar poblaciones de riesgo, implementar estrategias de prevención, facilitar la vigilancia de los nacimientos y de comparar datos locales e internacionales con el menor sesgo posible <sup>40</sup>. En este sentido, existe una clasificación típica basada en la EG que nos permite agrupar a los prematuros en: **prematuros extremos (PE)**, cuya EG comprende el periodo entre las semanas 23 a 25; **grandes prematuros**, cuya EG está entre la semana 26 y 33; y los **prematuros tardíos**, cuya EG varía entre la semana 34 y 36 <sup>33,37,40</sup>. No obstante, en ocasiones existe cierta dificultad a la hora de llevar a cabo esta clasificación, principalmente debido a la presencia de ciertos factores como la región en la que se produce el nacimiento, el periodo en el que se realiza el diagnóstico, o la ausencia de una causalidad evidente de prematuridad <sup>40</sup>.

Al igual que en la prematuridad, el RN también puede categorizarse en función del rango de peso en el que se encuentra en el momento del nacimiento. De esta forma, a aquellos neonatos que tienen un peso entre 500 y 1000 g se les considera como **de extremado bajo peso al nacer (EBPN)**, a los que se encuentran en un rango de 1000 a 1500 g se les denomina **nacimientos de muy bajo peso (NMBP)** y a los neonatos con un peso de 1500 a 2500 son conocidos como **de bajo peso al nacer (BPN)** <sup>41</sup>.

Desafortunadamente, debido a la ausencia de un seguimiento regular durante el embarazo de las mujeres, la escasez de recursos sanitarios o el elevado número de partos, se estima que los países con mayor número de nacimientos extremos por lo general son aquellos que se encuentran en vías de desarrollo (particularmente en zonas rurales de África y Asia) (**Fig. 3**) <sup>42,43</sup>.

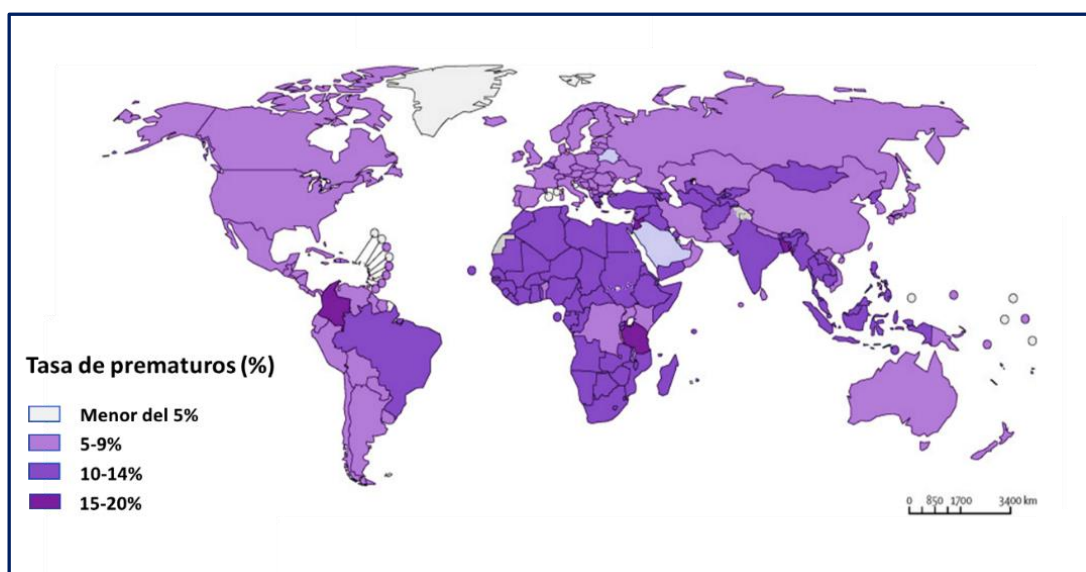


Figura 3. Mapa demográfico sobre los países con mayor porcentaje de casos de embarazos prematuros. Obtenido de Chawanpaiboon et al. 2018

### Cuadro 1: ¿Los BPN, causa de la prematuridad o de las restricciones intrauterinas?

Con relación al peso del neonato, se han establecido dos términos que, aun siendo diferentes, sus definiciones tienden a considerarse como sinónimos. Por un lado, encontramos los RN catalogados como “Pequeños para su EG” (PEG), que define aquellos niños cuyo peso y/o longitud es inferior al 10º percentil. Por otro lado, aparecen los nacimientos con “Restricción en el crecimiento intrauterino (CIR)”, definidos como aquellos que han sufrido eventos que comprometen y limitan el potencial crecimiento intrauterino del feto<sup>35</sup>. Por lo tanto, los BPN pueden ser el resultado de un nacimiento prematuro, pero también de la restricción del crecimiento fetal, es decir, ser PEG.

Como se ilustra en la **Figura 4**, estos indicadores pueden superponerse; es decir, un BPN puede ser prematuro y PEG; sin embargo, no son intercambiables, ya que su etiología y factores de riesgo son distintos. Entre los BPN, aproximadamente dos tercios nacen prematuros, mientras que menos del 20% de los bebés PEG nacen prematuros.

A pesar de esta estrecha relación, se ha demostrado que la prematuridad tiene un pronóstico significativamente más grave<sup>42,44</sup>. De esta forma, aquellos prematuros que presentan un peso menor a 1500 g, tendrán mayor de riesgo de sufrir trastornos en el desarrollo como la PCI, y por tanto de mayor gravedad<sup>45</sup>. Por otro lado, aquellos BPN relacionados con la CIR, tienen mayor riesgo de sufrir alteraciones en el crecimiento que pueden ser permanentes, o enfermedades crónicas presentes en la edad adulta, incluida la hipertensión, la diabetes tipo 2 y la enfermedad coronaria<sup>42</sup>.

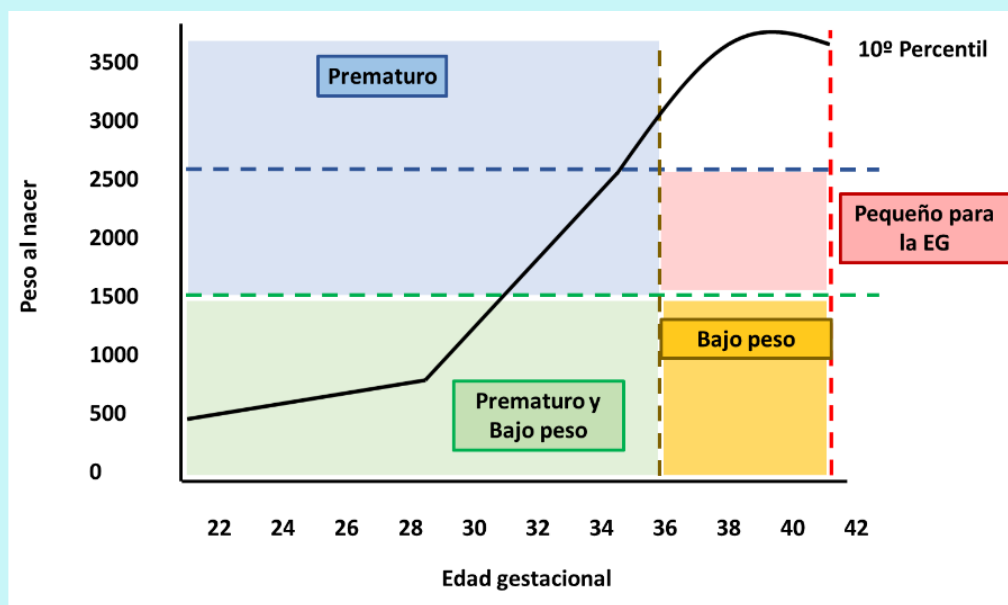
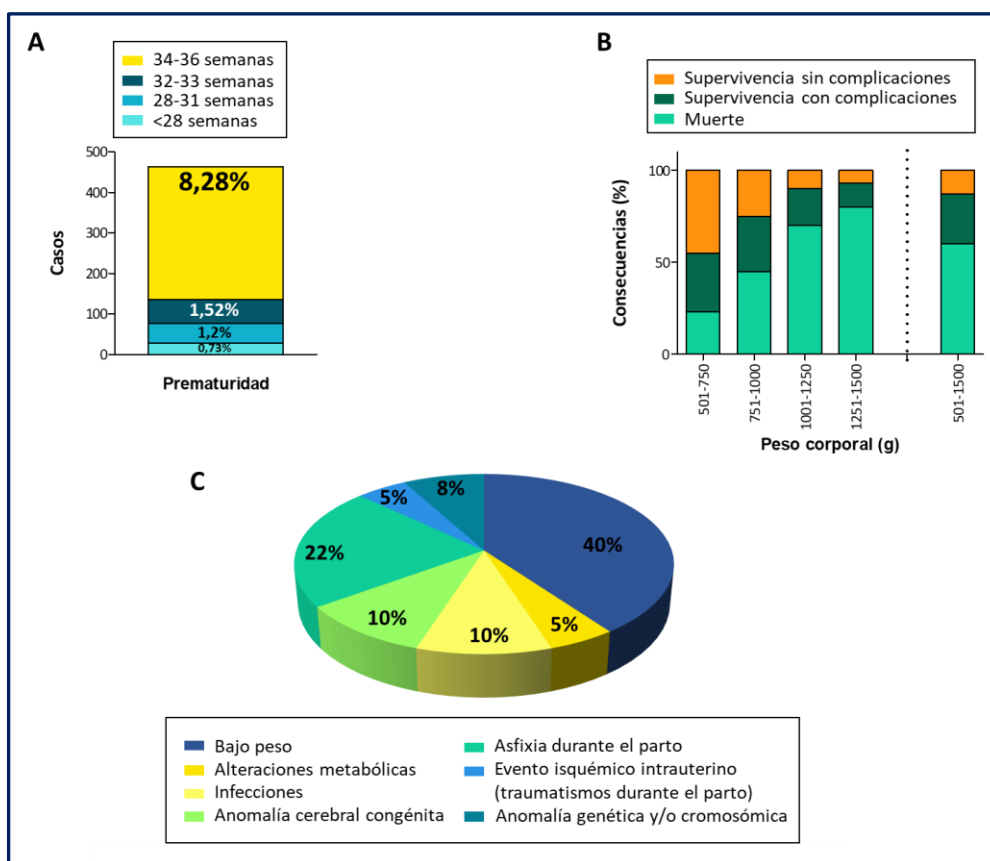


Figura 4. Comparación de prematuro (<37 semanas de gestación), bajo peso al nacer (<2500 gramos) y PEG (menos del percentil 10º de peso al nacer). Adaptado de Alexander et al. 2007

## El impacto de la prematuridad y el bajo peso del recién nacido

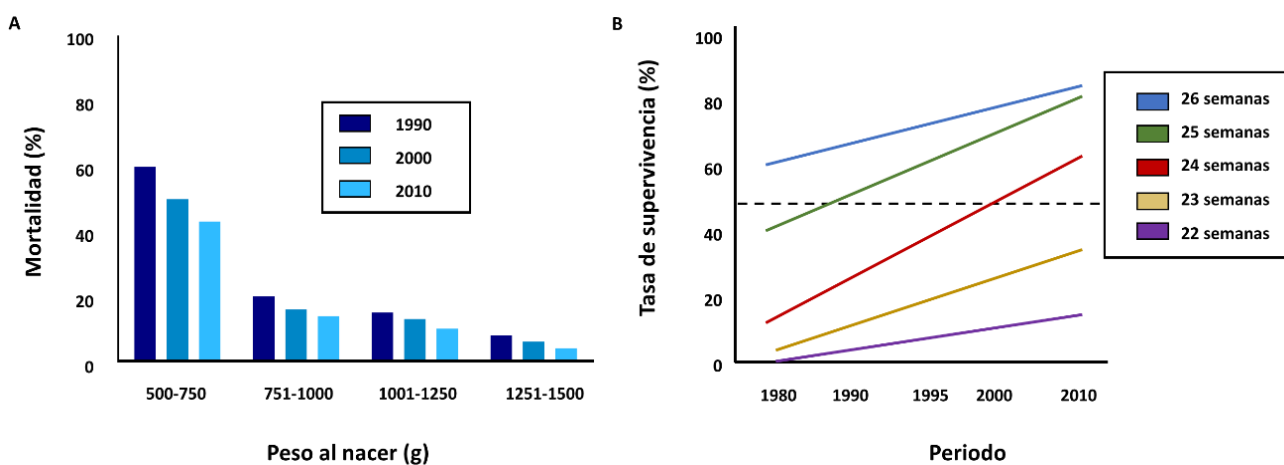
Como ya hemos mencionado, la prematuridad y el bajo peso son la principal causa de la mortalidad y morbilidad infantil <sup>39,46,47</sup>. Dado que los MBPN y los muy prematuros constituyen aproximadamente el 1-3% de los nacimientos totales (**Fig. 5A**), se estima que cada año alrededor de 7 millones de niños morirán o tendrán secuelas invalidantes de por vida por esas causas <sup>39,46,47</sup>. Por este motivo, es de gran importancia agruparlos o clasificarlos en categorías diferentes en función del grado de peso o prematuridad, y de este modo invertir más tiempo y recursos en los casos más vulnerables <sup>46,48</sup>. Por ejemplo, se estima que aproximadamente un 70-100% de los nacimientos catalogados como extremos la tasa de mortalidad y comorbilidades asociadas es tres veces superior que en el grupo más moderado (**Fig. 5B**) <sup>46,48</sup>.



**Figura 5. (A) Gráfica del porcentaje de casos prematuros extremos.** Aproximadamente un 2% de los nacimientos totales se producen antes de la semana 30 de gestación. **(B) Gráficas del porcentaje mortalidad y morbilidad según el peso del RN.** **(C) Porcentaje de casos de PCI a causa de la inmadurez del RN**

De manera particular, se ha demostrado que cuanto más extremo sea el RN, mayor será la probabilidad de desarrollar trastornos neurológicos como la PCI <sup>47,49</sup>. En el caso de la **prematuridad**, se estima que el 20% de los PE que sobreviven podrían sufrir este trastorno; no obstante, se ha observado que en cada semana que se prolongue el parto, la probabilidad de

desarrollarla y la gravedad de sus secuelas se reducen significativamente (**Fig. 5C**)<sup>49</sup>. De esta forma, aquellos niños que nacen entre la semana 27 y 32, tienen una probabilidad de hasta 2-3 veces menor de sufrir PCI que los PE<sup>50</sup>. De la misma forma, se ha descrito que la supervivencia y las complicaciones a corto y largo plazo de los **EBPN** mejoraban a medida que aumentaba el peso del RN<sup>47,51</sup>. En este sentido, mientras que entre el 50-80% de los casos de EBPN no sobreviven o presentan secuelas invalidantes de por vida, cuando el RN supera los 1000 g de peso este porcentaje se reduce al 10%<sup>47,51-55</sup>. Por lo tanto, los neonatos que nacen en los límites de la viabilidad (semana 23 o peso de 500 g) son el grupo con peor pronóstico en la clínica (**Fig. 6**)<sup>52</sup>.



**Figura 6.** Gráfica representativa de la incidencia en la mortalidad neonatal según el peso del RN (A) y la EG (B). A lo largo de los años, los avances sanitarios han permitido reducir de forma significativa la mortalidad de los RN, lo que por el contrario ha producido un aumento de secuelas como la PCI infantil. *Adaptado de Isayama et al. 2019*

El creciente número de nacimientos prematuros y de bajo peso es la principal razón por la que la incidencia global de PCI no se haya reducido a lo largo del tiempo, siendo actualmente un problema de salud de primer orden<sup>3,56,57</sup>. Las consecuencias de la PCI comprometen no solo el desarrollo pleno del niño afectado, sino también las posibilidades socioeconómicas de su familia y, por ende, de la sociedad. De esta forma, en 2002 se calculó que el cuidado de los pacientes con PCI en USA adquirió un coste de cerca de 8.200 millones de dólares<sup>3</sup>. Debido a una evaluación excesivamente precoz de los pacientes (se ha sugerido que las pruebas neuroconductuales que permiten evaluar al niño se lleven a cabo a los 6 años, y no a la edad de 2 años como se hace a día de hoy<sup>49,50</sup>), así como la escasez de datos en países en vías de desarrollo (que son los lugares con mayor número de casos prematuros demográficamente hablando) se estima que el número de RN afectados por esta patología y que no han sido adecuadamente identificados podría llegar a ser hasta un 25% superior a los datos que

conocemos. En este sentido, con el objetivo de reducir los casos y de abordar sus complicaciones de una manera más efectiva, es necesario conocer las particularidades que presentan estos niños en comparación con aquellos que presentan un desarrollo natural.

## Vulnerabilidad del cerebro inmaduro

La estructura, morfología y funcionalidad del cerebro del PE y de los EBPN son muy distintos en comparación con los de los RN a término. El ambiente intrauterino presenta unas condiciones ambientales que permiten el correcto control e interacción de las estructuras y elementos biomoleculares que integran el SNC, y la ausencia de esta puede comprometer su funcionamiento y desarrollo<sup>58</sup>. Durante las primeras semanas de embarazo, los progenitores neuronales se diferencian y se extienden siguiendo un patrón de “dentro hacia fuera” a las diferentes regiones del cerebro<sup>59,60</sup>. A partir de la semana 16 de gestación, los progenitores neuronales, astrocitarios y oligodendrogliales son especialmente relevantes estableciendo rutas de migración mediante la liberación de factores como el **Factor neurotrófico derivado del cerebro** [del inglés, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)], el **Factor neurotrófico derivado de células gliales** [del inglés, Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)], el **Factor neurotrófico ciliar** [del inglés, Ciliary neurotrophic factor (CNTF)] o el **Factor de crecimiento**

**insulinoide 1** [del inglés, Insulin growing factor 1 (IGF-1)], y/o el gradiente químico formado por las efrinas<sup>59,60</sup>. Por lo tanto, cualquier alteración de estos factores tróficos pueden provocar alteraciones en el desarrollo o en la reparación neuronal una vez se ha producido el daño<sup>59,60</sup>. Finalmente, durante el tercer trimestre de embarazo se producen una serie de eventos que marcarán el resultado final del neurodesarrollo, ya que es en este periodo cuando se producen la diferenciación, maduración y

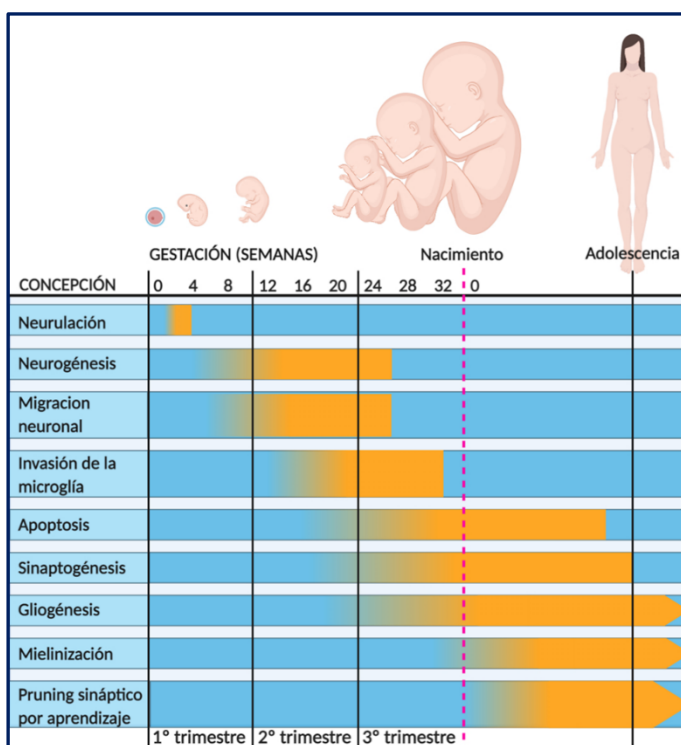


Figura 7. Principales eventos que ocurren durante el desarrollo del cerebro en humanos. Adaptado de Schepanski et al. 2018

migración neuronal hacia las diferentes estructuras del cerebro a través de la glía radial<sup>48,58-61</sup>. A su vez, en este punto temporal se producen procesos apoptóticos, de sinaptogénesis, mielinización y “pruning sináptico” que estabilizarán las distintas conexiones interneuronales y optimizarán la sinapsis nerviosa (**Fig. 7**)<sup>48,58-61</sup>.

### Integrantes del cerebro inmaduro

En el último trimestre de embarazo, periodo que comprende los nacimientos extremos, se encuentran una serie de componentes celulares especialmente relevantes, ya que la alteración de cualquiera de ellos puede causar defectos en la morfología y maduración cerebral, provocando en última instancia el desarrollo de la PCI<sup>2</sup>.

- **Preoligodendrocitos:** el oligodendrocito es el principal componente de la sustancia blanca (SB), región más afectada en la PCI del PE y los EBPN. A partir de la semana 24 de gestación, se produce la maduración oligodendroglial, cuyo objetivo final es la de formar la mielina y envolver al axón optimizando así la transmisión sináptica<sup>2,62</sup>. La función del preoligodendrocito y el oligodendrocito inmaduro (conocidos como Pre-Ols) es envolver al axón para que, una vez hayan madurado, empiece el proceso de formación de mielina<sup>2,62</sup>.

- **Subplaca neuronal:** las primeras neuronas nacidas en el neocórtex son las que forman la llamada capa de la subplaca, estructura que desaparecerá durante el segundo año postnatal<sup>2,62,63</sup>. Esta región localizada en la SB y que alcanza su pico de desarrollo entre la semana 24 y 32 de gestación, tiene la función de actuar como punto de integración sináptico en la vía talamocortical<sup>2,62,63</sup>.

- **Microglía:** la microglía son las células principales del sistema inmunitario del SNC<sup>2,64-66</sup>. Además de esta función, estas células se encargan de regular los procesos de apoptosis, mielinización, “pruning”, desarrollo axonal o vascularización durante el neurodesarrollo<sup>2,64-66</sup>. En particular, la microglía alcanza su pico máximo de actividad en la SB durante la semana 22, de forma que cualquier alteración en la función o fenotipo podría perturbar el desarrollo de la SB<sup>2,64-66</sup>.

- **Axones:** el desarrollo axonal se produce durante el último trimestre de embarazo y el periodo postnatal temprano<sup>2,67,68</sup>. Durante este periodo, la subplaca envía y recibe conexiones de forma continua permitiendo la formación de axones y con ello, el establecimiento de nuevos circuitos neuronales<sup>2,67,68</sup>.

- **Zona subventricular (SVZ, por sus siglas en inglés):** la SVZ es la fuente principal de producción neuronal durante el desarrollo del cerebro. Esta estructura, que desaparecerá al final del periodo gestacional, está formada por los denominados progenitores intermedios, que darán lugar a progenitores neurogénicos y gliales<sup>2,69,70</sup>. En la segunda mitad del periodo gestacional, las SVZ se encarga de la producción del 65% de las neuronas totales, y de iniciar su migración mediante la interacción con la glía radial hacia las capas superiores de la corteza. En cuanto al 35% de las neuronas restantes, estas se originan en la Eminencia Gangliónica (GE, por sus siglas en inglés) migrando posteriormente hacia la SVZ, siguiendo la misma ruta<sup>2,69,70</sup>.

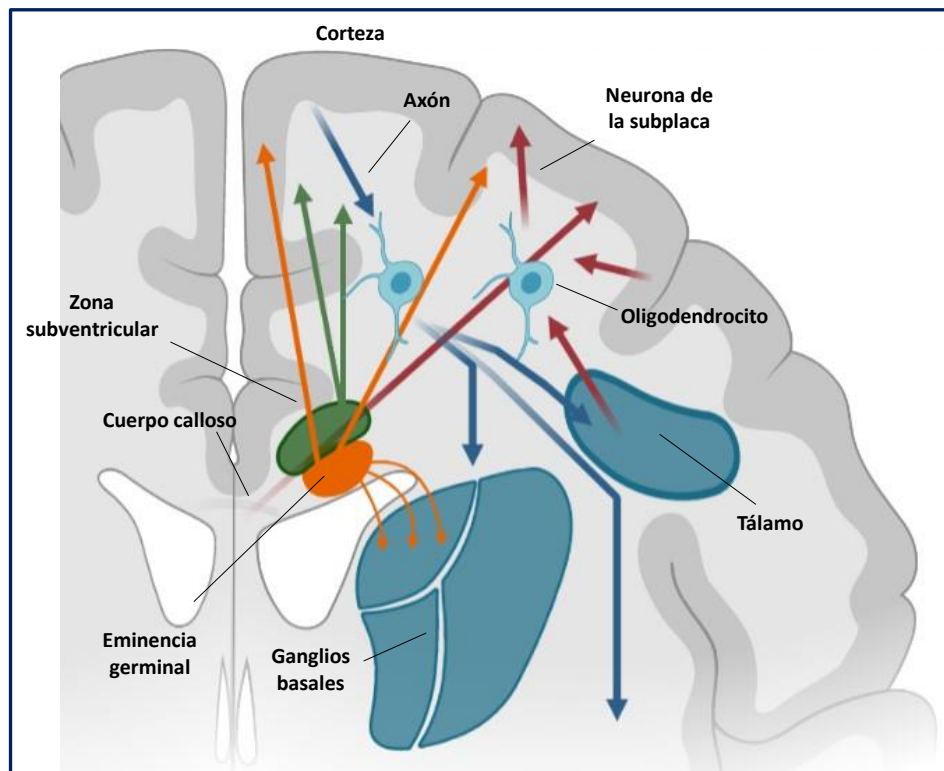
- **Tálamo:** esta estructura producida durante el último trimestre de gestación, se encuentra formada por un conjunto de núcleos y fibras las cuales se encargan de procesar la información sensitiva, motora, memoria y emociones<sup>2,69,70</sup>.

- **Corteza cerebral:** la corteza cerebral o sustancia gris (SG), es una asociación compleja de neuronas que, a través de la circuitería establecida con el tálamo, se encargará de procesar la información sensorial y motora<sup>2,62,69</sup>. Durante el último trimestre de embarazo, se produce un aumento de hasta 4 veces del volumen cortical debido a la diferenciación dendrítica que se produce<sup>2,62,69</sup>.

- **Sinapsis y neurotransmisores:** la formación y eficiencia de las sinapsis neuronales están íntimamente relacionadas con la madurez del cerebro. Esto se debe a que los neurotransmisores (NTs) y sus receptores, en especial los de tipo glutamatérgico, cambian su localización y organización dependiendo del estado madurativo de las neuronas<sup>2,71</sup>. Mientras que los receptores más maduros se centran en la conducción y modulación del calcio optimizando la plasticidad sináptica, los más inmaduros serán incapaces de llevar a cabo esta función debido a sus propiedades funcionales<sup>2,71</sup>.

Como se detalla en la **Figura 8**, la interacción de las estructuras descritas promueve el correcto neurodesarrollo del individuo. Por un lado, observamos como durante la semana 28 de gestación, los axones (rojo) emanan del tálamo, cuerpo calloso (CC) y corteza (CTX), promoviendo la formación de las fibras de proyección, comisurales y asociación respectivamente. Seguidamente, estas **establecerán las primeras sinapsis con las neuronas de la subplaca**. Posteriormente, estas neuronas enviarán axones hacia la corteza promoviendo el desarrollo cortical antes de que las fibras tálamo-corticales y cortico-corticales entren en la corteza. Desde la corteza, los axones (azul) descienden hasta el tálamo, los ganglios basales y los tractos corticospinales (y corticopontina). De forma paralela, los oligodendrocitos

premielinizantes comienzan su diferenciación completa para madurar en oligodendrocitos y **producir finalmente la mielina**. Por otro lado, también se ilustra esquemáticamente la proliferación y migración de interneuronas GABAérgicas desde la SVZ y GE. Las neuronas del SVZ (verde) migran radialmente a la corteza y desde la GE (naranja), tangencialmente y luego radialmente, a la corteza. También se muestra la corriente migratoria de interneuronas de la GE al tálamo dorsal <sup>2,62,63,69,71</sup>



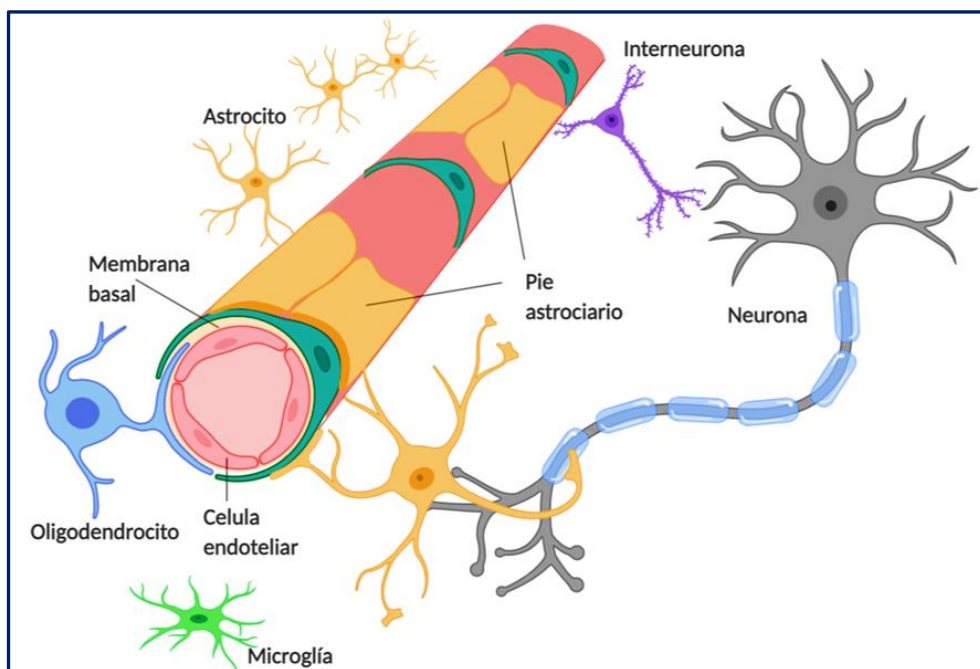
**Figura 8. Cerebro en sección coronal a las 28 semanas de gestación que muestra eventos críticos en el desarrollo cortical.** Formación de las primeras sinapsis neuronales y proliferación y migración de interneuronas GABAérgicas desde la SVZ y la GE. *Adaptado de Volpe 2009*

Cualquier alteración de estos elementos producirá una serie de trastornos madurativos con infinidad de secuelas. A su vez, de forma paralela a la formación y desarrollo de la SG y SB, en este periodo se produce un aumento en el volumen y complejidad de los vasos sanguíneos mediante procesos de vasculogénesis y angiogénesis, promoviendo la anastomosis profunda, que dará lugar a la formación tanto de vasos cortos, encargados de irrigar al parénquima cerebral, como de vasos largos que profundizaran hacia la zona periventricular<sup>48</sup>. Debido a la ausencia de un flujo adecuado en la SB (se estima que solo el 25% del total de la SB está irrigada), la inmadurez de la **Unidad Neurovascular (UNV)** y la **permeabilidad de la Barrera hematoencefálica (BHE)** en los niños nacidos prematuramente, las alteraciones vasculares son frecuentes en este tipo de pacientes <sup>48,58</sup>. En los partos más extremos, la rotura de los vasos o su atrofia estructural es responsable de la alteración de la UNV que, sumado a las alteraciones en

el neurodesarrollo comentadas anteriormente, provocará alteraciones neurológicas y/o cognitivas como la PCI<sup>58</sup>. Por ello, debido a su gran relevancia en la fisiología y fisiopatología de numerosas enfermedades (incluida esta), a continuación, se hará una breve descripción de la UNV.

### La Unidad Neurovascular

La UNV se definió inicialmente como "las interacciones entre los elementos sanguíneos circulantes y la pared de los vasos sanguíneos, la matriz extracelular, la glía y las neuronas"<sup>72,73</sup>. No obstante, actualmente se han incluido otros componentes necesarios para su correcta función como son la microglía y los pericitos, conformando el sitio de acoplamiento de la actividad neuronal y el flujo sanguíneo cerebral, ambos estrechamente ligados (**Fig. 9**)<sup>72-74</sup>.



**Figura 9. Integrantes de la UNV.** Representación esquemática de la UNV a nivel de la microvasculatura cerebral (arteriolas, capilares). Adaptado de Gorelick et al. 2017

Para conocer la función y anatomía de la UNV, es necesario hablar de **BHE**. La BHE es un término utilizado para describir las propiedades físicas y fisiológicas de la microvasculatura del SNC, responsable de la difusión de compuestos entre la sangre y el cerebro<sup>72-75</sup>. La BHE está compuesta principalmente de células endoteliales, pericitos, macrófagos perivasculares, astrocitos y una membrana basal. La barrera física y funcional que conforma esta estructura es el resultado de una monocapa firmemente sellada de células endoteliales con uniones estrechas

(UEs) y uniones adherentes<sup>72-74</sup>. A su vez, los vasos con los que interactúa son continuos y no fenestrados, presentando así una serie de propiedades adicionales que les permiten regular, junto a los transportadores específicos, el movimiento de moléculas, iones y células entre el sistema circulatorio y el SNC<sup>72-74</sup>. Esta capacidad de barrera tan selectiva permite mantener la homeostasis del SNC, una función neuronal adecuada y confiere protección ante toxinas, patógenos, agentes proinflamatorios, lesiones y enfermedades. De esta forma, una disfunción de la BHE aumentará la permeabilidad de esta, produciendo cambios en la homeostasis, y permitirá la entrada de células inmunes, iones y/o moléculas dañinas en el SNC<sup>72-75</sup>. Por ello, dada la importancia de esta estructura, es necesario conocer cuáles son los integrantes que la conforman y como su posible alteración puede promover el daño neurológico.

Los vasos sanguíneos están formados por dos tipos de células principales: **células endoteliales (CE)**, encargadas de formar las paredes de los vasos sanguíneos, y las **células murales**, que se encuentran en la superficie abluminal de la capa de células endoteliales. Aunque las propiedades de barrera de la BHE se debe principalmente a las CEs, su interacción con células murales, las células inmunes, las células gliales y

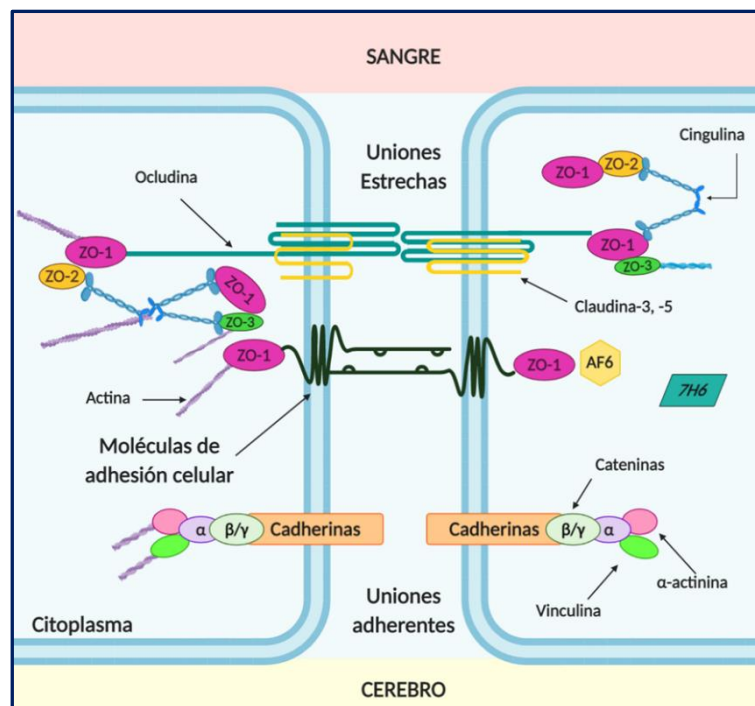


Figura 10. Integrantes de la BHE: Las Uniones Estrechas. Adaptado de Ronaldson et al. 2011

las células neurales es necesaria para mantener el correcto funcionamiento de la UNV<sup>73-75</sup>. Las CEs son células epiteliales escamosas simples derivadas del mesodermo embrionario que forman las paredes de los vasos sanguíneos. Las CEs del SNC permiten regular estrechamente el movimiento de iones, moléculas y células entre la sangre y el cerebro gracias a su baja transcitosis (paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro mediante la formación de vesículas), la presencia de moléculas de adhesión y la presencia de transportadores específicos (Fig. 10)<sup>73,74</sup>.

Entre los componentes de las CE destacan las **UEs**. Estas son adherencias celulares que se forman en la parte apical de la membrana lateral por interacciones homotípicas y heterotípicas de moléculas transmembrana que están unidas al citoesqueleto <sup>72-77</sup>. Las uniones estrechas endoteliales se componen de tres **proteínas de membrana integrales** [claudina, ocludina y moléculas de adhesión celular (MAC)] y **proteínas accesorias citoplasmáticas** [zónula ocludens (ZO) 1, 2 y 3 y cingulina] que a partir de su interacción, mejoran la integridad del vaso <sup>72-77</sup>. Por otro lado, se encuentran los **transportadores**, necesarios para el movimiento de iones y moléculas entre la sangre y el cerebro. Existen dos tipos de transportadores, los **transportadores de flujo de salida**, que utilizan la hidrólisis de ATP para transportar sus sustratos, y los **transportadores de nutrientes**, que facilitan el transporte de compuestos como la glucosa mediante un gradiente de concentración <sup>73,74</sup>. Por último, se encuentran elementos como los **integrantes de la transcitosis** (por ejemplo, la caveolina-1) <sup>73,74</sup>, **moléculas de adhesión a leucocitos** como las selectinas y miembros de la familia de las inmunoglobulinas o **la vía señalización Wnt/B-Catenina y Sonic Hedgehog**, las cuales están implicadas en la transcitosis, infiltración leucocitaria o en la regulación de la BHE respectivamente <sup>73,74</sup>. A su vez, el metabolismo vascular así como las enzimas que intervienen (como la anhidrasa carbónica IV y la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa) han demostrado presentar un papel diferencial en la regulación de las propiedades de barrera de la vasculatura del SNC al metabolizar toxinas o alterar las propiedades de moléculas potencialmente dañinas <sup>73</sup>.

**Las células murales** incluyen tanto a las células vasculares del músculo liso que rodean los grandes vasos como a los pericitos, que cubren de manera incompleta las paredes endoteliales de la microvasculatura. Los **pericitos** son componentes celulares derivados de la cresta neuronal que forman parte de la BHE, rodeando las CE de pequeños vasos en el cerebro y controlando el diámetro capilar a través de sus proteínas contráctiles. Como parte de la UNV, participan en múltiples procesos como la formación del endotelio, la diferenciación y desarrollo de la BHE, la vasoactividad microvascular, la estabilidad estructural del vaso, la regulación de la infiltración de células inmunes y en la angiogénesis. Al principio de la angiogénesis, estos se encargan de regular la proliferación y migración de las CE, mientras que posteriormente modularán su maduración y diferenciación, así como la deposición de la matriz extracelular (MEC) con los vasos colindantes mediados por la N-cadherina <sup>73-76</sup>. El reclutamiento y las funciones del pericito están regulados por los sistemas **del Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B-PDFGR-B)**, **angiopoyetina-Tie**, **Factor de crecimiento tumoral (del inglés TGF-B)-TGFR-B** y **Esfingosina-1-fosfato-S1P**, siendo estos dos últimos los responsables de la escasez, desorganización y/o falta de maduración de estos en la matriz germinal (MG) del PE <sup>73,74</sup>.

Otros componentes como la **membrana basal (MB)**, encargada de regular las vías de señalización o ejerciendo un efecto barrera <sup>72-75,78</sup>, los **astrocitos**, encargado del acoplamiento entre los circuitos neuronales y los vasos sanguíneos <sup>73-75,79,80</sup>, o las **células inmunes** como la microglía y los macrófagos perivasculares, se encargan de mantener la estabilidad y soporte funcional de la BHE durante todo el desarrollo <sup>77,81-83</sup>.

En definitiva, la inmadurez de alguno de estos integrantes o su alteración a causa de algún daño, comprometen la estabilidad y el correcto funcionamiento del SNC. Anteriormente se mencionó la vulnerabilidad en la vasculatura (y por tanto en la UNV) de los PE y/o EBPN. Esta propiedad promueve el desarrollo de **Hemorragia Intraventricular (HIV)**, la principal causa de la PCI en los prematuros.

# LA PARÁLISIS CEREBRAL DE ORIGEN HEMORRÁGICO

## ¿Qué es la Hemorragia Intraventricular?

### Definición

La HIV es el tipo de hemorragia intracraneal (HIC) más común en el RN, especialmente en el PE y EBPN (Fig. 11). A pesar de las mejoras en los cuidados durante el embarazo o de los avances en las técnicas obstétricas, esta patología sigue siendo un problema global debido a su alta incidencia y la gravedad de sus secuelas<sup>80,84-88</sup>. A nivel mundial, se estima que aproximadamente entre el 25-60% de los EBPN llegarán a sufrir este daño (sólo en los EE. UU. 12.000 niños lo sufrirán cada año). Aunque se haya mejorado la tasa de supervivencia de los RN con HIV (actualmente fallece el 30% de los pacientes con HIV, una tasa tres veces menor que en los años 90), se ha progresado muy poco en la prevención de secuelas como es la PCI<sup>74,80,92-95,84-91</sup>.

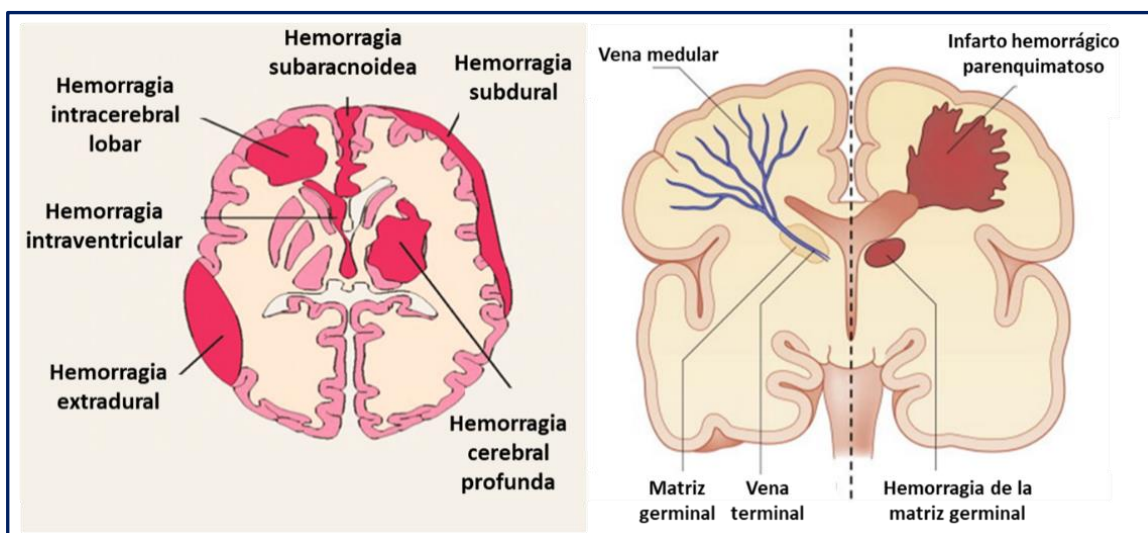


Figura 11. (Izquierda) Imagen representativa de los tipos de Hemorragias craneales que se producen en el ser humano. (Derecha) Diagrama de la MG y las estructuras colindantes. Adaptado de Snehkunj et al. 2018

El carácter transitorio de importantes estructuras del SNC como la **MG** hacen de la HIV una enfermedad difícilmente tratable<sup>59</sup>. La **MG** es una estructura altamente vascularizada que se

encarga de la neurogénesis y gliogénesis durante el segundo y tercer trimestre del embarazo <sup>60</sup>. En este sentido, la rotura de los vasos o su atrofia estructural es responsable de diferentes eventos fisiopatológicos que, sumado a las alteraciones en el neurodesarrollo de los PE y/o EBPN que aparecen como consecuencia de la exposición del individuo al propio ambiente extrauterino, son responsables de diferentes alteraciones neurológicas y/o cognitivas como la PCI <sup>58</sup>.

### La relación entre la Matriz germinal y la Hemorragia intraventricular

Como hemos mencionado anteriormente, la MG es una estructura transitoria presente durante el periodo comprendido entre las semanas 8 y 36 de gestación <sup>80,84</sup>. Esta estructura, que se encuentra altamente vascularizada, se sitúa en la SVZ, principalmente encima del núcleo caudado envolviendo al ventrículo, aunque también está presente en la parte superior del asta temporal <sup>80,84</sup>. Como consecuencia de su origen tan primitivo, es imposible clasificar sus vasos en arteriolas, vénulas o capilares; por ello, definimos a la MG como una **“red vascular inmadura”** que promueve la formación de precursores oligodendrogiales y neuronales <sup>80,84</sup>.

La MG es considerada como el productor de la mayoría de las células del SNC, ya que en esta estructura los precursores neuronales y oligodendrogiales empiezan su actividad mitótica justo antes de migrar a las diferentes zonas del cerebro <sup>80,84</sup>. De esta forma, después de la semana 15 de gestación la MG se extiende rápidamente a lo largo del cerebro convirtiéndose en la principal fuente de neuronas inhibitorias en la zona neocortical <sup>80,84</sup>. Se estima que aproximadamente el 35% de las neuronas proceden de la GE ventral, mientras que el resto son producidas en la zona dorsal de la SVZ, dando lugar a la mayoría de las proyecciones neuronales al comienzo de la gestación <sup>80,84</sup>. A partir de la semana 24 de gestación, este mismo proceso ocurre con los progenitores de los oligodendrocitos y astrocitos, los cuales migraran y maduraran hasta el momento del parto.

Tradicionalmente, se ha intentado atribuir las HIV a causas traumáticas. Así, algunos autores señalaban la acción de las diferencias de presión entre el ambiente uterino y el extrauterino como precipitante del daño en la MG <sup>60</sup>. Otros indicaban, por su parte, que la causa subyacente podría residir en la compresión de la vena galena en el parto, lo que daría lugar a una obstrucción del drenaje cerebral y una hemorragia intraventricular secundaria. Sin embargo, las hipótesis actuales relacionan el origen de la mayoría de las HIV en prematuros como consecuencia de una hemorragia de la MG que rompe el epéndimo y comunica con la cavidad ventricular.

La principal razón de por qué el sangrado se desarrolla en la MG y no en la SB es debido a que en esta estructura los elementos de soporte están inmersos en numerosos canales vasculares y venas de paredes muy finas y rudimentarias (en ocasiones sin capas musculares o de colágeno) que drenan al sistema venoso profundo, siendo muy susceptible a cualquier noxa<sup>80,88-91</sup>. Por otro lado, la red vascular de la MG es compleja, ya que su sistema anatómico incluye una serie de vasos primitivos que, a partir de la semana 23 de gestación, irán aumentando de grosor y darán lugar posteriormente a arteriolas, capilares y venas que aún no están preparadas a las condiciones del ambiente extrauterino<sup>80</sup>. En este sentido, la vulnerabilidad de la MG depende de la morfología y densidad vascular, de la inmadurez de los integrantes y eventos de señalización de la BHE (fibronectina, astrocito, pericitos, etc.)<sup>80,86,96,97</sup> o de su alta tasa angiogénica y demanda metabólica y de oxígeno<sup>80,98</sup>.

Aunque la vulnerabilidad de la MG es el factor más determinante a la hora de explicar la HIV, en el PE ocurren una serie de factores que hacen que la probabilidad de que se produzca la rotura de los vasos aumente<sup>74,80,95,86,88-94</sup>. La presencia de **fluctuaciones del Flujo Sanguíneo Cerebral (FSC)**<sup>80,86,88</sup>, una autorregulación inmadura que origina **pasividad en la presión del flujo cerebral** ante la incapacidad de la función reguladora para mantener el flujo cerebral constante, a pesar de las fluctuaciones en la circulación sistémica<sup>80,86,88</sup>, y la **hiperemia funcional** (debido a la actividad neuronal para suplir la demanda metabólica)<sup>80,86,88-91</sup> también son responsables directas de la rotura de los vasos de la MG y del posterior sangrado.

El hecho de ser una patología multifactorial hace que la heterogeneidad, así como el pronóstico del paciente varíe en función de la severidad y localización del sangrado. Según Papile, **la HIV se puede categorizar en 4 tipos en función del grado de lesión y la zona en la que se localiza**<sup>74,92-95</sup>. En este sentido, la hemorragia es de **grado I** cuando el sangrado queda circunscrito a la zona subependimaria. Por otro lado, en algunos casos el sangrado puede producir la rotura del epéndimo invadiendo los ventrículos laterales. A este respecto, la HIV será clasificada como **grado II y III** en función de si esta estructura queda intacta o por el contrario se dilata. A su vez, cuando el volumen acumulado en los ventrículos laterales es muy grande, se produce una obstrucción en el flujo sanguíneo, la cual origina secundariamente un infarto venoso hemorrágico (hemorragia parenquimatosa o de **grado IV**), que suele ser homolateral a la IVH (**Fig. 12**)<sup>74,80,84-87,92-95</sup>. No obstante, actualmente se ha cuestionado si es dependiente o no de la HIV. A pesar de todo, se ha demostrado que aunque todos los pacientes que sufren HIV tendrán

alteraciones conductuales de por vida, se ha observado que el volumen del sangrado está directamente relacionado con la gravedad de las secuelas <sup>74,92-95</sup>.

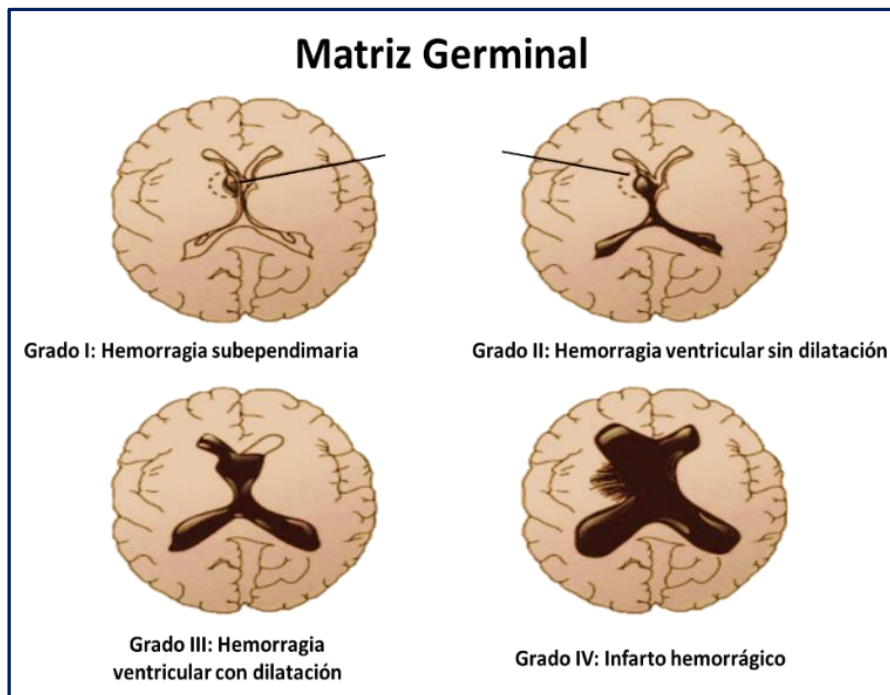


Figura 12. Imagen ilustrativa del tipo de daño según el grado de lesión. Adaptado de Hancock 1995

### Complicaciones de la Hemorragia intraventricular

Aunque el sangrado *per se* es capaz de inducir daño cerebral ejerciendo un efecto mecánico sobre la glía y las neuronas, cuando la sangre se difunde al interior del ventrículo se producen una serie de complicaciones (como consecuencia de la respuesta inflamatoria y la secreción de moléculas perjudiciales como proteasas o especies reactivas de oxígeno [del inglés, ROS] <sup>74,92-95</sup>) que agravarán aún más el daño en la SB y las secuelas a largo plazo <sup>86-88,91</sup>. La principal complicación que se conoce es **dilatación ventricular post-hemorrágica (DVPH) o hidrocefalia (HC)**. Según Coulon, el riesgo de que se produzca DVPH es prácticamente nulo en los RN con HIV grado I, del 25 % en los casos con grado II, del 78 % en los de grado III y del 100% en los pacientes con grado IV <sup>84,87-90</sup>. Se estima que en torno a dos tercios de los casos de DVPH desarrollarán disfunción motora, y aproximadamente un tercio deterioro cognitivo y anormalidades neurológicas <sup>74,93,95</sup>. Al igual que ocurría con la HIV, en la DVPH los síntomas inmediatos suelen ser muy leves o incluso nulos, siendo la aparición de crisis epilépticas a causa del aumento de la PIC, una de los pocos signos de esta patología <sup>84,87-90</sup>.

La DVPH se produce tras la entrada de la sangre al interior del ventrículo, extendiéndose rápidamente a través del foramen de Monro a la fosa posterior, al Acueducto de Silvio, al cuarto ventrículo y el Foramen de Magendi y Luschka. Durante este proceso, la interacción de los componentes hemolíticos con el líquido cefalorraquídeo (LCR) dará lugar a la formación de microtrombos que, dependiendo del lugar que ocupen, producirán una DV diferente (**Fig. 13**). De esta forma, el 35% de las DVPH pueden ser de tipo no comunicante y con un **progreso lento**, debido principalmente a la obstrucción al nivel del Acueducto de Silvio; mientras que el 65% son de tipo comunicante y se producen de forma **más gradual**, como consecuencia de la obstrucción debido a la cicatrización de las microvellosidades subaracnoideas<sup>74,84,87-90,93,95</sup>. En cualquier caso, aunque la PCI puede darse por la simple presencia del sangrado, generalmente la DV es un factor principal a la hora de explicar el daño en la SB y por tanto la PCOH<sup>74,93,95</sup>.

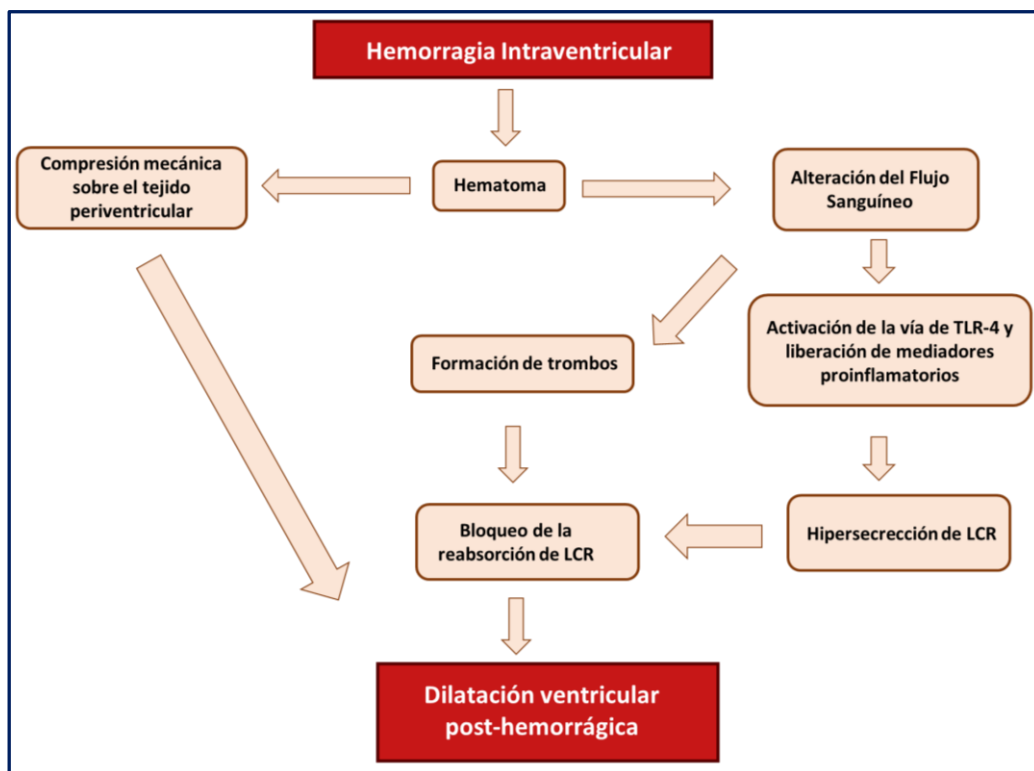


Figura 13. Esquema de la producción de DVPH en el PE y EBP. Adaptado de Romantsik et al. 2019

Como hemos mencionado anteriormente, otra de las complicaciones asociadas con la HIV (aproximadamente el 15% de los casos) es el **infarto hemorrágico periventricular**, localizado habitualmente en la SB periventricular<sup>84,87-90</sup>. Aunque durante mucho tiempo se discutió sobre si esta complicación se debía a una extensión del sangrado de la MG, actualmente se considera como un infarto hemorrágico venoso independiente de esta<sup>84,87-90</sup>.

De esta forma, la PCOH o la DVPH debe explicarse a partir del daño cerebral producido por los propios mecanismos físicos del hematoma (**daño primario**), y por la activación de diversos elementos biomoleculares, como consecuencia de los productos liberados por la sangre (**daño secundario**). De esta forma, podemos clasificar al daño en **una primera fase más mecánica (daño primario) y una posterior más biomolecular (daño secundario)** <sup>74,93,95,99</sup>.

### ***Cuadro 2: Signos y técnicas utilizados en el diagnóstico de la HIV***

Dada la variabilidad de los síntomas, el diagnóstico de la HIV se limita típicamente a la detección de sus secuelas y al manejo de ciertas variables, como la presión arterial y el estado respiratorio, que pueden influir en la progresión de esta enfermedad <sup>100-105</sup>. Aunque en la mayoría de los casos la HIV cursa de forma asintomática, algunos pacientes presentan un aumento en la presión intracraneal (PIC) y el tamaño de la cabeza; no obstante, los signos y síntomas de la **HC** pueden no ser evidentes hasta varias semanas después debido a la distensibilidad del cráneo <sup>100,102,104,105</sup>. En otros casos, la manifestación clínica puede ser más grave, presentando una alteración oscilante del estado de conciencia, disminución de la motilidad espontánea, presentan hipertensión y movimientos oculares anormales <sup>100,102,104,105</sup>. Por último, un porcentaje muy escaso de pacientes presentan un deterioro del estado de conciencia, hasta el estupor profundo o el coma, anomalías ventilatorias, crisis convulsivas, postura de descerebración y pérdida de los reflejos oculo vestibulares. Clínicamente se aprecian abombamiento de la fontanela, hipotensión y bradicardia con caída súbita del hematocrito <sup>100,102,104,105</sup>.

Debido a la complejidad del diagnóstico, se han llevado a cabo diferentes técnicas de imagen con el objetivo de identificar y pronosticar las secuelas secundarias la HIV <sup>100,102,104,105</sup>. La **ecografía craneal** es la técnica más utilizada debido a la sencillez y seguridad de su manejo, evitando los riesgos asociados con el transporte de niños críticamente inestables <sup>100,102,104,105</sup>. No obstante, esta técnica tiene un potencial bastante limitado para predecir los resultados del desarrollo neurológico en comparación con la **resonancia magnética (RM)** <sup>100,102,104,105</sup>. Se ha demostrado que la RM es actualmente la técnica más fiable para identificar las anomalías estructurales que permiten predecir el pronóstico y secuelas del individuo <sup>100,102,104,105</sup>. Por otro lado, la **tomografía computarizada (TAC) o la electroencefalografía integrada en amplitud** son técnicas utilizadas como complemento funcional a la hora de identificar las anomalías del SNC de los pacientes con HIV por RM <sup>100,102,104,105</sup>.

### ***Daño primario: el efecto mecánico de la hemorragia***

Como hemos mencionado, el daño de la SB secundario a la HIV o a complicaciones como la DVPH se debe tanto al efecto físico que produce la presencia del hematoma en el SNC (daño primario) como a los eventos fisiopatológicos inducidos por los componentes de la propia sangre (daño secundario). Actualmente se han descrito al menos tres efectos físicos responsables **del daño primario** por parte del hematoma sobre el tejido cerebral tras un episodio de HIV: el desplazamiento del tejido neural (efecto masa), un aumento de la presión intracraneal y el bloqueo de las vías del LCR <sup>74,92-94,99</sup>.

Por un lado, cuando el sangrado se limita a los grados I y II, este apenas tiene un efecto físico sobre el tejido cerebral. No obstante, la entrada de la sangre al interior del ventrículo dará lugar a la ya mencionada DVPH, a causa de la alteración en el revestimiento endotelial proximal. Tanto el hematoma producido como la extensión de la pared ventricular y del tejido colindante producida por la DVPH será la responsable del **incremento de la presión intracraneal** y de las limitaciones del flujo cerebral <sup>74,92-94,99</sup>. Aunque la compresión del tejido produce principalmente muerte y disfunción axonal, la escasez de vasculatura de la SB y los continuos episodios isquémicos que suceden también serán un importante factor a la hora de explicar el daño cerebral post-hemorrágico, ya que dará lugar a parte de los eventos fisiopatológicos que mencionaremos más adelante <sup>74,92-94,99</sup>.

Otro de los posibles efectos físicos de la HIV es el **bloqueo de las vías del LCR**. En general, el LCR funciona como amortiguador en el cerebro y como un medio de transporte de productos de desecho y de factores tróficos. <sup>74,92-94,99</sup>. En condiciones fisiológicas, un aumento en la producción de LCR puede ayudar a eliminar los coágulos que impiden el drenaje del fluido, sin embargo, la **hipersecreción** de este a consecuencia de la inflamación producida puede tener efectos deletéreos. La activación del receptor tipo Toll 4 (del inglés *Toll-like receptor 4, TLR-4*) y/o el factor nuclear *kappa - B* (del inglés *Nuclear factor kappa - B, NFk-B*) promueve la inducción de SPAK y la posterior activación del cotransportador NKCC-1 en la región apical del plexo coroideo <sup>92</sup>. A su vez, se ha observado que esta misma inflamación puede alterar la expresión de la *Aquaporina 1*, un integrante de la BHE encargado del transporte transcelular del agua, produciendo finalmente edema <sup>92</sup>.

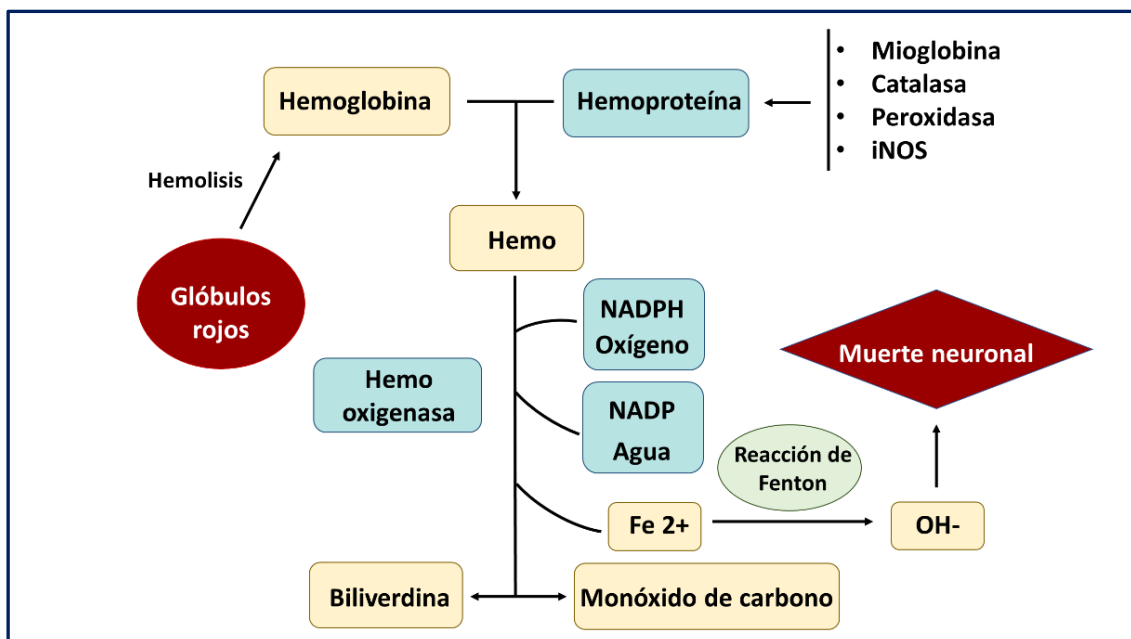
Por tanto, aunque a lo largo del tiempo se ha definido al hematoma como el principal responsable del daño primario en la HIV y en la DVPH, gran parte de las propiedades mecánicas

deletéreas que aparecen se deben a la alteración en la homeostasis del LCR <sup>74,92-94,99</sup>. De esta forma, la combinación del LCR y de la sangre extravasada al ventrículo dará lugar a la formación de trombos, que sumado a la obstrucción por parte del LCR, producirá la compresión del tejido, la aparición de episodios isquémicos y a un aumento de la PIC <sup>74,92-94,99</sup>.

### ***Daño secundario: principales eventos fisiopatológicos implicados***

#### Componentes de la sangre: El comienzo del daño secundario

El daño secundario causado por los componentes sanguíneos es responsable de gran parte de la lesión observada. Después de la HIV, los eritrocitos pueden lisarse y liberar su contenido potencialmente tóxico en el sistema ventricular. Además, otros componentes sanguíneos, como los elementos de la cascada de coagulación y las células inmunes promueven el daño neurológico <sup>21,92,99,106-112</sup>. El mecanismo por el cual se produce la lisis de estos aún se desconoce, aunque se ha identificado un agotamiento gradual de la energía y la activación del sistema de complemento como los principales responsables <sup>110</sup>. Uno de los principales productos liberado en la lisis del eritrocito es la **hemoglobina (Hb)** <sup>92,99,107-109,111</sup>, la cual ha demostrado exhibir efectos citotóxicos y aumentar la respuesta inflamatoria tanto en el tejido periventricular como en el LCR como consecuencia de la activación del receptor TLR-4 y la hiperproducción de radicales hidroxilos (**Fig. 14**) <sup>92,99,107-109,111</sup>.



**Figura 14.** Productos de degradación de la lisis de eritrocitos como consecuencia de la rotura de los vasos de la MG. La liberación de Fe produce una hiperproducción de radicales -OH que promueven el daño neuronal.

La Hb celular se oxida liberando su grupo hemo<sup>92,99,112</sup>. En condiciones fisiológicas, **el grupo hemo** participa en el correcto funcionamiento de diversas proteínas<sup>92,99,112</sup>, pero en altas concentraciones promueve la lipoperoxidación de las membranas lipídicas, así como la oxidación de las proteínas asociadas y los organelos, comprometiendo finalmente su estructura y transporte<sup>92,99,112</sup>. No obstante, son sus productos de degradación los que presentarán un potente efecto citotóxico. En el caso del **Monóxido de Carbono (CO) y la bilirrubina**, en condiciones fisiológicas ambos productos presentan un potente efecto vasodilatador, antioxidante y antiinflamatorio<sup>11299,112,113</sup>; aunque un aumento exacerbado de sus niveles pueden promover un ambiente prooxidante o la aparición de kernicterus respectivamente<sup>11299,112,113</sup>. Sin embargo, el producto derivado de la liberación de la Hb con mayor potencial citotóxico es **el hierro**<sup>21,92,99,106-112</sup>. El hierro es un elemento celular esencial que se utiliza en una amplia gama de reacciones bioquímicas en el SNC, como el metabolismo de neurotransmisores, la síntesis de mielina y en las reacciones de transducción de energía celular<sup>74,92,99</sup>. Sin embargo, tras la HIV el hierro se acumula en el parénquima cerebral, concretamente en zonas altamente vascularizadas como el CC, promoviendo un estado prooxidante y proinflamatorio que afectará al linaje oligodendroglial<sup>21,92,99,106-11221,92,99,106-112</sup>. Como se muestra en la **Figura 14**, cabe destacar que la neurotoxicidad del hierro está mediada por diversos mecanismos, entre el que destaca el desequilibrio redox debido a su capacidad para generar radicales hidroxilos<sup>99,111</sup>.

El daño mecánico generado por el hematoma, así como el efecto de los componentes de la sangre inducen un estado excitatorio, prooxidante e inflamatorio, que de manera conjunta será el principal responsable del daño en la SB característico de la PCOH.

### **Cuadro 3: Otros componentes de la sangre inductores del daño secundario de la HIV**

Otro de los elementos responsables del daño secundario de la HIV son los componentes de la cascada de coagulación, entre los que encontramos la trombina (Factor IIa)<sup>99,106-109,111</sup>. La **trombina** es un componente esencial de la cascada de coagulación que promueve la síntesis y maduración de la glía, modula el crecimiento de neuritas, estimula la proliferación de astrocitos y modula el citoesqueleto de las células endoteliales<sup>99,106-109,111</sup>. El aumento exacerbado de sus niveles como consecuencia de la HIV promueve de forma directa la alteración de la BHE (contribuye a la formación de edema y episodios isquémicos) mediante la liberación de hierro, Glutamato y metaloproteasas (MMPs)<sup>99,106-109,111</sup>. Por otro lado, de manera indirecta la conversión de **fibrinógeno** en fibrina por parte de la trombina también promueve el daño cerebral secundario a la HIV<sup>99</sup>. En condiciones normales, este proceso es esencial para la hemostasia, sin embargo, en presencia de una hemorragia, los coágulos originados por la fibrina pueden obstruir el paso del LCR o inducir una potente respuesta inflamatoria<sup>99</sup>. Otro factor derivado de eritrocitos, plasma y plaquetas que pueden afectar el tejido cerebral circundante es la **anhidrasa carbónica (CA)**<sup>99,107,108</sup>. La CA, la cual pertenece a la familia de las metaloenzimas de zinc, promueve la formación de edema y muerte celular en la HIV mediante la alteración de la permeabilidad la BHE<sup>99,107,108</sup> así como a través de la perturbación de varios procesos fisiológicos como la homeostasis de pH, el flujo iónico, el correcto funcionamiento de la vasculatura y las células gliales<sup>107,108</sup>.

### La excitotoxicidad: el papel del Glutamato

Las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral y la alta demanda de oxígeno y metabólica presente en la MG de RN inmaduro, hacen que cuando se produce la rotura de los vasos se presenten alteraciones en la regulación de ciertos aminoácidos como el Glutamato o la adenosina, ambos implicados en gran medida en el daño de la SB<sup>21,94,111,114,115</sup>. En este sentido, describimos a la **excitotoxicidad** como el proceso patológico por el cual se produce la sobreactivación de los receptores NMDA y AMPA, seguido de la liberación masiva de Glutamato<sup>21,94,111,114,115</sup>. El hierro, la Hb o la trombina son algunos de los elementos implicados en el daño neuronal y oligodendroglial secundario a la excitotoxicidad presente en la HIV<sup>21,94,111,114,115</sup>.

Los precursores oligodendrogiales presentes durante el desarrollo de la SB periventricular son particularmente susceptibles a este proceso. Aunque en algunos casos esto se debe a la modulación de la actividad de la acotinasas (enzima encargada de regular el metabolismo energético)<sup>111</sup>, parte de este daño excitotóxico se debe simplemente al **agotamiento del glutatión** y la posterior formación de radicales libres<sup>114</sup>. Esta excitotoxicidad está relacionada con la activación del intercambiador de Glutamato-cistina (transportador Xc), que regula la absorción de Glutamato y el flujo de salida de cistina. A su vez, el agotamiento intracelular de la

cistina conduce a una reducción en los niveles de glutatión, reduciéndose así los mecanismos antioxidantes que este aporta, aumentando finalmente las ROS<sup>114</sup>.

Por otro lado, en la HIV también aparece la **excitotoxicidad mediada por receptores**, en la que los receptores de Glutamato ionotrópicos no NMDA (iGluR y AMPA / kainato) son los responsables primarios de la lesión en la SB <sup>21,94,111,114</sup>. Recientemente, se ha demostrado la importancia de la expresión de receptores NMDA en el desarrollo oligodendroglial. En condiciones isquémicas, estos receptores promueven la liberación de Glutamato y alteran la homeostasis del calcio, promoviendo posteriormente la muerte celular (**Fig. 15**). A su vez, este

aumento en los niveles de Glutamato mediados por los receptores NMDA no es exclusivo solo del oligodendrocito, sino que diversas líneas celulares como los propios axones de las neuronas, las células del plexo coroideo o el astrocito también están implicados en la excitotoxicidad secundaria a la hipoxia<sup>21,94,111,114,115</sup>. Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren la necesidad de buscar un tratamiento que medie la excitotoxicidad presente en la HIV y su efecto deletéreo sobre el linaje oligodendroglial.

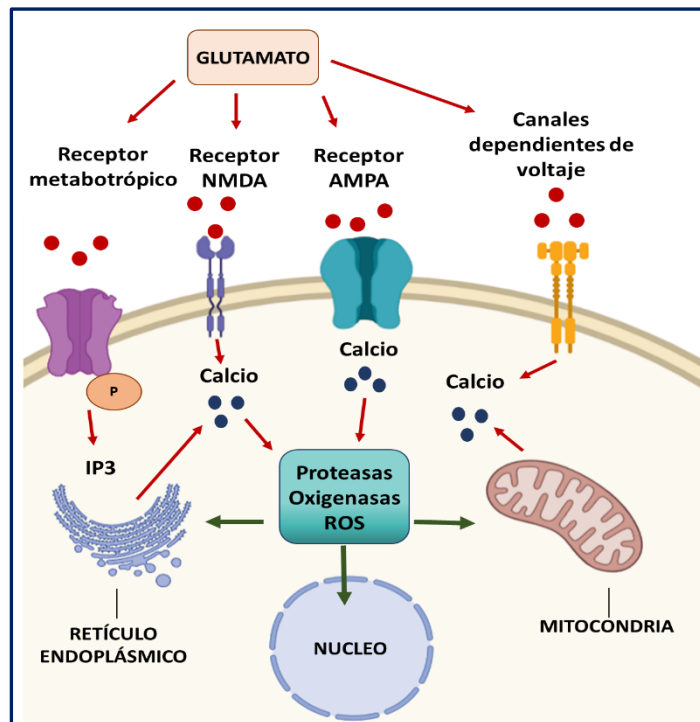


Figura 15. Esquema representativo de los receptores implicados en los procesos excitotóxicos y consecuencia de la liberación de Glutamato al interior del oligodendrocito. Adaptado de Dirnagl et al. 1999

#### Cuadro 4: El papel de la adenosina sobre la maduración de la SB <sup>114</sup>

La **adenosina** es un nucleósido que está presente en todas las células y es un componente de ácidos nucleicos y moléculas transportadoras de energía. A diferencia de los neurotransmisores clásicos, que se almacenan en vesículas sinápticas y se liberan por exocitosis para acciones exclusivas en las sinapsis <sup>116,117</sup>, la adenosina se distribuye extra e intracelularmente por todo el SNC <sup>116,118</sup>. Los niveles intra y extracelulares de adenosina varían continuamente gracias a la influencia de **transportadores específicos** <sup>116,119,120</sup> y a la actividad de ciertas enzimas metabólicas como la **Adenosin desaminasa (ADA)**, **Adenosin kinasa (ADK)** o la **S-adenosil-L-homocistein (SAH) hidrolasa** <sup>116,121</sup>. Las fuentes de entrada de adenosina también varían, aunque dependen estrictamente del estado metabólico de la célula. Extracelularmente, la adenosina es producida por la descomposición de nucleótidos de adenina (como el ATP) por una variedad de transportadores, que incluyen los **receptores CD39 y CD73**. Intracelularmente, la adenosina se puede generar mediante la desfosforilación de AMP o la hidrólisis de SAH por las **enzimas citosólicas 5'-NT o SAH-hidrolasa**, respectivamente <sup>116,122</sup>.

En el cerebro maduro, la adenosina juega un papel neuroprotector importante. Sin embargo, durante el desarrollo la activación de los receptores de adenosina como el A1AR expresados en neuronas, microglía y oligodendrocitos tiene efectos nocivos sobre la maduración cerebral, en especial en las condiciones de hipoxia presentes en la HIV. En este sentido, se ha sugerido que **la activación del receptor A1R inhibe la proliferación oligodendroglial, A1R y A2AR promueven la diferenciación e inhiben la mielinización, y A2BR y A3R promueven la mielinización en el ciclo de vida de los oligodendrocitos.**

Concretamente, se ha observado como la activación de A1AR induce ventriculomegalia, reduce el volumen de la SG y SB, y reduce la expresión de la MBP. A pesar de su posible relación con la alteración del sistema de neurotransmisión, se desconoce los mecanismos de acción y las vías que conducen al daño en la SB (Fig. 16) <sup>114</sup>.

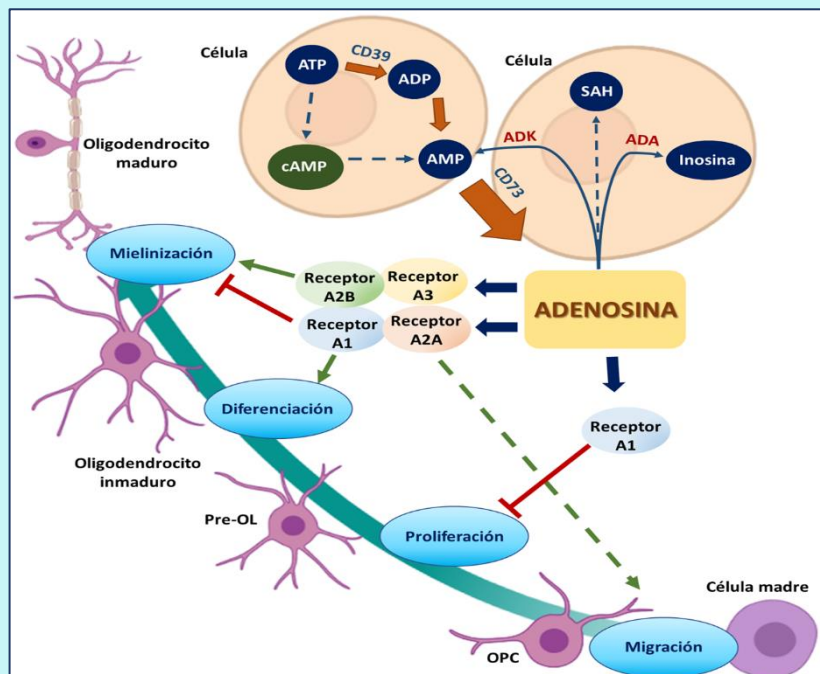


Figura 16. Metabolismo de la adenosina y sus efectos sobre las OPC. Descripción general del metabolismo de la adenosina y las acciones inducidas por el receptor de adenosina sobre el desarrollo oligodendroglial. Estimulación: flechas rojas; inhibición: flechas verdes; dirección: flechas azules. Adaptado de Shen et al. 2018

### El estrés oxidativo en la Hemorragia intraventricular

Otro de los mecanismos implicados en PCOH es el **estrés oxidativo**<sup>74,93,111,114,115,123</sup>. El cerebro inmaduro es altamente susceptible a este fenómeno, ya que su tejido enriquecido en ácidos grasos insaturados, hierro y ascorbato, precisa de una alta demanda de oxígeno que contrasta con una profunda escasez de defensas antioxidantes (superóxido dismutasas, catalasa o glutatión peroxidasa) en diferentes regiones del cerebro<sup>74,93,111,114,115,123</sup>.

Como ya se ha mencionado, la formación de ROS y la peroxidación lipídica producida durante la HIV se debe principalmente a la acción de los productos de la sangre (el hierro y la Hb reducen la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y aumenta la fragmentación de ADN mediante la inhibición de la vía de reparación por escisión de bases<sup>74,111</sup>) y a los diferentes episodios de HI que suceden<sup>74,93,115</sup>. Este proceso está mediado por la **xantina e hipoxantina**<sup>74,93,115</sup> el cual en condiciones fisiológicas utiliza NAD<sup>+</sup> como aceptor final de electrones para oxidar la hipoxantina y la xantina a ácido úrico<sup>74,93,115</sup>. Sin embargo, en el tejido isquémico, la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa, que utiliza oxígeno como aceptor final de electrones, lo que resulta en la generación de radicales libres<sup>74,93,115</sup>.

Al contrario que en otras patologías, se ha demostrado que la vulnerabilidad de los pre-OL en la HIV se debe a la ausencia de defensas antioxidantes mediadas por glutatión<sup>114,115,123</sup>. El **glutatión** es el principal antioxidante de las células protegiéndolas de las ROS, como los radicales libres y los peróxidos<sup>114,115,123</sup>. No solo se ha observado una menor cantidad de glutatión en los oligodendrocitos maduros, sino que además se produce una menor tasa de recambio y lavado de ROS, así como la inmadurez de enzimas antioxidantes como la **glutatión peroxidasa**<sup>114,115,123</sup>.

Por otro lado, parece que el agotamiento del glutatión depende en parte del proceso de **transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm)**<sup>111,115</sup>, característico de ciertas patologías como los TBI o los accidentes cerebrovasculares (ACV). Este evento fue descrito por primera vez a finales de los 70s por Haworth y Hunter, y describe un fenómeno en el cual se produce un cambio abrupto en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna en respuesta a calcio, estrés oxidativo y depleción de ATP, entre otros factores<sup>111,115</sup>. Se ha observado que un aumento de la permeabilidad de la barrera mitocondrial produce el desacoplamiento energético y el cese de la producción de ATP y reducción de glutatión<sup>111,115</sup>. El desencadenamiento de la transición de la permeabilidad mitocondrial también resulta en la liberación de múltiples proteínas del espacio intermembrana mitocondrial, incluido el Citocromo C<sup>115</sup>, el cual activa a la vía apoptótica mediada por la activación de las caspasas<sup>115</sup>. Estos procesos, sumados a la expresión retardada

de genes que suprimen la apoptosis, como **BCL-2** o **p35**, hacen del PreOI uno de los tipos celulares más susceptibles al estrés oxidativo<sup>11574,93,111,114,115,123</sup>.

### El importante papel de la inflamación

A pesar de que tanto la excitotoxicidad como el estrés oxidativo presentan una gran relevancia a la hora de explicar el daño de la SB de origen hemorrágico, la inflamación es probablemente el evento más importante<sup>21,74,77,83,93-95,99,111,124</sup>. Aunque la inflamación puede producirse en ausencia de hemorragia (por ejemplo, mediante la acción del lipopolisacárido LPS en infecciones maternas), muchos de los factores derivados del coágulo aumentan la infiltración de leucocitos y activación de la microglía, las principales células proinflamatorias del SNC<sup>21,74,77,83,93-95,99,111,124</sup>.

Desde las primeras etapas de gestación, la **microglía y los macrófagos (Fig. 17)** juegan un papel principal en el desarrollo y en la homeostasis del cerebro neonatal, de forma que desde la semana 4 de gestación se infiltran en el cerebro a través del plexo coroideo, meninges y ventrículos. Dentro del SNC neonatal sano, la microglía participa en la vigilancia inmunológica, el desarrollo de la red neuronal, la mielinización y la angiogénesis y vasculogénesis cerebral<sup>21,77,83,95,111</sup>. Cuando se produce una lesión se induce la activación de la microglía con fenotipo M1, estimulará la activación de receptores de tipo NOD o Toll (TLR), entre los que destaca el **TLR-4**, que a su vez inducen la liberación de mediadores como **Interferón-γ (IFN) o Factor de necrosis tumoral α (TNF-α)**, los cuales son altamente tóxicos para el pre-OI<sup>21,77,83,95,111</sup>.

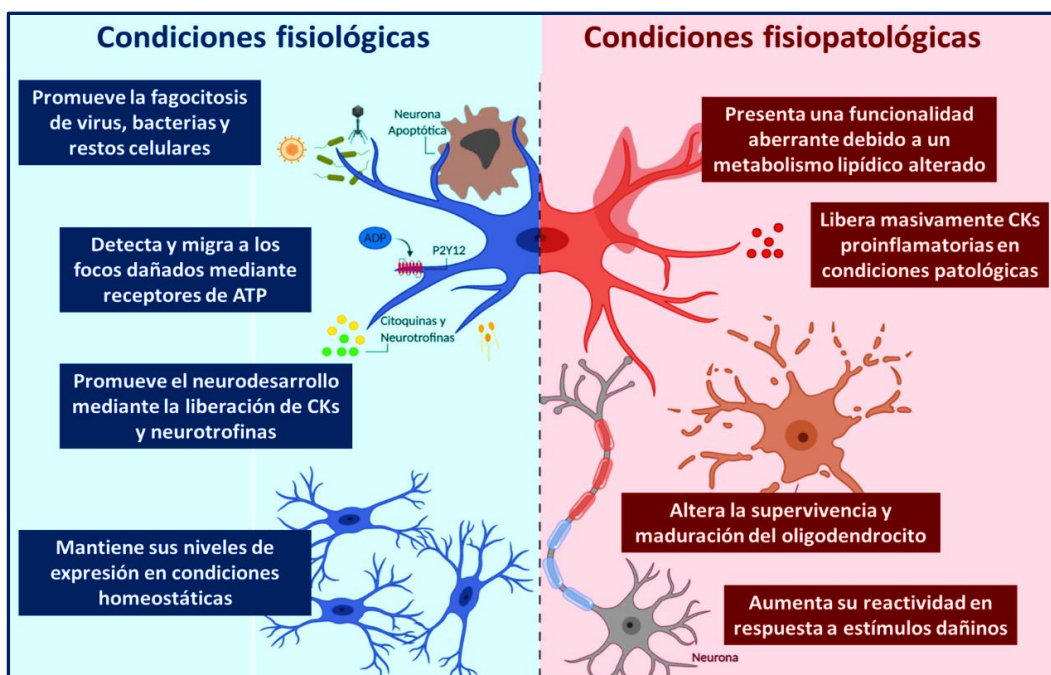


Figura 17. Papel de la microglía en función de su fenotipo reparador o inflamatorio en diversas patologías. Adaptado de Pocock et al. 2019

En enfermedades como el *stroke* o el TBI, se ha observado que la activación microglial M1 alcanza su máximo durante las primeras horas después del daño, no obstante, esta va desapareciendo a lo largo del tiempo adquiriendo de nuevo un fenotipo reparador<sup>21,77,83,95,111</sup>. Desafortunadamente, a día de hoy no se ha descrito el curso temporal de los cambios en las poblaciones de microglía M1 y M2 en ningún modelo preclínico de GMH-IVH del PE<sup>95</sup>.

La activación de vías proinflamatorias por parte de estos tipos celulares promueve la liberación de citoquinas (CKs) inflamatorias<sup>21,74,77,83,93–95,99,111,124</sup>. Las **CKs** son moléculas de señalización que juegan un papel central en los procesos inflamatorios (**Tabla 2**)<sup>21,74,77,83,93–95,99,111,124</sup>. Por un lado, la liberación de estas moléculas produce una hiperpermeabilidad de la BHE, de manera directa al activar las vías de señalización dentro del endotelio de forma directa, y mediante efectos indirectos ejercidos sobre otras células de la UNV, como se explicará más adelante<sup>77,83,124</sup>.

Citoquina	Implicación en el neurodesarrollo	Papel en la fisiopatología de la HIV
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Inhibe la neurogénesis y promueve el linaje astrocitario <sup>125–129</sup>	Aumenta la excitotoxicidad, la inflamación y el estrés oxidativo <sup>130–135</sup>
<b>IL-6</b>	Promueve la formación de sinapsis y el desarrollo de los sistemas hematopoyéticos y nerviosos <sup>124,125,136–139</sup>	A pesar de producir cambios hemodinámicos, presenta efectos antiinflamatorios <sup>136,140</sup>
<b>IL-8</b>	Regula la producción de moléculas de adhesión, la formación de lípidos bioactivos, amplifica la inflamación local, y estimula la angiogénesis <sup>141,142</sup>	Promueve la acumulación de neutrófilos activados, obstruyendo así la microvasculatura y aumentando la liberación de mediadores proinflamatorios <sup>124,143</sup>
<b>IL-10</b>	Aumenta la supervivencia y diferenciación de los progenitores neurales y oligodendrogliales <sup>144–146</sup>	Reduce la adhesión y extravasación de leucocitos, facilita la coagulación y ejerce efectos antioxidantes <sup>77,147–151</sup>
<b>IL-18</b>	Induce la muerte celular mediante la activación de células NK, linfocitos T y otros mediadores proinflamatorios <sup>152,153</sup>	Promueve el desarrollo de la PCOH mediante la activación astrocitaria y microglial <sup>124,154</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Inhibe la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales, promueve la supervivencia celular y ejerce funciones neuroprotectoras <sup>125,155,156</sup>	Altera la coagulación y promueve la necrosis de la SB provocando la muerte de los precursores oligodendrogliales <sup>124,157</sup>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Aunque en exceso puede inhibir la neurogénesis, juega un importante papel en el mantenimiento de la UNV <sup>125,158</sup>	Reduce los niveles de expresión de CKs proinflamatorias y promueve la liberación de factores tróficos <sup>159–164</sup>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Promueve la diferenciación, migración y desarrollo neuronal <sup>125,165</sup>	Promueve el daño de la SB y la BHE debido a sus propiedades proinflamatorias <sup>166–170</sup>

**Tabla 2. Papel de las distintas CKs en la fisiopatología de la HIV**

Por otro lado, tras la activación de las vías inflamatorias se produce la liberación de quimiocinas (o quemoquinas). Las **quimiocinas** regulan la quimiotaxis, incluida la migración de leucocitos responsables de la disrupción de la BHE<sup>77,83</sup>. Por último, otro de los mediadores liberados como consecuencia de la activación microglial son las MMP. Las **MMPs** desempeñan un papel central en los procesos neuroinflamatorios al degradar elementos de la matriz extracelular<sup>77,83,111</sup>. Particularmente, se ha sugerido que el control de la MMP-9 (producida por los macrófagos infiltrados) puede ser de vital importancia, ya que se ha descrito una correlación entre el aumento de la expresión de esta MMP con la expansión del hematoma, el edema perihematómico y el deterioro neurológico en pacientes con HIC <sup>77,83,111</sup>. Todo esto, sumado a la síntesis de enzimas prooxidantes como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o la ciclooxigenasa 2 (Cox-2) por la activación de TLR-4 (**Fig. 18**), hacen de la inflamación uno de los factores más importantes a la hora de explicar la patogenia de la HIV <sup>77,83,111</sup>.

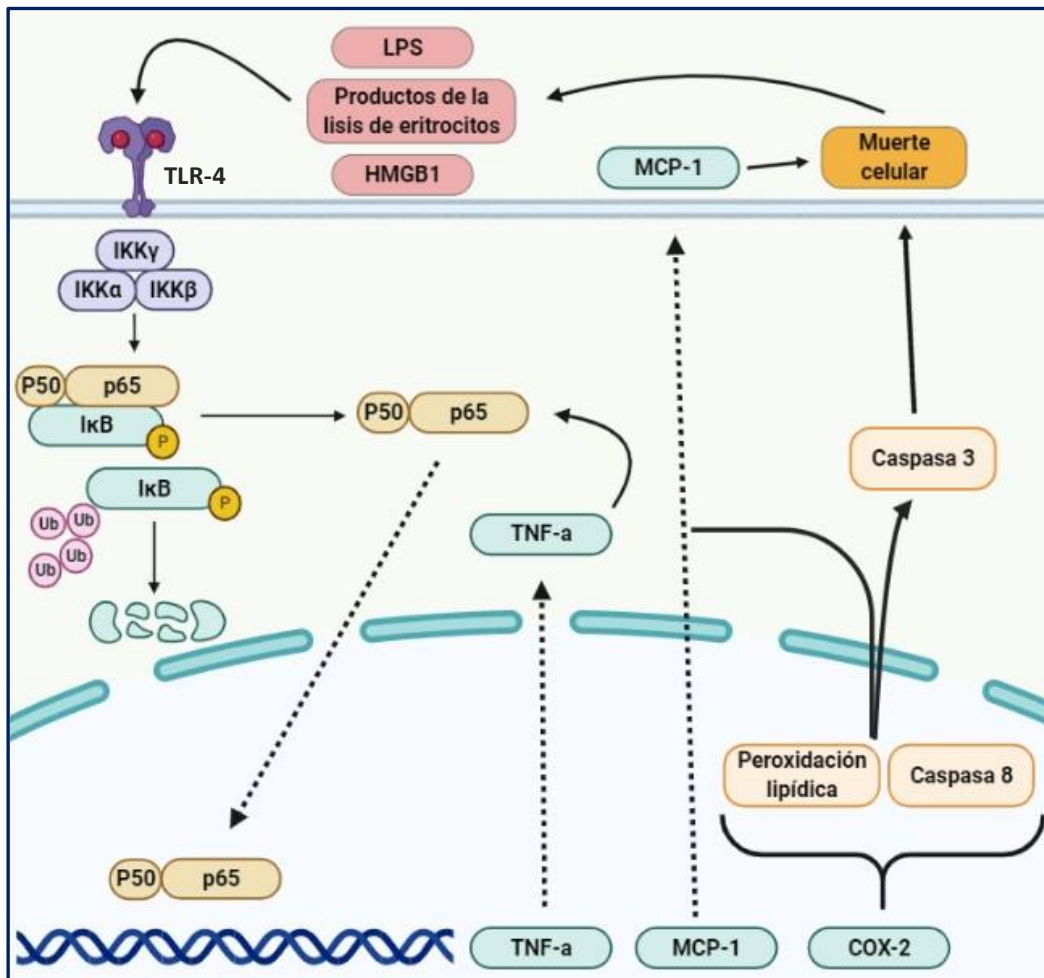


Figura 18. Esquema de la activación de la vía proinflamatoria dependiente del receptor TLR-4 por la acción de los productos resultantes de la lisis de eritrocitos. La activación de este receptor promueve la translocación de NFκ-B y la síntesis de CKs, quemoquinas y enzimas con efecto citotóxico. *Adaptado de Antón et al. 2017*

Por tanto, la polarización de la microglía y el bloqueo de la infiltración de leucocitos en el cerebro son objetivos terapéuticos potenciales en la HIV, promoviendo a su vez la liberación de factores de remodelación, como VEGF, BDNF y CKs antiinflamatorias como el TFG-B o la interleuquina (IL)10, las cuales promueven el crecimiento axonal, la angiogénesis tras la hemorragia y la reparación del tejido dañado <sup>83,95,99</sup>.

## Cuadro 5: Función de la microglía y macrófagos según su fenotipo

A pesar de tener un origen celular distinto (la microglía se origina en el saco vitelino y los macrófagos en la médula ósea), tanto a nivel fisiológico como fisiopatológicos ambos subtipos celulares presentan funciones muy similares (Fig. 19A) <sup>83,95</sup>. Ambos han demostrado tener un importante papel en la recuperación neurológica, incluida la neurogénesis, crecimiento axonal, la sinaptogénesis, la angiogénesis, la oligodendrogénesis y la remielinización en varias enfermedades del SNC <sup>83,95</sup>. No obstante, la liberación de nucleótidos (ATP, UTP) como consecuencia del daño celular hacen que estas liberen mediadores proinflamatorios como CKs o quemoquinas <sup>83</sup>. En este sentido, tanto la microglía como los macrófagos pueden clasificarse en 4 subcategorías según la función que desempeñen: fenotipo M1, activadas clásicamente con propiedades citotóxicas; el fenotipo M2a con una activación alternativa, que está involucrada en la reparación y regeneración; M2b con un fenotipo inmunorregulador; M2c, con un fenotipo de desactivación adquirida (Fig. 19B). La polarización tanto la microglía como los macrófagos depende del tipo de respuesta a la que estos son sometidos. Por ejemplo, los interferones de las células T auxiliares, la presencia de LPS o la estimulación del patrón molecular asociado al daño (DAMP) a través TLR4 promueven un fenotipo M1, mientras que la señal inducida por la expresión de IL-4 / IL-13 estos adquieren un fenotipo M2 <sup>83,95,99</sup>.

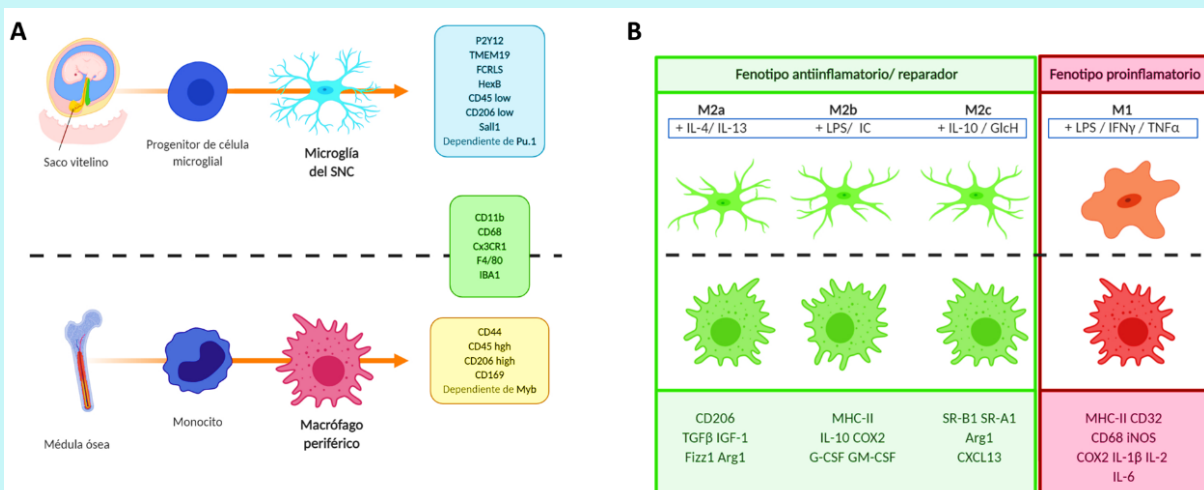


Figura 19. (A) Origen embrionario de los macrófagos y microglía. Adaptado de Jurga et al. 2020 (B) Marcadores representativos de cada fenotipo. Fumagalli et al. 2011.

## Alteraciones en la integridad de la Barrera hematoencefálica

Como hemos descrito anteriormente en la HIV, como consecuencia del daño primario y secundario se produce una alteración en la BHE, lo que conduce posteriormente a la infiltración masiva de macrófagos y a la formación de edema, que de manera recíproca, iniciará de nuevo los eventos fisiopatológicos descritos<sup>73,75,77</sup>. Lamentablemente, debido a la dificultad a la hora de realizar el análisis biomolecular, por el momento se desconoce si este aumento en la permeabilidad se debe a alteraciones del transporte paracelular (a causa de una disfuncionalidad de las UEs) o transcelular (transcitosis a través del endotelio)<sup>73,75,77</sup>. En el caso de la HIC en adultos (y probablemente en la HIV del PE), se ha sugerido que esta alteración es consecuencia de la isquemia producida por el hematoma<sup>73,75,77</sup>. No obstante, parece que al igual

que en los eventos fisiopatológicos descritos, ciertos productos de la sangre como la **trombina** (a través de su receptor PAR-1), la **fibrina** o el **fibrinógeno** han demostrado ejercer un daño sobre el endotelio y promover la

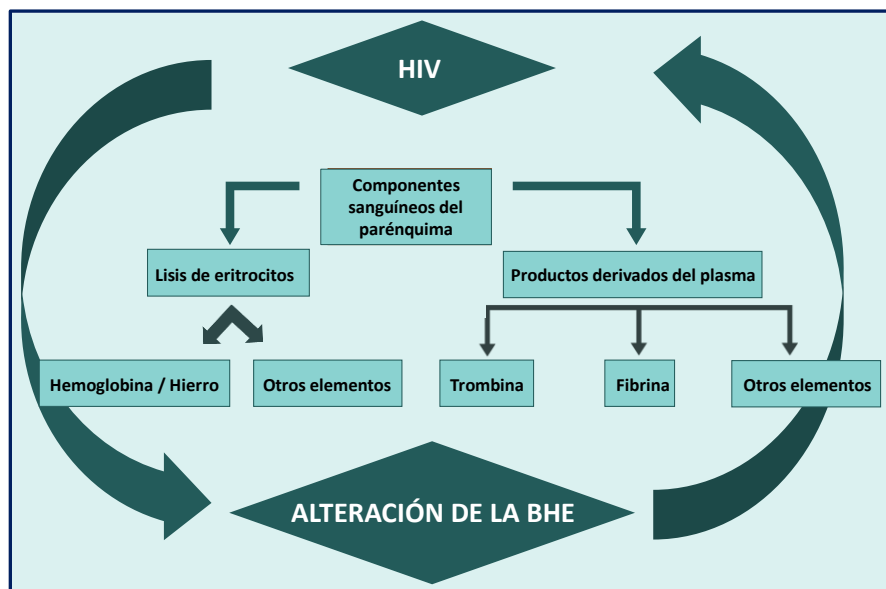


Figura 20. Alteración de la BHE como consecuencia de los componentes de la sangre

posterior infiltración leucocitaria<sup>73,75,77</sup>. De la misma forma, los productos de degradación de eritrocitos como el **hierro**, ha demostrado generar disfuncionalidad en la BHE a través de la generación de radicales libres (radicales superóxido, hidroxilo y peroxinitrito) o alterando las vías de señalización (Fig. 20)<sup>73,75,77</sup>.

Los modelos de ACV *in vivo* e *in vitro* han demostrado que durante todo el proceso de daño en la BHE, gran parte de los elementos que la conforman pueden verse alterados a causa de la inflamación y estrés oxidativo producido<sup>73,75,77</sup>. En las **CEs** que conforman la BHE (particularmente las UEs), se ha demostrado que un aumento en la producción de CO, NO o iNOS pueden modificar estructural y funcionalmente estas proteínas<sup>73,75,77</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de Nfk-B y la posterior liberación de CKs son capaces de aumentar

la expresión de las ya mencionadas **MMPs** (en especial MMP-9), proteasas dependientes de Zinc capaces de alterar la permeabilidad de la BHE alterando las UEs y las uniones adherentes o degradando la laminina y fibronectina que conforma la lámina basal <sup>73,75,77</sup>. Aunque se desconocen los mecanismos exactos, se ha observado que el edema producido en los ACV altera la funcionalidad y expresión de **canales y transportadores** como el receptor Mfsd2a (del inglés, *major facilitator superfamily domain-containing protein 2*), responsables de la homeostasis metabólica y fisiológica del SNC <sup>73,75,77</sup>.

De la misma forma que la expresión de CKs proinflamatorias y la formación de ROS promueven el daño en la BHE, se ha demostrado que la liberación masiva de Glutamato también es un elemento transcendental a la hora de explicar la hiperpermeabilidad de la barrera y la formación de edema citotóxico <sup>73</sup>, ya que tanto los receptores NMDA como los metabotrópicos se expresan en las CEs<sup>73</sup>. Se ha sugerido que la activación de estos receptores produce **la alteración de los transportadores que regulan el flujo de iones** [como el intercambiador de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  (NHE), el contrantransportador  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPasa y  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Cl}^-$ ]; no obstante, se desconoce si este es el proceso por el que la excitotoxicidad ejerce un efecto deletéreo en la BHE durante la HIV <sup>74,93,111,114,115,123</sup>.

Por lo tanto, aunque se desconoce cuáles son los mecanismos exactos que conducen a la alteración en la funcionalidad y estructura de los integrantes de la BHE, es evidente que los eventos fisiopatológicos descritos en el apartado anterior participan directamente en este daño. Asimismo, se ha demostrado que la alteración de la BHE así como la infiltración de células circundantes inician de nuevo la aparición de los eventos fisiopatológicos implicados en la HIV, produciéndose un ciclo continuo donde se promueve el daño y la fisiopatología de esta enfermedad. En este contexto, parece que mantener la integridad de la BHE parece ser un objetivo claro a la hora de reducir la mortalidad y morbilidad de la PCOH<sup>73,75,77</sup>.

### **Consecuencias de la HIV: Daño en la estructura y funcionalidad del SNC**

Como ya se ha mencionado anteriormente, debido a la inmadurez de los precursores oligodendrogiales, la estructura más vulnerable durante la HIV es la SB, siendo la principal afectada del desarrollo de PCI <sup>74,86–88,91</sup>. No obstante, la destrucción del parénquima (como consecuencia del daño oligodendrogial o por la pérdida de sus progenitores en la SVZ) no es el único fenómeno producido. Se ha descrito que pacientes que sufrieron HIV después del parto presentaron una acumulación de depósitos de hemosiderina, gliosis nodular, pérdida de células

ependimarias y la formación de rosetas subependimarias subyacentes en la pared ventricular <sup>74,86-88,91</sup>. Todo esto, sumado al crecimiento de progenitores gliales debido al papel de la nestina o la vimentina, comprometieron la integridad otras vías y estructuras, alterando aún más el funcionamiento del SNC <sup>74,86-88,91</sup>.

Una de las principales consecuencias del daño producido por la HIV es la **modificación en la neurotransmisión de monoaminas**. Las anomalías en el sistema de transmisión monoaminérgico conllevan una menor concentración de neuronas colinérgicas, GABAérgicas y dopaminérgicas en

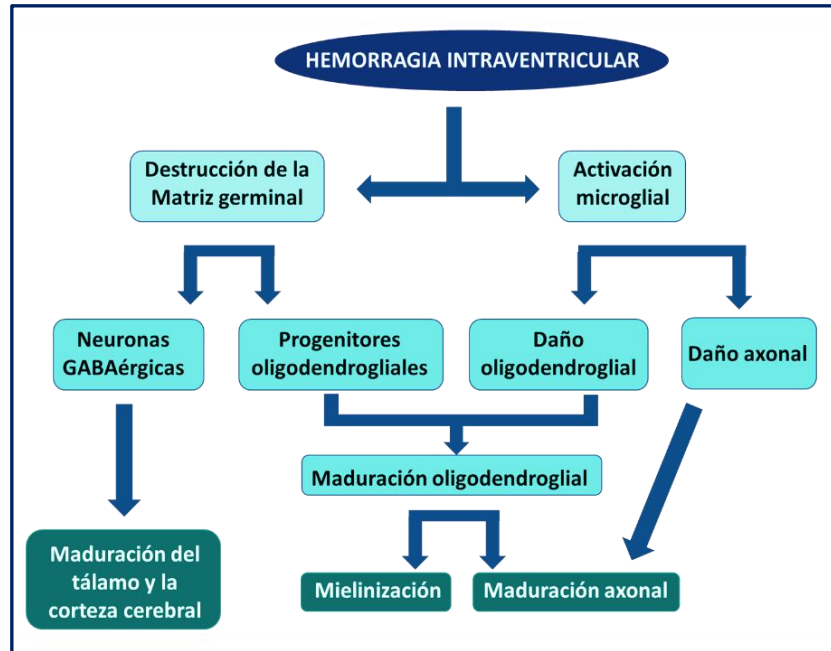


Figura 21. Esquema de las consecuencias a largo plazo producidas por la HIV

regiones cerebrales específicas que alterarán, entre otros aspectos, la conducta del individuo (la prematuridad está estrechamente ligada a trastornos como el trastorno de déficit de atención e hiperactividad [TDAH]) <sup>74,86-88,91</sup>. El **eje hipotalámico-pituitario (HPA)** es otro sistema que, al igual que el **cerebelo**, está expuesto durante el desarrollo de la DVPH, una de las complicaciones más graves de la HIV <sup>74,86-88,91</sup>. Como consecuencia, estos pacientes presentan una secreción anómala de la hormona secretada por la glándula pituitaria, además de deficiencia de la hormona del crecimiento, y niveles de FSH, LH y GnRh más elevadas, asociados con otros trastornos como pubertad precoz y amenorrea <sup>74,86-88,91</sup>. Por otro lado, se han observado pequeños cambios arquitectónicos en **neuronas y dendritas** <sup>74,86-88,91</sup>. En el caso de las neuronas, estas pueden presentar un menor tamaño y organización que, sumado a la reducción en el tamaño y número de las ramas de las dendritas corticales, comprometen drásticamente a la **interacción sináptica** (hecho que se demuestra observando los bajos niveles de la proteína vesicular presináptica sinaptofisina) <sup>74,86-88,91</sup>. No obstante, la afectación de los axones periventriculares parece ser la clave para entender el daño cerebral asociado a la DVPH. Mientras que las neuronas mantienen su integridad morfológica y funcional (a excepción de ciertas alteraciones en la sinaptogénesis), durante la DVPH se produce un **daño axonal**

localizado especialmente en el **sistema límbico (vía fimbria-fórnix) y el CC**, de forma que toda la SB periventricular, incluidos los tractos corticoespinales largos y las capas más profundas, son susceptibles a sufrir un daño<sup>74,80,86-91</sup>. Este fenómeno es el responsable directo de la afectación motora observada en los pacientes con PCI (**Fig. 21**). Por lo tanto, el daño secundario a la HIV no solo produce alteraciones en el número y madurez de progenitores oligodendrogiales que forman parte del parénquima, sino que otros sistemas (como el monoaminérgico) y estructuras (SG) parecen estar implicadas en las secuelas producidas por el daño cerebral adquirido.

**Cuadro 6: Modelos animales de PCOH en prematuros**

Se han propuesto como herramienta diversos modelos animales con el fin de buscar nuevas dianas terapéuticas, especialmente aquellos basados en la inyección de sangre autóloga o en la modificación de las propiedades hemodinámicas del individuo<sup>74,171-174</sup>; lamentablemente, ninguno de ellos ha logrado reproducir de manera eficaz la fisiopatología ni las consecuencias funcionales ni anatómicas observadas en el ser humano<sup>74,171-174</sup>. En la **Tabla 3** se describen los modelos animales utilizados en el estudio de la HIV así como sus ventajas y desventajas.

MODELOS ANIMALES ACTUALES DE LA PCPH <sup>74,171</sup>			
Animal	Modelo	Ventajas	Desventajas
<b>Roedores</b>	Inyección de sangre autóloga o Colagenasa en la región periventricular	Presencia de una MG en el periodo postnatal, neurodesarrollo bien documentado y es económico	Fisiología y anatomía diferente al ser humano.
<b>Conejos</b>	Inyección i.p. de glicerol para producir hipotensión intracraneal, hiperosmolaridad o diuresis	Inmadurez de los vasos sanguíneos en la MG.	Desarrollo de la hemorragia inconsistente y difusa
<b>Oveja</b>	Asfixia con hipertensión arterial y venosa en fetos.	Vasculatura de la MG similar al humano	Cerebro maduro al nacer, hemorragia variable, anatomía diferente al ser humano
<b>Cerdos</b>	Inyección de sangre autóloga	Facilidad a la hora de conocer la fisiopatología del daño cerebral	Cerebro maduro en el neurodesarrollo
<b>Perros</b>	Alteración de la función hemodinámica o asfixia a las 24-48 h post-parto	Muchos estudios relacionados con la HIV y su gran tamaño permite conocer la fisiopatología más fácilmente	Variabilidad de la hemorragia, limitaciones anatómicas y estudios neuroconductuales limitados
<b>Primates</b>	Desarrollo espontaneo en prematuros	Muy similar al ser humano	Ética y económicamente incompatible

**Tabla 3. Modelos preclínicos que reproducen la HIV**



# BUSQUEDA DE UN TRATAMIENTO QUE PREVENGA LA PCOH

## *Tratamientos actuales*

La ausencia de modelos animales válidos sumada al diagnóstico tardío de la HIV, han hecho que actualmente no exista un tratamiento realmente eficaz que logre prevenir el daño y las secuelas producidas. A día de hoy los tratamientos aprobados se utilizan desde el periodo **prenatal**, con el objetivo de prevenir la rotura de la MG así como la difusión del sangrado una vez se produce el parto, o **postnatal**, intentando reducir la potencia de los eventos fisiopatológicos desencadenados y reducir así sus secuelas<sup>100-105</sup>.

Una vez establecida la HIV, el manejo de las complicaciones depende de su localización y gravedad. Por ejemplo, si el sangrado se limita a la región subependimaria, su evolución permite que la situación se resuelva sin necesidad de intervenir; sin embargo, si la hemorragia afecta a regiones parenquimatosas (dando lugar a DVPH), es necesario actuar con urgencia<sup>100-105</sup>. En los casos en los que esta complicación no se resuelve de manera espontánea (generalmente en el 65% de los casos), los pacientes requieren el uso de terapias quirúrgicas entre las que destacan la **inyección de estreptoquinasa intraventricular, punciones lumbares y ventriculares repetidas, y la técnica de DRIFT** (drenaje, irrigación y terapia fibrinolítica), todo ello mediante un seguimiento constante de la evolución de la hemorragia<sup>100-105</sup>. Sin embargo, a pesar de reducir la evolución y severidad de la DV, estas terapias no ejercen ningún efecto sobre las secuelas (motoras y cognitivas) a largo plazo<sup>100,102,104,105</sup>.

A causa del fracaso de las intervenciones quirúrgicas a la hora de paliar las secuelas de los pacientes, inicialmente se propuso el uso de **corticoides prenatales** con el objetivo de prevenir la aparición de HIV, ya que se ha observado que estos agentes terapéuticos son capaces de promover la maduración de los vasos de la MG al aumentar la expresión de pericitos y la proteína ácida fibrilar glial (del inglés, GFAP), marcador específico de células astrogliales, controlar la angiogénesis exacerbada y prevenir el síndrome de dificultad respiratoria controlando el FSC. Sin embargo, este tratamiento no mostró signos de mejora significativos en gran parte de los

pacientes<sup>100-105</sup>. Por ello, al uso de los corticoides prenatales se añadió el **sulfato de magnesio**, un compuesto capaz de reducir la incidencia de PCI mediante la modulación de la entrada de Calcio y Glutamato, reducción de la inflamación y estrés oxidativo, y aumento de la agregación plaquetaria<sup>100-105</sup>.

Dado que la HIV es una enfermedad cuya incidencia se centra generalmente en los países en vías de desarrollo, el seguimiento y tratamiento prenatal resulta de gran dificultad. Por este motivo, se han utilizado otros compuestos en el periodo postnatal con el objetivo de prevenir el desarrollo de este daño y la aparición de secuelas como la PCI<sup>100-105</sup>. La **indometacina** es un inhibidor de la enzima COX (1 y 2) utilizada comúnmente en prematuros para cerrar el conducto arterioso permeable, pero que también se aplica para prevenir la HIV (su posible potencial terapéutico sobre la HIV se debe al control que ejerce sobre el FSC y estabilidad de la BHE)<sup>100,102,104,105</sup>. Lamentablemente, al igual que ocurría con los corticoides prenatales, actualmente la indometacina no está recomendada, ya que no sólo no parece mejorar el pronóstico del individuo, sino que su uso puede producir efectos adversos como enterocolitis necrosante o enfermedad pulmonar crónica<sup>100,102,104,105</sup>. Con propiedades similares encontramos al **ibuprofeno**, que a pesar de tener una menor cantidad de efectos adversos (insuficiencia renal, trombocitopenia, hiponatremia, etc.), no parece prevenir las secuelas posthemorrágicas<sup>100,102,104,105</sup>. Otro de los fármacos utilizados es el **fenobarbital**, gracias a sus propiedades antioxidantes y su efecto sobre la presión arterial; no obstante, parece que al igual que en casos anteriores, su uso no parece reducir la incidencia de la PCOH<sup>100,102,104,105</sup>. Por otro lado encontramos el **Factor VII activado**, capaz de promover la agregación plaquetaria y por tanto controlar el volumen de sangrado. No obstante, parece que la aplicación en sí de este compuesto ofrece un efecto bastante limitado, siendo únicamente relevante al usarse como coadyuvante de otros compuestos<sup>100,102,104,105</sup>. Por último, existen otros fármacos que, aunque actualmente se encuentran en estudio, no han tenido un gran éxito a la hora de prevenir el desarrollo de la HIV. Este es el caso del **etamsilato** (promueve la adhesión plaquetaria y aumenta la estabilidad de la membrana basal), la **vitamina E** (antioxidante) o el **pavulon** (previene la respiración asincrónica y las alteraciones en la oxigenación y las fluctuaciones del flujo sanguíneo)<sup>116,118,120,12</sup>. A su vez, otras terapias como la eritropoyetina, el uso de células madre, la cafeína o el surfactante sintético, han contribuido a disminuir la incidencia de complicaciones ventilatorias y la muerte del PE, aunque no se ha obtenido ningún resultado beneficioso a la hora de prevenir la PCPH<sup>100,102,104,105</sup>.

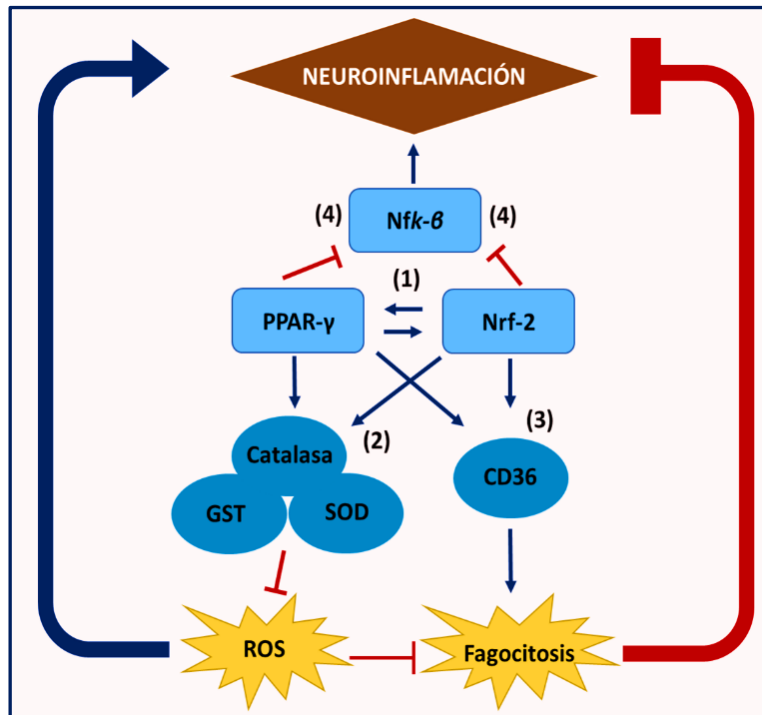
Por tanto, dado que ni las terapias farmacológicas ni quirúrgicas parecen ser eficaces sobre la PCOH, se pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas dianas terapéuticas que permitan mitigar los efectos deletéreos de esta.

### ***Dianas terapéuticas endógenas implicadas en la HIV***

Durante la HIV, el organismo inicia una serie de mecanismos protectores endógenos con el objetivo de neutralizar el daño producido. Debido a la ausencia de un tratamiento eficaz, sería interesante investigar estos mecanismos de respuesta endógena por parte del organismo para tratar de identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar tratamientos verdaderamente efectivos, e incluso potenciar este efecto protector que se desarrolla tras el daño. En este sentido, se ha demostrado que la polarización de la **microglía y macrófagos** hacia un fenotipo de activación neuroreparador disminuye la inflamación, el estrés oxidativo y la liberación de hierro, encargándose así de promover la fagocitosis de los coágulos sanguíneos después del sangrado <sup>83,95,111</sup> y de mejorar los déficits neurológicos a corto y largo plazo <sup>83,95,111</sup>. Se ha descrito la implicación de varios receptores en esta función protectora, por lo que a continuación, vamos a destacar los más relevantes.

El **receptor CD36** es una glucoproteína transmembrana que se encuentra en la superficie varios tipos de células, incluidos monocitos, células endoteliales y microglía <sup>83,95,111</sup> jugando un papel esencial en la fagocitosis del hematoma <sup>83,95,111</sup>. Además, se ha observado que la deficiencia de CD36 podría conducir a la sobreexpresión de TLR4, responsable de la liberación de mediadores proinflamatorios y de la polarización de la microglía a su fenotipo M1 <sup>83,95,111</sup>. Otros de los receptores que median la función reparadora de la microglía y/o los macrófagos son los Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR, por sus siglas en inglés) y los Factores nucleares 2 derivados del eritroide 2 (Nrf-2, por sus siglas en inglés) <sup>83,95,111</sup>. La estimulación **PPAR-γ** se ha asociado directamente con la eliminación del hematoma y la posterior mejora funcional, debido a su función antiinflamatoria (regula la liberación de CKs como TNF-α o IL-1β), antioxidante (aumenta la expresión de SOD y catalasa) y fagocítica (promueve la expresión de CD36) <sup>83,95,111</sup>. Como se detalla en la **Figura 22**, recientemente se ha demostrado que el receptor PPAR γ se estimula indirectamente, a través de Nrf-2 <sup>83,95,111</sup>. **Nrf2** es un factor transcripcional que promueve la transcripción de genes antioxidantes (quinina

oxidorreductasa 1, glutatión S-transferasa, Glutamato-cisteína ligasa, glutatión peroxidasa y hemo oxigenasa 1 [HO-1] y fagocíticos (CD36)<sup>83,95,111</sup>.



**Figura 22. Interacciones entre las vías PPAR $\gamma$  y Nrf2.** (1) Existe una interacción recíproca entre PPAR $\gamma$  y Nrf2. PPAR $\gamma$  puede aumentar la expresión de Nrf2 y viceversa. (2) PPAR $\gamma$  y Nrf2 aumentan sinérgicamente la expresión de algunos antioxidantes, como la catalasa, SOD y GST. Estas proteínas inhiben la generación de ROS, mitigando así la neuroinflamación y mejorando la eliminación de desechos. (3) CD36 es fundamental para la fagocitosis microglial y la posterior eliminación de desechos, los cuales facilitan la resolución de la neuroinflamación. (4) PPAR $\gamma$  y Nrf2 inhiben sinérgicamente NF- $\kappa$ B, la principal vía proinflamatoria. *Adaptado de Cai et al. 2018*

Las células del sistema inmune no son los únicos mediadores endógenos implicados en la recuperación de la HIV. Además de participar en el desarrollo de los eventos fisiopatológicos, los componentes de la sangre podrían jugar un importante papel en la protección y prevención de la HIV. La **haptoglobina** y la **hemopexina** son proteínas plasmáticas hepáticas que se encargan de unir la Hb y el grupo hemo respectivamente y eliminarlos a través de la microglía (a través del receptor CD163) y de los macrófagos (a partir de CD91)<sup>83,95,111</sup>. Por otro lado encontramos a la **HO-1** y la **biliverdina reductasa**, que aunque cuyo papel en la HIV está aún por determinar, parece que un aumento controlado de su expresión promueve la supervivencia astrocitaria y mejora la función antioxidante<sup>83,95,111</sup>.

Por lo tanto, el aumento de expresión de todos estos marcadores endógenos nos aporta la información necesaria para dirigir la búsqueda de un tratamiento que permita promover la fagocitosis del hematoma y la expresión de enzimas antiinflamatorias, antioxidantes y antiexcitatorias son de vital importancia a la hora de prevenir la PCOH. En este sentido, parece

que la polarización de la microglía y macrófagos hacia un fenotipo M2 podría ser la solución más efectiva. Son muchos los estudios dirigidos a producir este efecto, sin embargo, como se explicará a continuación, nuevas investigaciones han demostrado el importante papel del **Sistema Cannabinoide Endógeno (SEC)** a la hora de promover un efecto protector mediante la modulación del sistema inmune en numerosas patologías.

### ***El SEC como posible herramienta para reducir la fisiopatología de la HIV***

El término “**cannabinoide**” ha sido utilizado de forma tradicional para definir un grupo de moléculas químicas presentes en la naturaleza de forma exclusiva en el género *Cannabis*. Sin embargo, en función de su naturaleza, los cannabinoides como tal se puede categorizar en **fitocannabinoides** (cannabinoides derivados de la planta), **endocannabinoides** (moléculas endógenas sintetizadas por el organismo similares a los fitocannabinoides) y **cannabinoides sintéticos** (análogos cannabinoides sintetizados en un laboratorio). Las propiedades de estos compuestos ha hecho que sean ampliamente utilizadas para el tratamiento de enfermedades de amplio espectro y la rehabilitación y recuperación de varios subtipos celulares <sup>175</sup>. En este contexto, a continuación se valora la evidencia clínica y farmacológica que permite considerar a los derivados de tipo cannabinoide (naturales, sintéticos y endógenos), así como toda su maquinaria metabólica (**Cuadro 7**) como entidades necesarias para el tratamiento de diversas patologías <sup>176,177</sup>.

Las propiedades inherentes del SEC (presenta un papel muy importante en la homeostasis y el mantenimiento tanto del SNC como del Sistema Nervioso Periférico [SNP]) y su modulación hacen que se convierta en una posible diana terapéutica en infinidad de patologías (**Fig. 23**) <sup>176,177</sup>. Por ejemplo, a día de hoy ya se están llevando diferentes ensayos en numerosas enfermedades asociadas con la **emesis** secundaria a los tratamientos de quimioterapia <sup>178,179</sup>, **dolor de tipo inflamatorio y neuropático** <sup>180-182</sup>, **trastornos psiquiátricos** debido a sus propiedades ansiolíticas y antipsicóticas <sup>183</sup>, **cáncer** al regular la migración celular y las vías de supervivencia celular <sup>184-190</sup>, **adicción** al regular el sistema de recompensa <sup>191-193</sup>, **enfermedades metabólicas** como la diabetes o la obesidad al actuar sobre el sistema de recompensa o el eje hipotálamo-hipofisario <sup>176</sup> y **otros sistemas como el vascular** <sup>194</sup>, **a gastrointestinal** <sup>195</sup>, **el tracto urinario** <sup>196</sup>, **en enfermedades respiratorias** <sup>197</sup>, etc. Sus propiedades pleiotrópicas, así como su localización y aumento de expresión en todos los sistemas del organismo, hacen que este se postule como herramienta terapéutica para el tratamiento de patologías de diversa índole <sup>176,177</sup>.

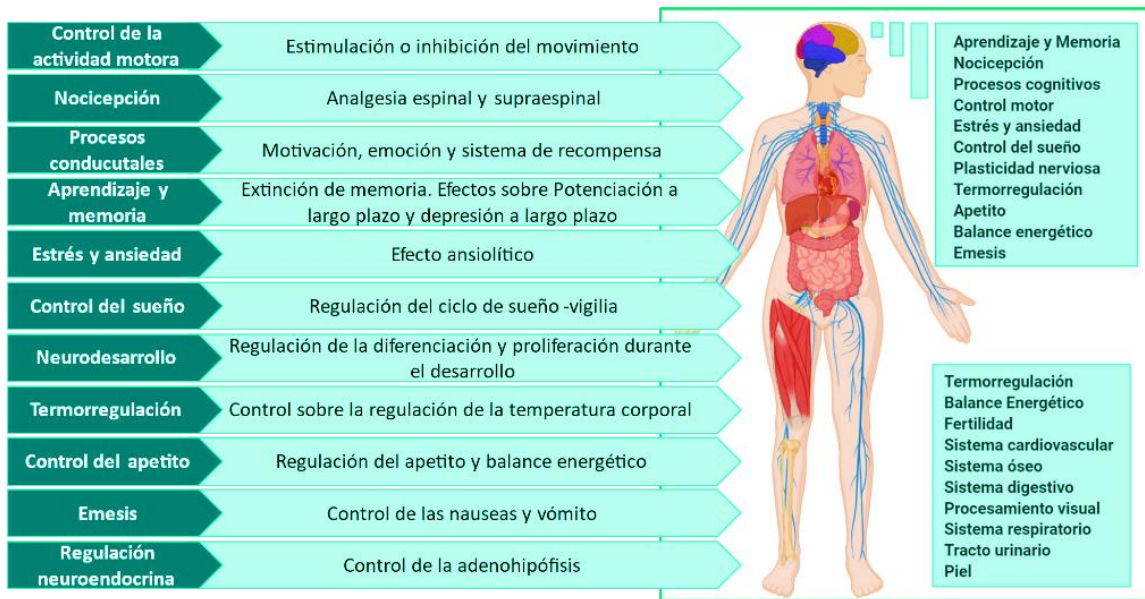


Figura 23. Procesos fisiológicos principales en los que participa el SEC y función que desempeña.

En el caso de las **enfermedades neonatales** como la encefalopatía HI o el *stroke*, también se ha demostrado una sobreexpresión de los elementos del SEC, posiblemente actuando como mecanismo neuroprotector endógeno<sup>198,199</sup>. En primer lugar, los niveles de AEA y 2-AG y otros endocannabinoides similares como la oleoiletanolamida (OEA) y la palmitoiletanolamida (PEA) aumentan poco después del daño isquémico cerebral tanto en adultos como en RN<sup>200,201</sup>. Dado que la AEA y la OEA presentan un papel muy importante sobre las propiedades de la permeabilidad de la BHE, se ha sugerido que estas ejercen un efecto protector sobre ella<sup>202</sup>. Por otro lado, el aumento en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> en la SVZ 48 horas después del daño, y un aumento repentino del receptor CB<sub>1</sub> en modelos *in vitro* de privación de oxígeno y de glucosa han permitido relacionar la implicación de los receptores del SEC en el daño cerebral neonatal<sup>203,204</sup>. Además, parece que el SEC podría jugar un papel vital como mecanismo de defensa en enfermedades neonatales debido a su efecto sobre la **excitotoxicidad**<sup>205-207</sup>, **modulación del calcio**<sup>208,209</sup>, su efecto **antiinflamatorio**<sup>210-212</sup>, **antioxidante**<sup>213,214</sup>, **su capacidad reguladora de factores neurotróficos**<sup>215</sup>, **efecto sobre la autofagia**<sup>216</sup>, **control sobre la temperatura corporal**<sup>217</sup>, **efectos vasodilatadores**<sup>218</sup>, o la **neurogénesis**<sup>219</sup>.

**Cuadro 7: Componentes del Sistema Endocannabinoide**

El **Sistema Cannabinoide Endógeno (SEC)** es un sistema de comunicación entre células responsable de la modulación de múltiples procesos fisiológicos. Como se observa en la **Figura 24**, este sistema se compone de receptores, ligandos específicos (los llamados endocannabinoides) y la maquinaria enzimática responsable de la síntesis y degradación de los endocannabinoides, la cual modula el tono endocannabinoide en el organismo. Las principales enzimas de síntesis de los endocannabinoides son la **Fosfolipasa D específica de N-acil fosfatidiletanolamina (NAPE-PLD)**, responsable principal de la síntesis de la araquidonoletanolamida, también llamada **Anandamida (AEA)**, y la **diacilglicerol lipasa (DAGL)**, responsable de la síntesis del **2-araquidonoilglicerol (2-AG)**. Estas dos moléculas son los principales ligandos del SEC, y a través de la activación de los denominados receptores cannabinoides, median sus efectos fisiológicos. Los principales receptores cannabinoides son **los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>**, acoplados principalmente a proteínas Gi/O, por lo que su activación generalmente conduce a una señalización de tipo inhibitoria. Además, los endocannabinoides pueden mediar su efecto por la activación de otros receptores celulares como los **GPR55, GPR18 o GPR119**, los **receptores de potencial transitorio (TRPs)**, y los ya mencionados receptores nucleares PPAR. Los procesos de finalización de señal endocannabinoide se producen por su rápida degradación mediante las enzimas específicas de degradación. La **enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH)** es la responsable principal de la degradación de la AEA, mientras que la **monoacilglicerol lipasa (MAGL)** se encarga de la degradación del 2-AG. Además, estas enzimas se encargan de la degradación de otras moléculas de señalización que participan en este sistema (N-acetiletanolaminas y 2-oilgliceroles).

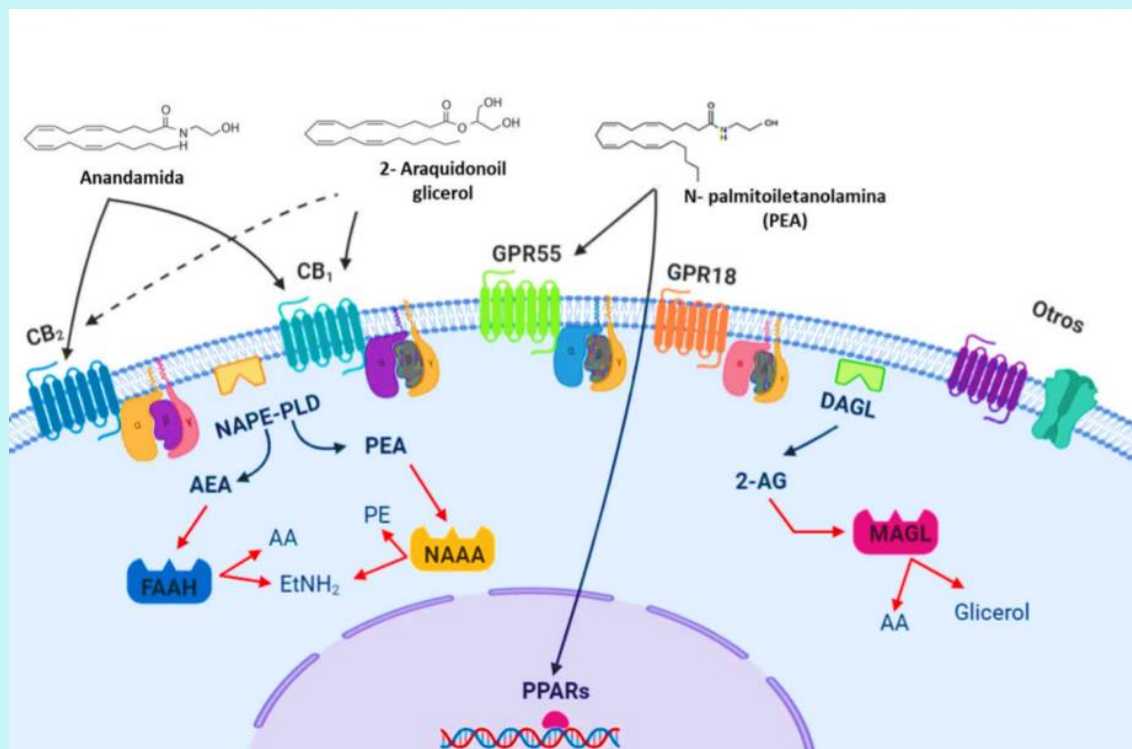


Figura 24. Principales vías de síntesis y degradación del SEC

## ***CBD como posible estrategia terapéutica***

La especie *Cannabis sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes, de los cuales más de 90 son fitocannabinoides. Los dos fitocannabinoides más abundantes en la planta, **el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) y el cannabidiol (CBD)**, han suscitado especial interés en la clínica, convirtiéndose en los más estudiados como posible herramienta terapéutica en diversas enfermedades neurológicas. El  $\Delta^9$ -THC es un agonista parcial tanto de CB<sub>1</sub> como de CB<sub>2</sub>, y actúa además sobre otras dianas moleculares ejerciendo un potente efecto antiinflamatorio, antineoplásico, analgésico, relajante muscular, antioxidante, etc. Sin embargo, se han documentado diversos efectos adversos relacionados con su administración como la ansiedad, depresión o la pérdida de memoria, siendo su uso un tema bastante controvertido<sup>175,180,195,220</sup>. Por otro lado destaca el **CBD**, producto derivado del ácido cannabidiólico (CBDA) que posee una gran variedad de propiedades farmacológicas<sup>221</sup>. En este contexto, nuestro grupo ha demostrado el papel neuroprotector del CBD en la encefalopatía hipóxico isquémica (EHI) neonatal, estando a día de hoy en fases muy avanzadas de ensayos clínicos (GWEP1560; EudraCT: 2016-000936-17).

El CBD fue el primer constituyente aislado de la planta del cannabis en los años 30, aunque hasta 1963 no fue identificada su estructura química<sup>181</sup>. Considerada molécula “hermana” del  $\Delta^9$ -THC, cuya maquinaria biosintética es prácticamente idéntica, este compuesto carece de actividad psicotrópica, aunque sí un alto potencial terapéutico. El CBD ha demostrado tener una potente actividad antioxidante y antiinflamatoria, inhibe la liberación de calcio y la recaptación e hidrólisis de endocannabinoides, reduce la liberación de Glutamato, y modula la actividad de diferentes receptores como los 5HT<sub>1A</sub> y PPAR- $\gamma$ <sup>222,223</sup>. En este sentido, debido al complejo perfil farmacológico que presenta, se ha demostrado su efectividad frente a la inflamación, ansiedad, depresión, psicosis, convulsiones, náuseas, entre otros. Además, presenta un gran poder antioxidante y potencial neuroprotector<sup>224–226</sup>.

El uso de CBD en modelos *in vitro* e *in vivo* ha demostrado ejercer efectos protectores sobre los mecanismos implicados en la encefalopatía HI en neonatos. Por ejemplo, la administración de CBD en modelos *in vitro* basados en privación de glucosa y oxígeno muestran una potente función anti-apoptótica al reducir la expresión de las caspasas<sup>227</sup>. A su vez, estudios *in vivo* en modelos murinos y porcinos han demostrado que la administración de CBD es capaz de prevenir la aparición de una sintomatología similar a la PCI secundaria al daño HI o *stroke*<sup>199,228,229</sup>.

Esto se debe principalmente al efecto neuroprotector que presenta el CBD tanto a nivel neuronal como a nivel glial en estos modelos animales<sup>229-232</sup>. El CBD administrado postnatalmente es capaz de reducir la muerte neuronal, la activación y daño astrogial y el posterior daño tisular<sup>199,233,234</sup>. A su vez, se ha demostrado que el CBD es capaz de inactivar la microglía y de polarizarla hacia un fenotipo M2<sup>198,234</sup>. Todo esto, producía un efecto sobre el oligodendrocito y la mielina a largo plazo, previniendo así el daño en la SB y las secuelas motoras y cognitivas<sup>199</sup>.

Los estudios en espectroscopia llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que tanto *in vitro* como *in vivo* este fitocannabinoide previene la liberación de Glutamato y la **excitotoxicidad** en el daño cerebral neonatal<sup>199,200,229</sup>. A su vez, debido a sus propiedades estructurales, el CBD es capaz de ejercer una función **antioxidante** mediante la recaptura de las ROS producidas y mediante la prevención del consumo de glutatión reducido. Como ya hemos mencionado, el CBD es capaz de modular la activación y el fenotipo microglial, alterando así la liberación de CKs proinflamatorias<sup>199,200,229</sup>. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el CBD es capaz de prevenir la síntesis y expresión de IL-1, TNF- $\alpha$  o COX-2. Se ha propuesto que esta propiedad **antiinflamatoria** del CBD está mediada por la activación del receptor PPAR- $\gamma$ . Esto se debe a que la activación de PPAR- $\gamma$  promueve el efecto inhibitorio de mTOR (principal activador de la autofagia en la fisiopatología del daño HI) de CBD<sup>202,214</sup>. Por tanto, el efecto neuroprotector del CBD se debe a la prevención de la pérdida oligodendroglial y no al aumento de la expresión de factor neurotróficos como el BDNF y el GDNF<sup>199,228,235</sup>.

Aunque el CBD es considerado uno de los cannabinoides más importantes, este no actúa directamente a través de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. No obstante, se ha observado que la coadministración del CBD con un antagonista CB<sub>2</sub> hace que desaparezca el efecto neuroprotector de este, sugiriendo que podría estar ejerciendo una modulación indirecta de este receptor<sup>200</sup>. En este sentido, se ha descrito una relación entre los receptores cannabinoides y de serotonina **5HT1A**<sup>200</sup>, diana bien identificada del fitocannabinoide CBD. De manera similar a lo que ocurría con el receptor CB<sub>2</sub>, se ha observado que el bloqueo de este receptor serotoninérgico revierte por completo la función neuroprotectora del CBD. Por tanto, se ha propuesto que la modulación que ejerce el CBD sobre el receptor CB<sub>2</sub> se debe a que este receptor forma heterómeros con el receptor 5HT1A. Esta hipótesis fue posteriormente demostrada al descubrir que la expresión de este heterómero era más elevada en el cerebro inmaduro, y que esta aumentaba aún más tras el daño cerebral. Por otro lado, se han propuesto otros receptores con los que podría interactuar el CBD y que podrían tener un papel importante en la encefalopatía HI como el GPR55, TRPV1 o A2A<sup>200,227,236</sup>.

Por tanto, debido a la similitud en la fisiopatología de la HIV con otras patologías neonatales inductoras del daño en la SB y de la PCI, y al efecto neuroprotector del CBD (Fig. 25), este se ha postulado como un posible tratamiento que permita prevenir la PCPH en el PE.

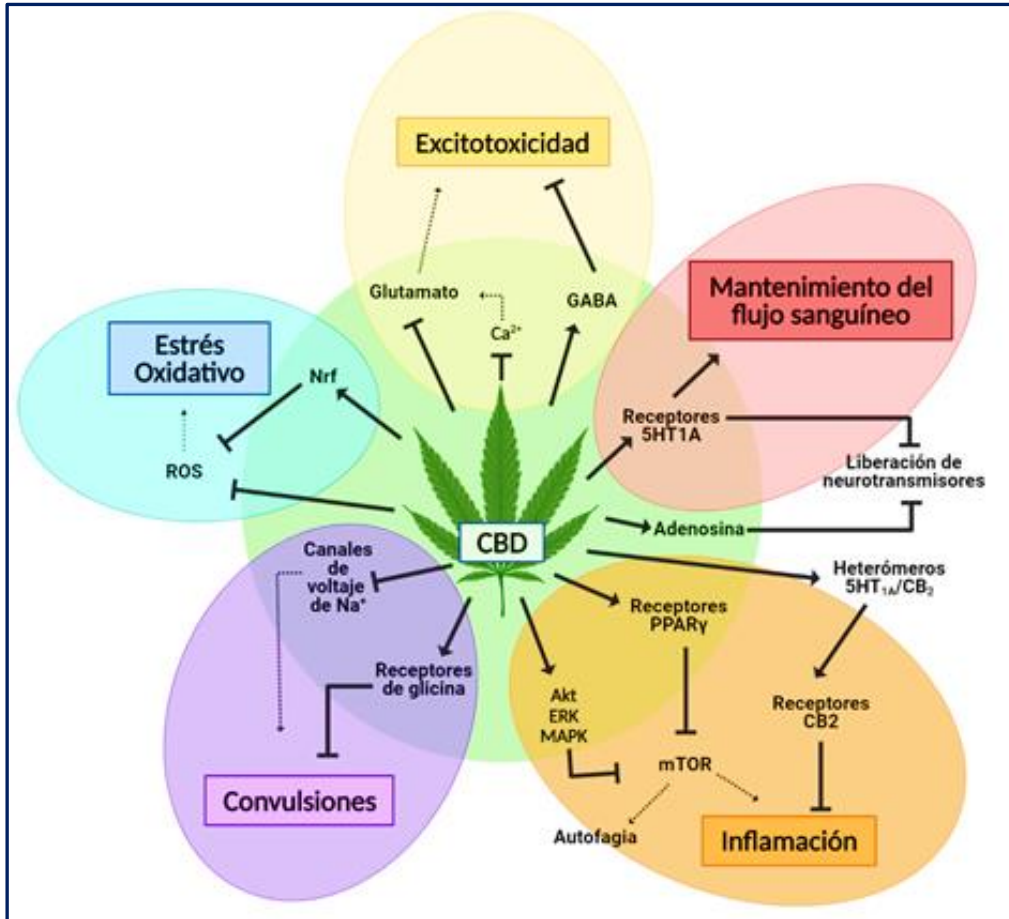


Figura 25. Propiedades neuroprotectoras del CBD en la EHI



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Como se ha descrito anteriormente, hoy en día no existe ningún modelo animal que permita reproducir la fisiopatología de la PCOH en el PE y/o NEBP. A su vez, la ausencia de un tratamiento eficaz requiere la búsqueda de fármacos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias o antiexcitatorias que permitan prevenir su desarrollo. En este trabajo, se propone para este fin el CBD, un fitocannabinoide que aúna todas esas cualidades y ha sido utilizado previamente en patologías neonatales similares.

La **HIPÓTESIS** de este trabajo es que la HIV producida mediante la inyección paraventricular de colagenasa en ratas de un día de edad inducirá un deterioro motor y cognitivo a largo plazo similar al que ocurre en los EBPN, que será reducido por el tratamiento con CBD, según sus propiedades neuroprotectoras relacionadas con la modulación de la inflamación, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad, evitando así la afectación de la mielinización así como la disfunción de la UNV.

En este sentido, los **OBJETIVOS** que se llevaran a cabo para demostrar la hipótesis planteada son:

- 1- Desarrollar y caracterizar un nuevo modelo animal que reproduzca de manera eficaz la fisiopatología y manifestaciones clínicas de la PCOH en el EBPN mediante la inyección paraventricular de *Colagenasa de Clostridium*.
- 2- Determinar si el tratamiento con el fitocannabinoide CBD evita el desarrollo de un cuadro similar a la PCOH. Para ello, este fármaco se administrará tras la inducción del daño (en una o tres dosis), prenatalmente o combinando ambas estrategias. Posteriormente se determinará cuál es la mejor forma de tratamiento.
- 3- Caracterizar los mecanismos por los que el fitocannabinoide CBD ejerce su efecto neuroprotector en este modelo animal.

Para abordar estos objetivos específicos, se realizaron los Diseños Experimentales que se describen a continuación.



The background features abstract, overlapping geometric shapes in various shades of orange, creating a dynamic and modern aesthetic. The shapes are primarily triangles and polygons, some with gradients, set against a white background.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# DISEÑOS EXPERIMENTALES: JUSTIFICACIÓN Y BASES TEÓRICAS

## ***Diseño experimental 1: Validación de un modelo animal de HIV***

Anteriormente mencionamos como los diferentes modelos animales nos han permitido conocer parte de la fisiopatología de la PCOH. Sin embargo, sus numerosas desventajas han obligado a caracterizar y desarrollar un modelo animal en el que las secuelas, los eventos fisiopatológicos, y el estado madurativo del individuo sea totalmente extrapolable al del PE. De manera novedosa, en la última década se propuso un nuevo modelo basado en la inyección de ***Colagenasa de Clostridium*** en roedores<sup>74,171-174</sup>. La *Collagenasa de Clostridium* es una enzima intracelular proteolítica que cataliza la hidrólisis del colágeno (un componente de la lámina basal de los vasos sanguíneos<sup>74,171-174</sup>) y produce la rotura de los capilares y el posterior sangrado de manera espontánea<sup>74,171-174</sup>. La simpleza y reproducibilidad (las alteraciones anatómicas y funcionales observadas son similares a las del ser humano) hacen de este modelo una herramienta que permite conocer de manera más precisa los eventos fisiopatológicos implicados y por tanto potenciar la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas<sup>74,171-174</sup>. No obstante, al igual que en casos anteriores, este modelo presenta numerosas limitaciones<sup>74,171-174</sup>, siendo la edad de las crías (7 días de edad) la más relevante. Por ello, a continuación, explicaremos las novedades introducidas en nuestro modelo animal, así como las técnicas utilizadas para describir las consecuencias y eventos biomoleculares que suceden.

Basándonos en el modelo animal desarrollado por Lekic y cols.<sup>237</sup>, inyectamos paraventricularmente *Colagenasa de Clostridium* en el cerebro de **crías de rata en periodo postnatal de un día (del inglés, PND 1), equivalente a un niño de entre 23-25 semanas de EG (o PE)**<sup>238</sup>. Con el objetivo de evitar la inflamación y traumatismo producidos por la propia inyección, utilizamos una jeringa *Hamilton* con un calibre de 33 G, de forma que todo el daño producido era debido únicamente a la rotura espontánea de los vasos que conforman la MG.

Previamente al estudio de la fisiopatología y secuelas producidas en nuestro modelo animal, se llevó a cabo una serie de pruebas para determinar la cantidad de enzima que debía añadirse. En

el modelo descrito por Lekic, la cantidad de *Colagenasa de Clostridium* inyectada en ratas de 7 días de edad era de 0.3 U. Puesto que el tamaño, peso y neurodesarrollo de nuestros animales era significativamente inferior, fue necesario ver el efecto que tenía sobre el animal la inyección de cantidades de enzima menores. En este sentido, evaluamos el volumen de hemorragia producida 72 horas después de inyectar **0.1, 0.2 y 0.3 U**. Mientras que los animales que recibieron la inyección de 0.1 U de *Colagenasa de Clostridium* apenas presentaban daño, los animales a los que se les inyectó 0.3 U presentaban una hemorragia que abarcaba prácticamente la totalidad del cerebro. Por ello, debido a la heterogeneidad y similitud con la lesión producida en el ser humano, tomamos la dosis de **0.2 U** como la más válida para realizar esta Tesis doctoral.

Una vez establecido el procedimiento quirúrgico, procedimos a realizar el análisis del volumen de la hemorragia y sus consecuencias. Por ello, decidimos analizar los eventos fisiopatológicos en **tres estados madurativos diferentes (PND 6, 14 y 45)**. En cada punto se midió por RM el volumen de lesión, así como el análisis de diferentes marcadores que pudiesen indicar un posible daño cerebral mediante **técnicas de Citometría de flujo (CF), Bioquímica (BQ), Espectroscopía (H+ MRS) o Inmunohistoquímica (IHQ)**. Finalmente, mediante estas mismas técnicas, evaluamos si los animales lesionados presentaban alteraciones neuroanatómicas en la SB y UNV, además de un posible déficit neuroconductual tanto a medio (PND 14) y largo (PND 45) plazo (**Fig. 26**).

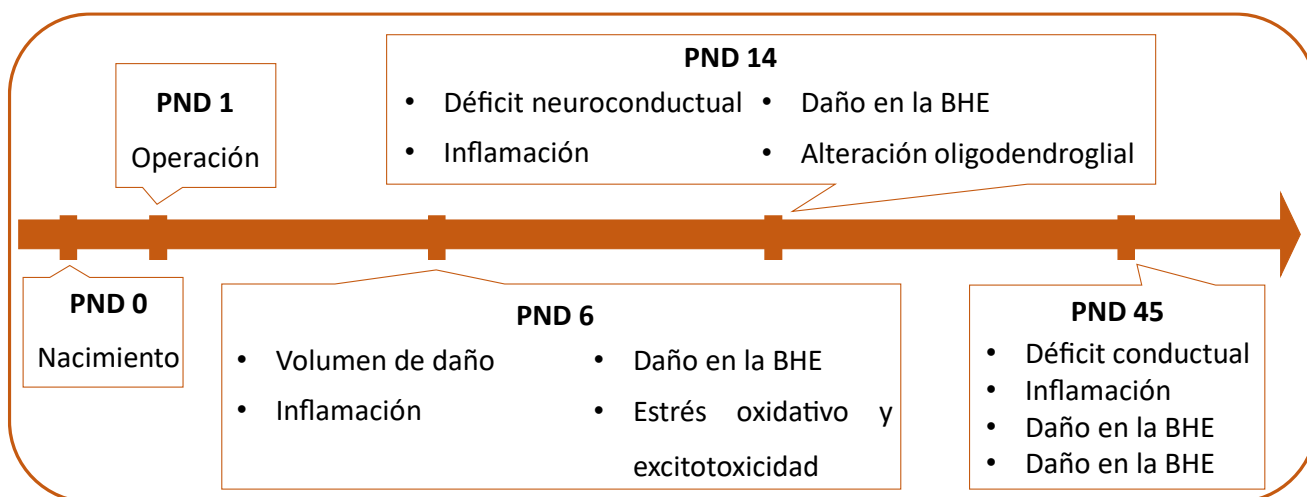


Figura 26. Esquema representativo del Diseño Experimental 1

## **Diseño experimental 2: Efecto terapéutico del CBD**

Como se ha ido mencionando a lo largo de esta Tesis doctoral, hoy en día la PCOH carece de una terapia eficaz. Por ello, debido a los excelentes resultados obtenidos en patologías similares, evaluamos si el tratamiento con el fitocannabinoide CBD era capaz de prevenir la fisiopatología y secuelas producidas por la inyección de *Colagenasa de Chlostridium*.

En primer lugar, quisimos analizar si al igual que ocurría en otros daños cerebrales neonatales, la **administración postlesional de CBD** reducía el daño producido por la HIV. Para ello, los animales lesionados recibieron **una única dosis de este fármaco a las 6 h** después de la operación. Posteriormente, se evaluó por RM el volumen del daño a corto (PND 6) y largo plazo (PND 45), la neuroinflamación y las posibles consecuencias conductuales y anatómicas.

De forma similar, se llevó a cabo una aproximación que determinase la **ventana terapéutica** o de **oportunidad** en la que el CBD era capaz de seguir ejerciendo un efecto neuroprotector. Para ello, iniciamos el tratamiento con este compuesto a las 18, 24 y 48 h tras producirse la lesión. Los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos cuya administración de CBD se dio a las 6 h. De esta forma, no sólo determinamos el punto en el que el CBD presentaba un efecto máximo en la fisiopatología de la HIV, sino que también pudimos establecer el momento idóneo para empezar el tratamiento.

Una vez observado el efecto protector del CBD administrado postlesionalmente en una única dosis, se evaluó si la administración de este derivado fitocannabinoide en múltiples dosis (6, 24 y 48 h después de la HIV consecutivamente) potenciaba el efecto neuroprotector observado anteriormente. Para ello, los resultados obtenidos en las diferentes pruebas (RM, Western blot [WB] e IHQ) se compararon con las del grupo tratado únicamente 6 h después de la lesión. Finalmente, se evaluó si la posible mejora a nivel molecular y neuroanatómica implicaba una mayor puntuación motora y cognitiva a medio y largo plazo.

De manera adicional, se quiso iniciar el tratamiento con CBD desde el inicio de la lesión. Para ello, decidimos tratar a la madre 24 h antes del parto. Para desarrollar este trabajo, inicialmente necesitamos evaluar si el CBD atravesaba la barrera placentaria de madres gestantes a E21, y en que dosis se alcanzaban en las crías concentraciones consideradas como neuroprotectoras. Para ello, se sacrificaron a las crías 12 h después del parto y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) los niveles de CBD alcanzado

en cerebro y en plasma. La dosis materna considerada como neuroprotectora fue aquella que, basándonos en otros estudios de daño cerebral, alcanzaba una concentración de 0,03-0,06 ng/Kg en el cerebro de las crías <sup>239</sup>. Posteriormente, para demostrar si este ejercía un efecto protector, de nuevo se analizó el volumen del daño, los niveles de inflamación y el estudio del posible déficit conductual y neuroanatómico a largo plazo de los animales lesionados.

Finalmente, analizamos si el tratamiento con CBD combinadamente antes y después del daño producía un efecto aditivo respecto al resto de formas de administración utilizadas. Para ello, basándonos en los estudios prenatales, la madre fue tratada con la dosis elegida previamente mientras que las crías ya nacidas recibieron dosis múltiples de este mismo fármaco a las 6, 24 y 48 h después del daño. Por último, se llevó a cabo un análisis estadístico entre todos los grupos tratados con el objetivo de comparar la forma de tratamiento que presentaba un mejor resultado y así analizar en más detalle su posible efecto sobre los eventos fisiopatológicos de nuestro modelo animal (**Fig. 27**).

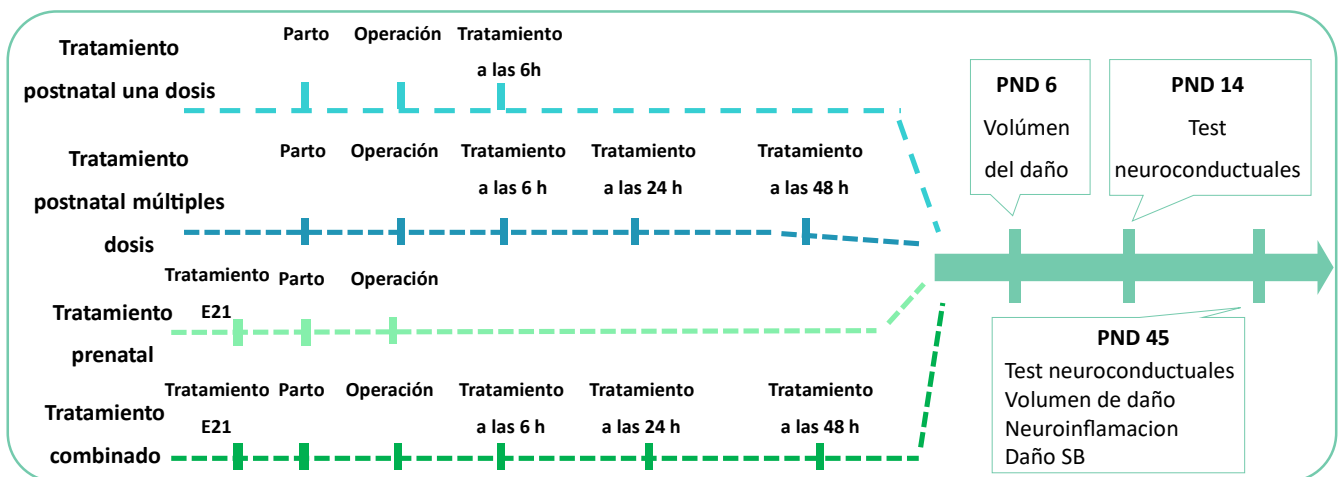


Figura 27. Esquema representativo del Diseño experimental 2

### Diseño experimental 3: Posibles mecanismos de acción del CBD

Como hemos mencionado, en el Diseño experimental 3 tratamos de evaluar el posible efecto sobre la fisiopatología de la HIV del CBD administrado de forma combinada antes y después del daño. Para ello, evaluamos si este fitocannabinoide actuaba sobre los marcadores que se encontraron alterados en el modelo. En este sentido, a los animales sacrificados a PND 6 les realizamos ensayos de WB para determinar si el tratamiento redujo los niveles de los integrantes de la vía proinflamatoria de TLR-4, así como los marcadores de daño y disfuncionalidad de la BHE. Paralelamente, determinamos mediante H+ MRS los niveles de Glutamato, Lactato, Mioinositol, y mediante Oxyblot los de las proteínas oxidadas, todos ellos marcadores de excitotoxicidad, daño tisular, disfuncionalidad astrocitaria y estrés oxidativo respectivamente. A su vez, mediante ensayos de CF evaluamos si en esta etapa estos animales presentaban un descenso en la expresión de la microglía y macrófagos, ambos marcadores de daño cerebral. Del mismo modo, el tejido de los animales sacrificados a PND 14 y PND 45 fue utilizado nuevamente para realizar ensayos de WB y CF con el objetivo de determinar los niveles inflamatorios y de daño en BHE a medio y largo plazo. Cabe mencionar que de forma paralela, los animales fueron sometidos a estudios de RM para evaluar la posible extravasación o acumulación de Gadolinio (Gd), y confirmar y localizar la posible recuperación de la BHE a causa de este tratamiento (**Fig. 28**).

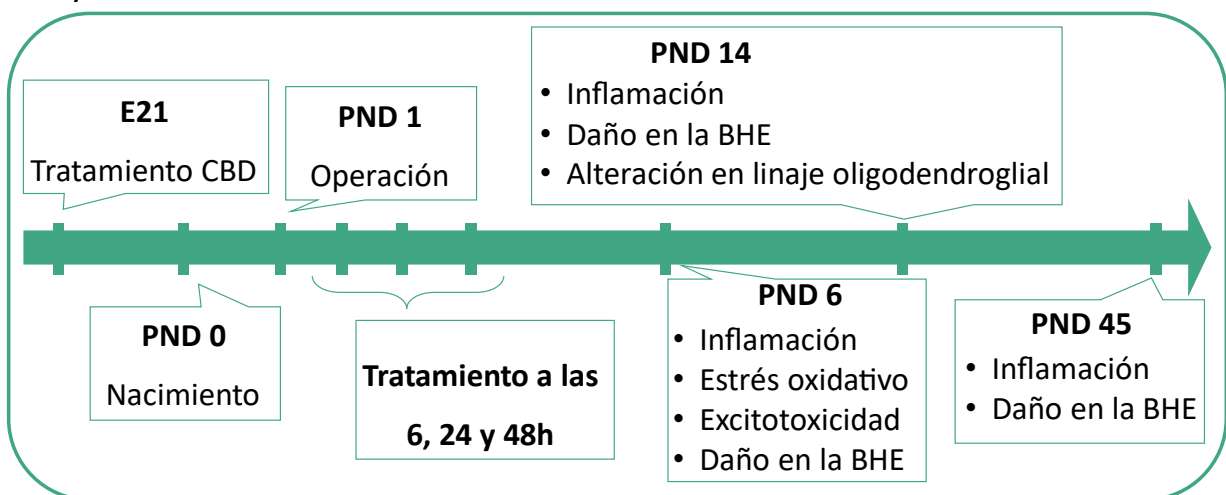


Figura 28. Esquema representativo del Diseño experimental 3

# MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A continuación, se hará una descripción del material utilizado y de los procedimientos experimentales realizados para llevar a cabo los Diseños Experimentales descritos en el apartado anterior.

## ***Animales de experimentación***

El desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha realizado empleando crías de rata Wistar. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron previamente aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario Clínico San Carlos (Madrid, España), y cumplió con la normativa europea y española (86/609 / CEE y RD 1201/2005, 2010/63 / UE y RD 53/2013). Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22\pm 1$  C) y humedad ( $55\pm 10\%$ ), así como con un fotoperíodo constante de luz/oscuridad (12/12 h), siendo este de 7.00-19.00 horas. Además, todos los animales tenían acceso libre a agua y comida y fueron mantenidos y estabulados bajo los criterios de bienestar animal, y manteniendo los criterios de rentabilización de los experimentos las 3R (reducción, refinamiento y reemplazo). A los 21 días, se separó a la camada en función del sexo de estas.

## ***Inducción de la HIV y asignación de grupos***

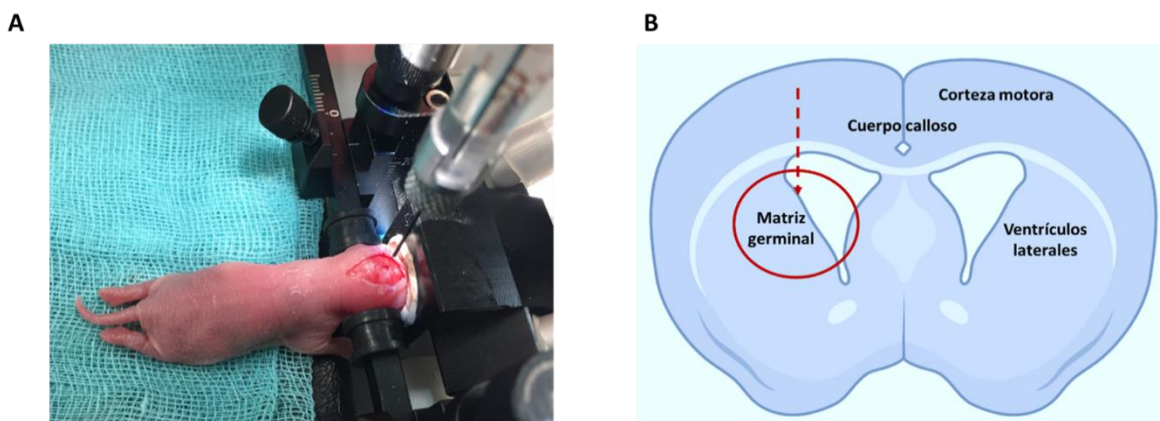
En el siguiente apartado se explica con mayor detalle el proceso mediante el cual se indujo la HIV así como la asignación de los diferentes grupos experimentales según el Diseño Experimental.

## Preparación y administración de *Colagenasa de Chlostridium*

La preparación de ***Chlostridium colagenasa*** se realizó mediante la reconstitución con tampón fosfato salino (del inglés, PBS) 1X de 1000 U de la enzima en polvo concentrándola finalmente a 1 U. Para poder inyectar 0.2 U de esta enzima en un volumen de 0.5  $\mu$ L, se añadió en un eppendorf un volumen de 4  $\mu$ L de *Colagenasa de Chlostridium* mezclado con 1  $\mu$ L de PBS. Finalmente, se agitó y se mantuvo en hielo durante todo el procedimiento quirúrgico.

## Proceso quirúrgico

Con el objetivo de evitar el rechazo de las crías por parte de la madre una vez finalizado el procedimiento quirúrgico, fue necesario realizar un pre-acondicionamiento. Durante este proceso, la madre y las crías (lavadas previamente con clorhexidina, el antiséptico utilizado durante la cirugía) fueron separadas en dos jaulas iguales durante diez minutos. Posteriormente, estas volvieron a juntarse durante el mismo periodo de tiempo. Este proceso se repitió una vez más en este caso transportando la jaula de la madre a una habitación diferente. Una vez devueltas las crías a la madre y pasado un periodo de adaptación, estas se volvieron a separar y se inició el proceso quirúrgico.



**Figura 29. (A) Imagen del procedimiento quirúrgico (B) Imagen representativa de la MG en el cerebro de una rata Wistar PND 1**

La cirugía se realizó en ratas *Wistar* de 1 día de edad cuyo estadio de desarrollo cerebral equivale al de un niño de 23-24 semanas de gestación<sup>240</sup>. La cirugía se realizó en condiciones de anestesia (5% de Sevofluorano y 3% de mantenimiento) y analgesia (Ketamina), siempre manteniendo su temperatura corporal en 37 °C. Basándonos en el modelo de Lekic y colaboradores<sup>237,241</sup>, la fijación de la rata se llevó a cabo en un estereotáxico para ratones (68507, VWR International Ltd) adaptado con una máscara anestésica para ratas neonatas (68218, VWR International Ltd).

Como mencionamos previamente, con el objetivo de evitar el trauma producido, la inyección de la enzima se realizó a través de la jeringa de 33G *Hamilton* (HAMI65460-03, Hamilton Company), cuyo pequeño calibre permite introducirla a la estructura deseada sin causar ningún tipo de daño en las zonas colindantes.

Una vez anestesiado, se llevó a cabo un corte de 5 mm en la zona central de la cabeza del animal siempre manteniendo las condiciones de asepsia. Tomando como coordenada 0,0,0 el punto anatómico del cráneo Bregma, la inyección de *Colagenasa de Chlostridium* (C2399, Sigma-Aldrich Inc) se produjo en la MG del hemisferio izquierdo, situada en las coordenadas +0.5 antero-posterior (AP), +1.3 latero-lateral (LL) y 2.3 dorso-ventral (DV) del animal (**Fig. 29**). Las 0,2 U de la solución enzimática contenidas en un volumen de 0,5 µL se inyectaron de manera constante durante 3 minutos, evitando así el aumento repentino de la PIC y por tanto el posible daño adicional. Cabe mencionar que, para demostrar la ausencia de efectos deletéreos producidos por la inyección de la Hamilton, se generó un grupo experimental (**grupo NEEDLE**) en el que, siguiendo las pautas mencionadas anteriormente, se les administró PBS en lugar de *Colagenasa de Chlostridium*. Una vez finalizada la inyección, la aguja se mantuvo en la misma posición durante 7 minutos más para evitar el retroceso de la colagenasa al exterior. Al finalizar, se suturó la escisión realizada y se limpió con clorhexidina antes de devolver a las crías con la madre. El tiempo total de la cirugía será aproximadamente de 20 minutos por animal.

### Asignación de los grupos experimentales y sus controles

La asignación de los grupos experimentales se realizó siempre de forma aleatoria y el número de grupo varió en función del Diseño Experimental.

En el **Diseño Experimental 1** (validación del modelo animal), contamos con 3 grupos experimentales: el grupo **SHAM** (SHM, animal al que simplemente se le realizó una pequeña escisión en la cabeza); **NEEDLE** (animal que siguió el mismo procedimiento quirúrgico que el grupo lesionado, pero sustituyendo la *Colagenasa de Chlostridium* por PBS); y **HIV** (animal al que se le administró *Colagenasa de Chlostridium* siguiendo el procedimiento ya mencionado). Dado que se demostró que el grupo SHM y NEEDLE no presentaban ningún tipo de diferencia a nivel estructural, funcional o molecular, en el resto de los Diseños Experimentales el control fue el grupo SHAM.

En los estudios postlesionales de una única dosis, los grupos tratados a **las 6 (CBD 6 h), 18 (CBD 18 h), 24 (CBD 24 h) y 48 horas (CBD 48 h)** fueron elegidos de forma aleatoria; a su vez, tanto el

grupo SHAM como el lesionado (IVH VEH), recibieron la misma dosis y volumen de vehículo. De forma similar, el grupo tratado durante tres días consecutivos (**IVH + CBD 3X**) así como los grupos control y HIV (recibieron la misma cantidad de VEH) fueron elegidos de manera aleatoria.

En cuanto a los **estudios prenatales (IVH + CBD Pre)**, para realizar la prueba de dosis se administró i.p. a la madre en periodo de gestación E21 dosis de 10, 20, 100 y 200 mg/kg de CBD. De forma paralela, en el análisis del posible papel neuroprotector del pretratamiento con CBD, se les administró el mismo volumen de vehículo a las madres. Cabe recordar que, en esta parte del estudio, ninguna de las crías fue tratadas posteriormente.

Finalmente, para evaluar el efecto del **CBD de forma combinada** (antes y después del daño), se le administró conjuntamente CBD a la madre en periodo gestacional E21 y CBD a las crías de forma múltiple (**IVH + CBD Pp**). Se consideró como control a la madre que se le administró a E21 y a las crías vehículo a las 6, 24 y 48 h después del daño. Los animales SHAM recibieron vehículo postlesionalmente en ambos casos, tal y como se indica en la **Tabla 4**.

Cabe destacar que tanto el CBD (GWP42003) a una concentración de 3 mg / mL como el vehículo fueron administrados (vía i.p.) por la empresa farmacéutica GW Research Ltd (Cambridge, UK). A su vez, basándonos en otros modelos de daño neonatal en ratas Wistar, la dosis y volumen administrado fue de 5 mg /Kg (previamente diluido en suero fisiológico) y 50 µL.

GRUPO CBD	NOMBRE	TIEMPO				
		E21	6 h	18 h	24 h	48 h
Tratamiento 6h	IVH + CBD 6		■			
Tratamiento 18h	IVH + CBD 18			■		
Tratamiento 24h	IVH + CBD 24				■	
Tratamiento 48	IVH + CBD 48					■
Tratamiento múltiple	IVH + CBD 3X		■		■	
Tratamiento E21	IVH + CBD Pre	■				
Tratamiento combinado	IVH + CBD Pp	■	■		■	

**Tabla 4.** Esquema temporal de los distintos tratamientos con CBD en los Diseños Experimentales 2 y 3

## ***Test neuroconductuales***

Dado que la PCI es un trastorno de tipo motor y cognitivo, con el objetivo de evaluar la eficacia de nuestro modelo animal y si el tratamiento con CBD es capaz de prevenirlo, se llevaron a cabo una batería de tests neuroconductuales tanto a medio (PND 14) como a largo (PND 45) plazo. Por otro lado, dada la estrecha relación entre la prematuridad y la presencia de diferentes trastornos emocionales (especialmente de tipo hiperactivo como el TDAH), se estudió en ambos puntos temporales si nuestros animales presentaban algún tipo de alteración en la conducta. Los puntos temporales usados se debían a que una rata PND 14 presenta un neurodesarrollo similar a la de un niño de 2-3 años, edad en la que se evalúa en clínica si un paciente ha desarrollado PCI. En cuanto al análisis realizado a PND 45, se realizó con el objetivo de evaluar si a largo plazo persistía el trastorno neuroconductual descrito un mes antes. Cabe mencionar que el análisis de las pruebas neuroconductuales se realizó “ciegamente” por dos evaluadores diferentes. Por lo tanto, estos puntos temporales fueron seleccionados para tratar de reproducir de manera fiable los periodos equivalentes al diagnóstico clínico de la PC y confirmación de este, y determinar las posibles alteraciones funcionales con el volumen de hemorragia y los eventos fisiopatológicos producidos.

### Test neuroconductuales a medio plazo

Por las limitaciones madurativas en los animales, los test realizados a PND 14 evaluaron las posibles alteraciones en los reflejos y en la coordinación que podría presentar un niño de 2-3 años con PCOH; a su vez, se estudió si estos animales también presentaron un trastorno de tipo emocional.

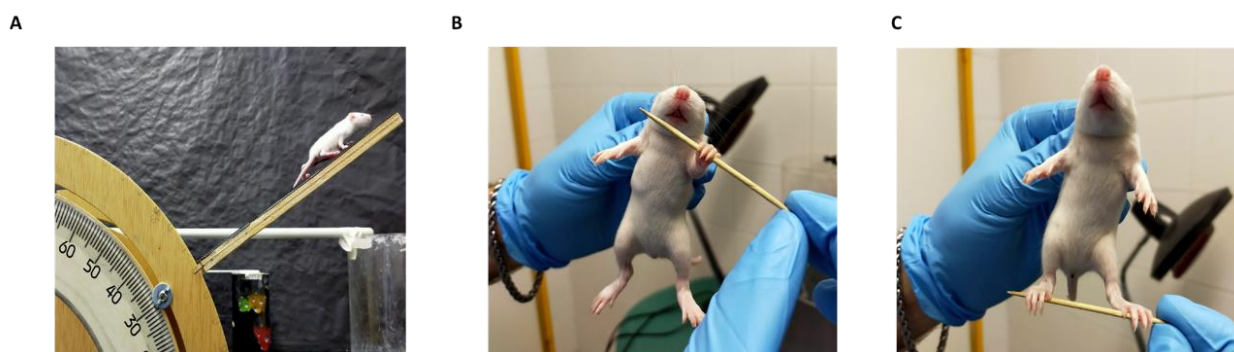
- **Geotaxia negativa:** La Geotaxia negativa se utilizó para medir una posible alteración en la coordinación en etapas tempranas del desarrollo como consecuencia del daño neurológico producido. Para desarrollar esta prueba, los animales se colocaron boca abajo en una superficie fija cuya pendiente era de 45°; posteriormente se cuantificó el tiempo que el animal precisa para girarse completamente 180° (**Fig. 30A**). Las ratas que presentaron alteraciones en la coordinación tardaron más tiempo en girarse completamente que los controles.

- **Reflejo de Grasp:** El reflejo de prensión (denominado habitualmente por su término en inglés grasp [agarrar]), es un reflejo que se da en los seres humanos durante los primeros meses de vida, y que se caracteriza por el cierre de la mano en torno a cualquier objeto que toque su

palma. En caso de no realizarlo, se considera como signo patológico en el desarrollo. En el caso de las ratas, con el objetivo de determinar si se produce una pérdida del reflejo de agarre como consecuencia del daño cerebral, se usó un objeto cilíndrico para cuantificar el grado de agarre que presentaba tanto en las patas delanteras como traseras (**Fig. 30B**). Los valores adoptados fueron de 0 cuando no hubo reflejo, 1 cuando este es tardío o parcial y 2 cuando estaba intacto. Finalmente, se realizaron la suma de valores y se comparó con la suma obtenida por el grupo SHM.

- **Reflejo de Grip:** similar al anterior, este test trató de evaluar el reflejo de presión ejercida por las extremidades inferiores durante los primeros meses de vida en el ser humano. En el caso de las ratas, el examinador tomó a la cría por la espalda y se le apoyó sobre un objeto cilíndrico para evaluar la presión que ejercieron las patas traseras sobre esta superficie (**Fig. 30C**). En función del grado de presión ejercida, se les valoró con 0 cuando no existe resistencia, 1 cuando esta fue parcial y 2 cuando era total.

- **Test de suspensión de la cola o *Tail suspension test*:** dado que los niños que sufren PCOH suelen presentar trastornos emocionales como TDAH, se evaluó si en este modelo los animales presentaban un trastorno similar. Para ello se llevó a cabo el test de la suspensión de la cola (en inglés, *Tail Suspension Test*). Esta prueba se efectuó de modo que el animal estuvo sujeto y suspendido de la base de la cola a una altura de 10-15 cm durante 6 minutos. Durante este tiempo se cuantificó el tiempo en el que el animal estuvo completamente inmóvil.



**Figura 30. (A) Imagen representativa del test de la Geotaxia invertida (B) Imagen representativa del test del Grasp (C) Imagen representativa del test del Grip**

## Test neuroconductuales a largo plazo

Un mes más tarde, se llevaron a cabo una batería de pruebas neuroconductuales con el objetivo de evaluar si a largo plazo persistían los trastornos cognitivos, sensoriomotores y emocionales observados en una etapa más precoz:

- **Prueba de la Barra o *Beam test*.** Con el objetivo de determinar la presencia de déficits en la coordinación motora, se llevó a cabo la prueba de la Barra (en inglés, *Beam test [BW]*). En esta prueba, una rata adulta cruza de extremo a extremo una barra situada a 50 cm del suelo de 1 m de longitud y 1 cm de anchura. En el inicio de la barra se coloca un foco de luz que fuerza su desplazamiento hacia el otro extremo, donde se encuentra una cabina oscura y con alimento. Esta prueba requirió de un entrenamiento y aprendizaje el día previo, en el que se enseñó a los animales a cruzar dicha barra en dos ocasiones con un periodo de reposo de una hora entre ambas (**Fig. 31B**). Durante la prueba, se evaluó el tiempo requerido para cruzar la barra y el porcentaje de caídas como medida para confirmar la ausencia o no de una posible alteración motora.

- **Prueba del Cilindro o *Cylinder Rearing test*.** Con el objetivo de evaluar la posible hemiparesia secundaria al daño cerebral se realizó la prueba del Cilindro (en inglés, *Cylinder Rearing test [CRT]*). Durante esta prueba (que no requirió de un acondicionamiento previo), los animales se situaron durante 3 minutos en un cilindro transparente de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Se cuantificó el número de veces que apoyaban preferencialmente una extremidad con respecto a la otra sobre la superficie de este, de forma que aquellos animales con hemiparesia presentaron un mayor número de apoyos de la pata ipsilateral (**Fig. 31A**). Para determinar el grado de hemiparesia, se cuantificó el porcentaje de veces que apoyó la pata ipsilateral (pata izquierda) frente a la contralateral. Fueron necesarios al menos 4 contactos para incluirlas en el estudio.

$$[(\text{Izquierda} - (\text{Derecha} + \text{Ambas}) / (\text{Total})) \times 100]$$

- **Reconocimiento de Objeto Nuevo o *Novel object recognition test*.** La prueba de Reconocimiento de Objeto Nuevo (en inglés, *Novel object recognition test [NOR]*) se realizó con el objetivo de evaluar la integridad de la memoria de trabajo de tipo no-espacial. Se ha descrito que una memoria de trabajo defectuosa en una rata equivale a un deterioro cognitivo en el ser humano, algo que ocurre de manera habitual en los casos de PCOH. Para llevar a cabo este test, los animales requirieron de un proceso de habituación en la caja donde posteriormente se

realizó la prueba (40 x 40 x 30 cm) el día siguiente. El día de la prueba los animales fueron expuestos durante 5 minutos a dos objetos idénticos. Una hora más tarde, uno de los objetos se sustituyó por uno con un tamaño y color totalmente diferente, y las ratas fueron expuestas durante 5 minutos de nuevo a estos objetos (**Fig. 31C**). En el análisis de la prueba se cuantificó el tiempo en el que los animales exploraron el objeto nuevo respecto del viejo, de forma que aquellos animales con un déficit cognitivo no eran capaces de discernir si el objeto intercambiado era nuevo o no.

$$(Tiempo\ nuevo - Tiempo\ viejo) / (tiempo\ nuevo + tiempo\ viejo).$$

- **Test de la natación forzada o *Forced swimming test*.** Con el objetivo de evaluar las secuelas en el estado del ánimo o emocionales en aquellos animales que sufrieron HIV se realizó el test de la natación forzada (del inglés, *Forced Swimming test [FST]*). Validado tanto en ratas como en ratones, se fundamenta en el instinto más primitivo de los roedores a la hora de escapar de un entorno estresante, en este caso, el agua. El procedimiento estándar consiste en someter a los animales de experimentación dos veces a un tanque de agua (20 cm de diámetro y 30 cm de altura) en el que el animal debe, forzosamente, nadar para no ahogarse. El intervalo entre ensayos es de 24 horas, siendo el primero (pre-test) de 15 minutos y el segundo (test propiamente) de 5 minutos. Durante este periodo, los animales realizaron tres conductas que se tomaron como requisitos a la hora de evaluar el posible trastorno emocional: ***climbing*** o escalada (movimientos verticales con los cuartos delanteros apoyados contra las paredes del mismo con el objetivo de escapar), ***swimming*** o natación (movimientos circulares sobre la superficie del agua), ***floating*** o inmovilidad (pequeños movimientos, necesarios únicamente para mantener la cabeza fuera del agua). Durante el transcurso del test se analizaron cada 5 segundos estos tres tipos de conductas y se cuantificó el porcentaje de cada una de ellas respecto del total. Posteriormente se describió como comportamiento de “tipo depresivo” aquellas que presentaron mayoritariamente una conducta de *floating*. Por otro lado, se analizaron las diferencias entre las conductas de *swimming* y *climbing*, ya que indicaban alteraciones en el sistema serotoninérgico y dopaminérgico respectivamente, siendo este último un marcador de hiperexcitabilidad.

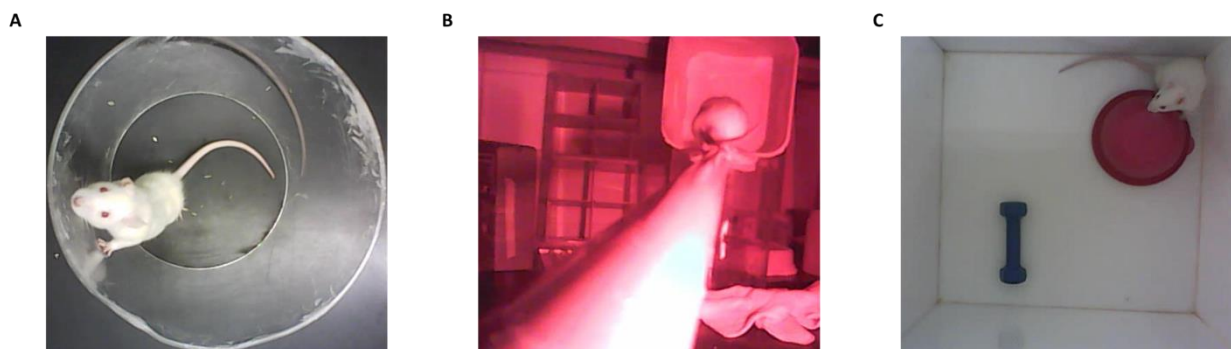


Figura 31. (A) Imagen representativa del CRT (B) Imagen representativa del BW (C) Imagen representativa del NOR

### ***Sacrificio y obtención de muestras***

Para llevar a cabo la recogida de muestras y evitar el sufrimiento del animal durante la perfusión, estos fueron sacrificados mediante la administración i.p. de Tiopental y Fentanilo en una dosis de 0,1 y 0,05 g/mL respectivamente. Para los estudios de CF, BQ y H+ RM, las ratas fueron perfundidas de forma intracardiaca con PBS 0.1 M y PH 7.4. Posteriormente, en el caso de los tejidos usados para BQ y H+ MRS, se procedió a recoger y congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  las zonas de interés (corteza parietoccipital); en el caso de la CF, los cerebros fueron extraídos y procesados “en fresco” sin previa congelación. En los estudios histológicos, los animales siguieron el mismo protocolo de anestesia y analgesia; sin embargo, seguidamente a la perfusión de PBS intracardiaca, se les administró el fijador paraformaldehído (PFA) con un porcentaje del 4%. Posteriormente, el cerebro entero fue sumergido durante 48h en PFA al 4% de manera previa al procesamiento del tejido. Para llevar a cabo los estudios de LC-MS, los cerebros de los animales PND 1 previamente anestesiados fueron extraídos sin perfundir y congelados mediante inmersión en nitrógeno líquido para mantenerse posteriormente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### ***Estudios de resonancia magnética***

Los estudios de RM realizados se llevaron a cabo en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espín electrónico (SE) (instituto Multidisciplinar, Universidad Complutense de Madrid) utilizando un escáner de 1 Tesla [Icon (1T-MRI); Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemania]. El sistema consta de un imán permanente de 1 T (sin refrigeración adicional requerido para el imán) con una bobina de gradiente que proporciona un gradiente de fuerza de 450 mT / m. Los sistemas de monitorización de animales y la bobina de radiofrecuencia de cabeza de ratón

solenoides están integrados en la cama y permiten que los animales sean manejados de forma precisa y con un control total de la anestesia y la temperatura corporal. Dado que los estudios de RM se utilizaron para evaluar el volumen del daño y determinar la posible alteración en la UNV, los parámetros utilizados en ambos casos fueron distintos. Por ello, a continuación, se describe en detalle los protocolos utilizados en ambos casos.

### Análisis del volumen de daño

#### **Corto plazo (PND 6)**

A corto plazo, 5 días tras la cirugía, el estudio *in vivo* por imagen de Resonancia Magnética (IRM) se realizó con el objetivo de clasificar las hemorragias en función de su severidad (leve, moderada o severa). Se adquirieron imágenes 3D potenciadas en T2 empleando una secuencia de eco de espín rápido. Los principales parámetros seleccionados fueron: tiempo de repetición (TR) = 2850 s, longitud del tren de eco = 12, tiempo de eco (TE) = 24 ms (tiempo de eco efectivo = 120 ms), número de promedios = 1, campo de visión (FOV) =  $18 \times 18 \times 18 \text{ mm}^3$ . Siendo el tamaño de la matriz de adquisición de  $150 \times 150 \times 36$  (resolución  $0,120 \text{ mm} \times 0,120 \text{ mm} \times 0,500 \text{ mm}$ ) y el tiempo total  $\sim 12$  minutos.

El porcentaje de daño se evaluó mediante el software ImageJ 1.43u (National Institute of Health [NIH], Bethesda, USA), cuantificando el volumen de la hemorragia y del edema. El área de hemorragia se analizó sobre 6 cortes consecutivos que se tomaron como una representación completa del cerebro del animal. La clasificación de la severidad se obtuvo mediante el porcentaje del volumen de hemorragia frente al volumen cerebro total. Se clasificaron como hemorragias leves las que presentaban porcentajes entre 0,01 y 5; como moderadas los valores entre 5,01 y 10%; y como severas los mayores del 10%.

#### **Largo plazo (PND 45)**

A largo plazo, 45 días tras la cirugía, se realizaron estudios de IRM *ex vivo* del cerebro fijado en PFA, con el objetivo de analizar el volumen del daño y comparar así la progresión de la hemorragia y del edema post-hemorrágico con el tiempo. Además, se analizó la posible afectación de SB medido a través de la pérdida de área del hemisferio ipsilateral y CC. Para realizar la adquisición de los datos de IRM las muestras se sumergieron en Fluorinert®FC-40 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), fluido libre de protones. El experimento consistió en la adquisición de imágenes coronales tridimensionales ponderadas en T2. Se empleó una

secuencia de eco de espín rápido con un tiempo de repetición (TR) = 2500 s, longitud del tren de eco = 8, intervalo entre eco (TE) = 27 ms (resultante en un tiempo de eco efectivo = 80 ms), número de promedios (del inglés, NA) = 5, campo de visión (FOV) = 25 × 18 × 14 mm<sup>3</sup>. El tamaño de la matriz adquirida fue de 250 × 90 × 70 (resolución 0,120 mm x 0,200 mm x 0,200 mm) y el total tiempo de adquisición ~ 90 minutos. Las imágenes coronales fueron reconstruidas en imágenes axiales isotrópicas de 0,1 mm<sup>3</sup>. Las imágenes fueron analizadas mediante el software libre ImageJ 1.43u (National Institute of Health [NIH], Bethesda, USA).

### Alteración de la unidad neurovascular

Para evaluar la posible alteración en la UNV a lo largo del tiempo se realizó un estudio por imagen de resonancia pre y post-administración de un agente de contraste basado en Gadolinio (Gd)(Gadoteridol, ProHance). La posible extravasación del agente de contraste es sinónimo de una alteración en la vasculatura y la consecuente hiperpermeabilidad de la BHE. El experimento consistió en la adquisición de imágenes coronales y axiales 2D ponderadas en T1. Se obtuvieron imágenes antes y 5, 20 y 60 minutos después de administrar el Gd. Se evaluaron dos puntos post-cirugía: corto y medio plazo. Los principales parámetros seleccionados fueron: tiempo de repetición (TR) = 313,15 ms, tiempo de eco (TE) = 6 ms, número de promedios = 24, campo de visión (FOV) = 21 × 21 mm<sup>2</sup>, número de cortes 18 y anchura del corte 1 mm. Siendo el tamaño de la matriz de adquisición en el plano de 150 × 150 (resolución 0,150 mm x 0,150 mm) y el tiempo total ~ 7 minutos.

Para llevar los ensayos de integridad de BHE a PND 45, estos se realizaron en un equipo de imagen de RM Bruker Biospec 47/40 (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) con un campo de 4.7 Teslas. Para los experimentos se empleó un sistema de gradientes de 12 cm de diámetro interno y una sonda de radiofrecuencia de volumen de 7 cm de diámetro interno. Los animales se anestesiaron mediante una mezcla de isoflurano y oxígeno y se mantuvieron anestesiado durante todo el tiempo de experimentación. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C. Tanto la temperatura como la respiración se monitorizaron a lo largo del experimento empleando el sistema 1030 de monitorización para pequeños animales compatible con RM (SA Instruments Inc., Stony Brook, Nueva York, EEUU). Para ello se empleó el siguiente protocolo:

1. Se adquirió imágenes FSE-T2WI para evaluar la existencia de hemorragia y/o edema (TR/TE=2500/63 ms; NA=4).

2. Se adquirieron imágenes SE-T1WI previas a la inyección del agente de contraste basado en Gd (TR/TE=500/10 ms; NA=4). Estas imágenes sirvieron para comparar con imágenes similares adquiridas 1 hora tras la inyección del agente de contraste para la evaluación cualitativa (no cuantitativa) de la posible extravasación del agente de contraste al parénquima cerebral.
3. Se adquirieron una serie de imágenes de IR para el cálculo de los valores del tiempo de relajación longitudinal T1 de los tejidos. Estos valores son necesarios para la cuantificación de la concentración del agente de contraste en los tejidos para la cuantificación de la permeabilidad vascular. Para ello se empleó una secuencia FSE (del inglés, *Eco de Spin Rápido*) (TR/TE=10000/105 ms) con IR (inversión-recuperación) y TI=100, 250, 500, 1000, 1500, 3000 y 5000 ms.
4. Para el experimento de DCE se empleó una secuencia de eco de gradiente FLASH (Fast Low Angle Shot) potenciada en T1 (TR = 25 ms; TE = 2.4 ms, FS = 30°, NA = 2). La adquisición se realizó en continuo: previo, durante y 1 hora tras la inyección iv en forma de bolo de 0,1 mmol/Kg (0,2 ml/Kg) del agente de contraste basado en Gd (ProHance 279,3 mg/ml solución inyectable, Bracco International B.V., Amsterdam, Países Bajos). En total se adquirieron 5 experimentos anteriores a la inyección del agente de contraste, que se emplearon como valores de referencia, y 235 experimentos posteriores a la inyección del Gd. Esto dio lugar a un tiempo de adquisición aproximado de 1 hora.
5. Finalmente, se repitió la adquisición de las imágenes T1WI de SE del paso 2 para la detección visual de la presencia del agente de contraste en el parénquima cerebral.

En todos los experimentos se emplearon los siguientes parámetros: FOV=25.6 x 25.6 mm<sup>2</sup>; SLTH (anchura del corte)=1.5 mm; nº de cortes = 3; tamaño de la matriz reconstruida = 128 x 128.

### ***Estudios de espectroscopía de resonancia magnética***

La H<sup>+</sup> MRS es una técnica analítica no invasiva capaz de realizar análisis sobre tejidos intactos, caracterizar metabólicamente los tejidos y estudiar los cambios metabólicos asociados a diversas patologías. En nuestro modelo se cuantificaron los posibles cambios en el potencial de fosforilación, excitotoxicidad, y función astrocitaria a partir de las ratios de Lactato / N-

acetilaspártato (Lac/ NAA), Glutamato / N-acetilaspártato (Glu / NAA) y Mioinositol / creatina (MI / Cr) respectivamente. En este sentido, se utilizaron muestras congeladas de la corteza parietoccipital de cerebros de ratas de 5 días de edad.

Para ello se utilizó un espectrómetro Bruker AVIII500HD 11.7 T (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Alemania) equipado con una sonda de resonancia HR-MAS (High Resolution Magic Angle Spinning) triple canal de 4 mm  $^1\text{H}$  /  $^{13}\text{C}$  /  $^{31}\text{P}$  en el CAI de RMN y SE de la Universidad Complutense. Las muestras congeladas de 3 mg se colocaron en el interior de un rotor de óxido de circonio de 50  $\mu\text{l}$  con inserto cilíndrico y girando a una velocidad de 5000 Hz. Para minimizar cambios metabólicos durante los análisis, los experimentos se adquirieron a 4 °C. La secuencia de pulsos empleada está basada en el primer incremento de la secuencia de pulsos NOESY con supresión del disolvente en la que se aplica un segundo pulso de radiofrecuencia durante la relajación de 2s a la frecuencia del agua y durante el periodo de mezcla ( $t_m = 150$  ms) con un  $t_1$  de 3  $\mu\text{s}$ . Los experimentos fueron adquiridos con 16000 puntos y 256 repeticiones. Se utilizó un ancho espectral de 8333 Hz. El tiempo total de la adquisición fue de aproximadamente 14 min.

Todos los espectros fueron procesados utilizando el software TOPSPIN, versión 1.3 (Bruker Rheinstetten, Alemania). Antes de la transformación de Fourier, la FID se multiplica por una función de peso exponencial correspondiente a un ensanchamiento de línea de 0,3 Hz. Los espectros fueron corregidos en fase y línea base y referenciado al singlete de (3 -- trimetilsilil) - 2,2,3,3 -- tetradeuteriopropionato de sodio a  $\delta$  0 ppm.

### ***Estudios de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas***

Con el objetivo de determinar si el CBD administrado prenatalmente era capaz de atravesar la barrera placentaria, y en el caso de hacerlo, que cantidad llega en función de la dosis administrada 24 horas antes de extraer el tejido del animal, se realizaron ensayos de LC-MS. La LC-MS es una poderosa técnica analítica que combina el poder de separación de la cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés, *HPLC*) con la gran selectividad, sensibilidad y precisión en la determinación de la masa molecular de la espectrometría de masas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa. Los componentes de la muestra separados en el HPLC pasan al espectrómetro de masas a través de una interfaz donde son ionizados. Los iones

generados en la interfase son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados. El protocolo que se describe a continuación se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Di Marzo, en el Instituto de Químicas de Nápoles, Italia.

### Extracción de CBD en cerebro

Las muestras de medio cerebro se homogeneizaron mediante un Douncer en 600  $\mu$ L de acetona y se sonicaron en un baño ultrasónico durante 8 minutos. Se añadieron estándares deuterados internos para la cuantificación de CBD (GWP42003) mediante dilución de isótopos ([ $^2$ H] 4 GWP42003 10 pmol) al homogeneizado, que luego se centrifugó (10000 rpm 1', 4°C) y se extrajo a 4°C en 600  $\mu$ l de acetona. La fase orgánica que contiene lípidos se secó, se pesó y se purificó previamente mediante cromatografía en lecho abierto sobre gel de sílice. Las fracciones se obtuvieron eluyendo la columna con cloroformo / metanol 99: 1, 90:10 y 50:50 (v / v). La fracción 99: 1 se utilizó para la cuantificación de CBD mediante análisis LC-MS.

### Cuantificación de la concentración de CBD

El fármaco GWP42003 se midió mediante LC-MS-MS usando un LC20AB acoplado a un detector híbrido Ion-Trap y Time-of-Flight (IT-TOF; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) equipado con una interfaz ESI. Los espectros de espectrometría de masas de barrido completo ( $MS^n$ ) de iones precursores seleccionados se adquirieron mediante monitoreo de reacción múltiple (MRM), se extrajeron los cromatogramas de los valores  $[M-H]$  de alta resolución y se utilizaron los últimos cromatogramas para la calibración y cuantificación. El GWP42003 se separó usando un Luna Omega Polar C18 (15 cm x 2,1 mm, D.I.3  $\mu$ m, 100A; Phenomenex) y se eluyó con un flujo isocrático de acetonitrilo: agua (75:25) con ácido fórmico al 0,1%. Se utilizaron bombas de HPLC LC20AB para suministrar disolvente a un caudal de 150  $\mu$ l / min. Las muestras se inyectaron con un automuestreador SIL-20 AC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). El horno de columna se fijó a 30 °C. Este fármaco exhibió un tiempo de retención de 5,4 y 3,9 min, respectivamente. La cuantificación se realizó mediante el método de patrón interno utilizando valores  $m / z$  de 357,2056 correspondientes al ion molecular  $[M-H]$  - para GWP42003.

## ***Análisis histoquímicos***

Después de los estudios de RM, se procedió a llevar a cabo los estudios histoquímicos en cerebros de ratas de 45 días de edad. Para ello, los cerebros previamente perfundidos con suero y PFA siguieron un procesado hidratación y deshidratación, seguido de una inmersión en parafina. Una vez llevado a cabo este proceso, se realizaron cortes coronales de 4  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un microtomo. Las áreas seleccionadas fueron de la lámina 19 a la 23 del Paxinos<sup>242</sup>. Estas láminas comprendían ejemplos de SG (CTX parietoccipital) y SB (CC), además de la SVZ, estructura encargada de la síntesis de precursores oligodendrogiales durante el neurodesarrollo y una de las zonas más afectadas durante la HIV. Una vez realizados los cortes de las áreas de interés, se llevaron a cabo los distintos estudios inmunohistoquímicos que se describen a continuación. Cabe mencionar que el análisis de las técnicas fue realizado ciegamente por dos investigadores.

### Tinción de NISSL

La tinción de Nissl es una tinción usada comúnmente en secciones de tejido nervioso, aunque puede usarse para teñir ácidos nucleicos en cualquier tejido. El colorante en el que se basa la tinción es normalmente el azul de toluidina o el violeta de Cresilo, ambos de tipo acidófilos. El colorante utilizado se une a los cuerpos de Nissl, pequeñas estructuras en forma de gránulos presentes en los ribosomas y por tanto el núcleo y nucléolo de las neuronas o las células gliales. Estas estructuras basófilas, localizadas en el retículo endoplasmático rugoso, tienen como principal función la síntesis y transporte de proteínas. De esta forma, esta tinción nos ofrece una visión general y exhaustiva de la distribución, el tamaño y la morfología del SNC, con el objetivo de determinar si estas se encuentran en un estado homeostático o de necrosis / apoptosis.

Para llevar a cabo este proceso, los tejidos se desparafinaron a 70 °C durante 24 h y se inició un protocolo de rehidratación. Posteriormente, se sumergieron los tejidos durante 30 segundos en azul de toluidina (Sigma Aldrich, San Luis, EE.UU.) disuelto al 0.5% en agua destilada, y posteriormente se fue decolorando con agua y se terminó deshidratando en Xileno. Posteriormente, los tejidos se montaron en portaobjetos en el medio de montaje no acuoso DPX (Merck Millipore; Billerica, EE. UU) y se dejaron secar aproximadamente durante una hora.

La corteza parietoccipital y la SVZ se examinaron con un microscopio óptico (200X) y se analizó las propiedades picnóticas de las neuronas y su citoestructura. Estas fueron puntuadas con

valores de 0 a 5 en función de su morfología y grado de tinción. Las que presentaron menos de un 2% de muerte celular recibieron el valor de 0; 1 aquellas que presentaban menos de un 25% de daño neuronal; 2 cuando el porcentaje comprendía entre un 25 y un 40%; 4 cuando era menor del 65% y 5 cuando había una muerte celular total o ausencia de tejido. Se consideraban células dañadas cuando no se hizo distinción entre el citoplasma y el núcleo, o cuando estas neuronas estaban encogidas con un núcleo altamente teñido y de pequeño tamaño. Por otro lado, las células aparentemente sanas son aquellas que presentaban un citoplasma diferenciado ligeramente teñido, y un núcleo más oscuro cuyos nucléolos eran apreciables.

### Técnicas de inmunohistoquímica

Para llevar a cabo los estudios de inmunohistoquímica, las secciones de los tejidos se desparafinaron y rehidrataron en una batería de alcoholes de un porcentaje descendente. Posteriormente, se procedió al desenmascaramiento del antígeno al sumergir el tejido en una solución de citrato (PH 6 y 10 mM) o Tris-EDTA (PH9, Tris 10mM-EDTA 1mM) con un 0,05% de Tween-20 a una presión y temperatura muy elevadas. Después, se lavó el tejido con PBS seguido de una solución de cloruro de amonio (10mM) durante 10 minutos a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés). Tras varios lavados con PBS 1X, las secciones del cerebro fueron incubadas en una cámara húmeda durante toda la noche (O/N) a 4° C o RT en función del anticuerpo. Al día siguiente, después de llevar a cabo una serie de lavados, los tejidos fueron incubados con su correspondiente anticuerpo (**Tabla 5**) durante 2 horas a 37 °C en una cámara húmeda. Finalmente, para teñir los núcleos los tejidos se incubaron durante 5 minutos con DAPI, marcador fluorescente que se une fuertemente al núcleo de las neuronas (1:500). El montaje de todos los tejidos se realizó en medio acuoso (Sigma, S. Luis, EE.UU) y se dejó secar durante todo el día.

<i>Tipo celular</i>	<i>Referencia</i>	<i>Ac 1º</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Dilución</i>
<i>Mielina</i>	M3821	<b>MBP</b>	MERCK. S. LUIS	1:800
<i>Neurona</i>	MAB377	<b>NEUN</b>	Merck. S. LUIS	1:300
<i>Astrocito</i>	C9205	<b>GFAP</b>	Sigma-Aldrich. S. LUIS	1:1000
<i>Microglía</i>	019-19741	<b>Iba-1</b>	Wako. Japon	1:400

**Tabla 5.**Relación de anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica

## Marcaje inmunohistoquímico de TUNEL

Con el objetivo de evaluar la apoptosis en los tejidos se utilizó el método de marcaje TUNEL [KIT: DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega; Madison, WI, USA)]. Esta técnica se fundamenta en la detección de la rotura de DNA internucleosomal, típico de este proceso, en secciones de tejido fijados en parafina. Presenta como ventaja la detección de células en procesos apoptóticos en estadios más precoces que hematoxilina-eosina. Para ello, se pone de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación de DNA, incorporando nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción de la enzima transferasa terminal (TdT). Estos nucleótidos, modificados con fluoresceína-12, al incorporarse al extremo terminal formarán un oligómero que puede observarse directamente a un microscopio de fluorescencia.

Para ello llevar a cabo esta técnica, primero los tejidos se desparafinaron, se lavaron durante 10 minutos en cloruro sódico y finalmente fueron lavados en PBS. Posteriormente se les aplicó 100µl por tejido de Proteinasa K (20 ug/mL en PBS) durante 8-10 minutos a RT con el objetivo de permeabilizar el tejido. A continuación, se lavaron 3 veces de forma consecutiva, y se sumergieron los tejidos en "tampón de equilibrado" durante 5-10 minutos. Finalmente se incubaron las muestras con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal y los nucleótidos modificados, fluoresceína-10-UTPs, durante una hora y a 37°C en una cámara húmeda. La reacción se detuvo al añadir la solución "STOP" y se lavaron las muestras con PBS y agua desionizada. Nuevamente, se llevó a cabo la tinción de núcleos mediante el marcador DAPI durante 10 minutos y se lavó por última vez. Finalmente, los tejidos se montaron en un medio de montaje acuoso y se dejó secar para observarlo al microscopio.

## ***Microscopía y cuantificación de las imágenes***

A excepción de la proteína básica de la mielina (del inglés, *MBP*), todas las muestras analizadas (4 secciones consecutivas) por técnicas histológicas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio Leica DMRB con cámara DFB300FX (Leica Microsystems, Alemania) siempre manteniendo las mismas condiciones de luz, brillo y contraste intraensayo. Se utilizaron los objetivos de 10x o 20x aumentos en función de las necesidades de cada técnica. La cuantificación de la densidad se realizó mediante el software Image J (NIH) y los resultados se expresaron como número de células totales respecto de los controles. En el caso del marcador para *MBP*, las fotografías se obtuvieron mediante un microscopio confocal TCS SP5 (Leica Microsystems,

Alemania), y la intensidad de la MBP se calculó mediante el software LEICA LASF. El aumento o la disminución de esta se expresó como el ratio de la MBP del hemisferio ipsilateral respecto del contralateral, para evitarla posible variabilidad interensayo o la autofluorescencia del animal.

### ***Estudios bioquímicos***

#### Extracción y cuantificación de proteínas

En el caso de los estudios realizados en las ratas PND 6, debido al pequeño tamaño del cerebro y la escasa cantidad de proteína, se procedió a procesar el cerebro en su totalidad. En el caso de los estudios realizados a PND 14 y PND 45, los estudios se realizaron en la SB. Inmediatamente las muestras fueron congeladas a -80 °C.

La disgregación y homogenización del tejido congelado se realizó en un tampón de lisis (T-PER, 1 g de tejido/10 ml (BioVision, San Francisco, EE.UU) e inhibidor de proteasas (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.). Posteriormente el tejido se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C y a 10.000 Gs. Una vez extraído, se procedió a determinar la cantidad total de proteínas. Para ello, se utilizó el ensayo del ácido bicincónico (BCA), usando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de proteínas (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU). Esta es una prueba que combina la reducción del ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a ion cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la detección de este catión usando un reactivo que contiene ácido bicincónico. El producto final de la reacción es de un color púrpura formado por la unión de dos moléculas de BCA con una del ion cuproso. Este complejo hidrosoluble puede ser detectado mediante absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. Una vez conocida la proteína total, se prepararon las muestras a la concentración requerida en función de las técnicas que se describen a continuación.

#### Western blot

Una vez determinada la concentración proteica de cada una de las muestras, se prepararon las muestras para cargarlas en el gel de electroforesis. Para ello, se preparó un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  que contenía nuestra muestra (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) diluida en un mismo volumen del tampón de carga (mezcla de Laemmli (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol al 87% y  $\beta$ -mercaptoetanol) alcanzando finalmente una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Estas muestras sufrieron un proceso de desnaturalización de 10 minutos a 95 °C

Una vez preparadas las muestras, se procedió a su aplicación en un gel elaborado mediante las soluciones comerciales de poliacrilamida al 12% (BioRad, California, EE.UU.). La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris-glicina en presencia de SDS 1%. Una vez separadas las proteínas en función de su tamaño, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU) mediante el uso de un Trans-Blot® Turbo TM Transfer System (Biorad). Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% disuelta en solución salina tamponada con Tris 1X-Tween20 (TBS-T) durante una hora a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés durante toda la noche a 4 °C en agitación (**Tabla 6**). Pasado este periodo de incubación, se lavaron con una solución de TBST y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario específico de especie y acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma, San Luis, EE.UU.) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Antes de proceder al revelado de las membranas, se lavaron de nuevo con solución TBST para eliminar el exceso de anticuerpo. La visualización de las bandas se realizó mediante el uso del kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagen (GE Healthcare, Amersham, Suecia) en un densitómetro GS-800 (Biorad) y la intensidad de cada banda se cuantificó a partir de la densitometría de las bandas (Image J, NIH, EEUU). Como control de carga se utilizaron las proteínas  $\beta$ -actina. Los datos se representaron como el ratio entre la proteína de interés y la proteína control.

Tipo celular	Ref.	Ac 1º (kDa)	Casa comercial	Dilución
Inflamación	sc-293072	<b>TLR-4 (95 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
	sc-8008	<b>NFkB (65 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
	sc-376861	<b>COX-2 (74 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
	MAB510	<b>TNF-<math>\alpha</math> (17 kDa)</b>	R&D systems; Minneapolis	1:100
	sc-7271	<b>iNOS (135 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
Integridad de la BHE	SAB3500576	<b>Mfsd2a (55 kDa)</b>	Sigma-Aldrich. S. LUIS	1:100
	sc-393859	<b>MMP-9 (92 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
	sc-8439	<b>ICAM-1 (89 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
	sc-133256	<b>Ocludina (65 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
	sc-374221	<b>Claudina-5 (35 kDa)</b>	Santa Cruz, CA	1:100
Control	A5316	<b>B-Actin (42 kDa)</b>	Sigma-Aldrich. S. LUIS	1:5000

**Tabla 6. Relación de anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunotinción**

### Oxyblot

Con el objetivo de cuantificar el posible daño oxidativo producido como consecuencia de la hemorragia y el posible efecto protector del CBD se procedió a medir el estado de oxidación de las proteínas de nuestras muestras mediante el uso de un kit comercial [Oxyblot TM Protein Oxidation Detection kit (Millipore, USA)]. Cuando se produce la oxidación de proteínas por

radicales libres u otras ROS, los grupos carbonilo producidos se introducen en las cadenas laterales específicamente. Este kit proporciona una serie de reactivos para la inmunodetección simple y sensible de estos grupos carbonilos, sello distintivo del estado de oxidación de las proteínas. Los grupos carbonilos de las cadenas laterales de la proteína se convierten a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPhidrazona) al reaccionar con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Finalmente, estas se separarán según la proteína a la que se encuentra unida y se cuantificará. El protocolo es muy similar al explicado anteriormente. En este caso, las muestras se prepararon en agua destilada con una solución comercial de DNPH y SDS al 10% para que se produjese la reacción ya mencionada. Tras una incubación de 15 minutos a RT, se añadió una solución de neutralización y  $\beta$ -mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro de las proteínas. Una vez preparadas las muestras, estas (al igual que los pasos de transferencia y bloqueo) se aplicaron de la misma forma que hemos explicado anteriormente. No obstante, para la inmunodetección de las proteínas, se utilizaron los anticuerpos comerciales proporcionados por el Kit en las condiciones de temperatura tiempo y concentración indicadas (Ac 1º: DNPH 1:150; Ac 2º: 1:300). Finalmente, se procedió al revelado de las muestras mediante el kit ECL mencionado en el punto anterior. Dado que en este ensayo no se puede incubar la B- actina como proteína control, una vez revelado el oxyblot, procedimos a realizar un marcaje de la membrana con Rojo Ponceau. Los datos se representan como la ratio de la intensidad total obtenida al analizar cada carril de proteína cargada respecto a la intensidad de señal obtenida en la proteína total.

### ***Estudios citometría de flujo***

Los ensayos de CF se utilizaron para determinar la activación microglial e infiltración de los macrófagos, así como el fenotipo predominante de cada uno de ellos a corto, medio y largo plazo. Por otro lado, esta técnica se usó con el objetivo de determinar las posibles alteraciones en el linaje oligodendroglial a medio plazo. Para la extracción del tejido los animales fueron perfundidos previamente con suero al 0,9% y los cerebros fueron extraídos en PBS frío. Posteriormente, se trituró y homogeneizó el tejido mecánicamente con la ayuda de un Potter-Elvehjem, seguido de una pipeta de 5 y 1 ml. El tejido disgregado se centrifugó durante 6 minutos a 10 °C y 900 G. Dado que a partir de este paso el protocolo variaba en función del tipo celular estudiado, se explicarán ambos protocolos de forma separada para evitar confusiones a la hora de llevarlos a cabo.

### Estudio del linaje mieloide

Para el análisis del linaje mieloide (microglía y macrófagos), el pellet obtenido se resuspendió en Percoll isotónico al 35% (GE Healthcare, Illinois, EE.UU.) y se le añadió lentamente 3 ml de PBS. A continuación, se realizó una centrifugación sin freno durante 20 minutos, a RT y 2000 G con el fin de formar un gradiente y retirar la mielina de la muestra. Una vez eliminada la mielina y filtrada la muestra en filtros de 70  $\mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec, Alemania), se volvió a centrifugar durante 6 minutos, 10 °C y 900 G y se añadieron los anticuerpos extracelulares (CD11b y CD45) cuyo marcaje nos diferenció el tipo de célula mieloide de nuestras muestras. Una vez incubado el anticuerpo a 4 °C durante una hora en condiciones de seguridad, se lavó y centrifugó con PBS sucesivamente y se procedió a fijar (PFA al 4%) y permeabilizar (PBS Tritón X 100 0,1%) durante 5 minutos en condiciones de oscuridad previamente a añadir los anticuerpos intracelulares (iNOS y Arginasa) (**Tabla 7**). A continuación, se procedió a la incubación de las muestras 1 h a 4°C en condiciones de oscuridad con los anticuerpos primarios intracelulares disueltos en la misma solución utilizada en la permeabilización. Finalizado este periodo, se lavaron las muestras una vez más con PBS y se fijaron con PFA al 1% disuelta en PBS. Las muestras se almacenaron durante toda la noche a 4 °C antes de su paso por el citómetro de flujo a la mañana siguiente.

### Estudio del linaje oligodendroglial

Para el análisis del linaje oligodendroglial (Pre-Ols, Oligodendrocitos inmaduros y oligodendrocitos maduros) el pellet obtenido se resuspendió en Percoll isotónico al 40% y se le añadió lentamente 3 ml de PBS. Al igual que en el paso anterior, una vez retirada la mielina y filtrada la muestra, se incubaron los anticuerpos (todos extracelulares) en condiciones de oscuridad durante 1 hora a 4 °C (**Tabla 7**). Finalmente, se lavaron y centrifugaron 2 veces con PBS y se llevó al citómetro de flujo para su análisis.

Población	Tipo celular	Ref.	Ac 1º	Casa comercial	Dilución
Activación de la microglía e infiltración de macrófagos	Microglía / Macrófagos	561868	CD45-PE-Cy	BD, S. Diego	1:100
	Linaje mieloides	550019	CD11b-APC	BD, S. Diego	1:100
	Fenotipo M1	sc-7271	NOS2-Alexa fluor	SC, CA	1:40
	Fenotipo M2	IC5868P	Arg-1 PE	R & D systems; MN	1:40
Alteraciones del linaje oligodendroglial	Pre-mielina	sc-166172	MOG Alexa fluor 488	SC, CA	1:50
	Oligo inmaduro	130-115-810	O1 efluor 660	Invitrogen, CA	1:50
	Pre-OI	50-6506-82	O4 PE	Miltenyibiotec, ESP	1:50

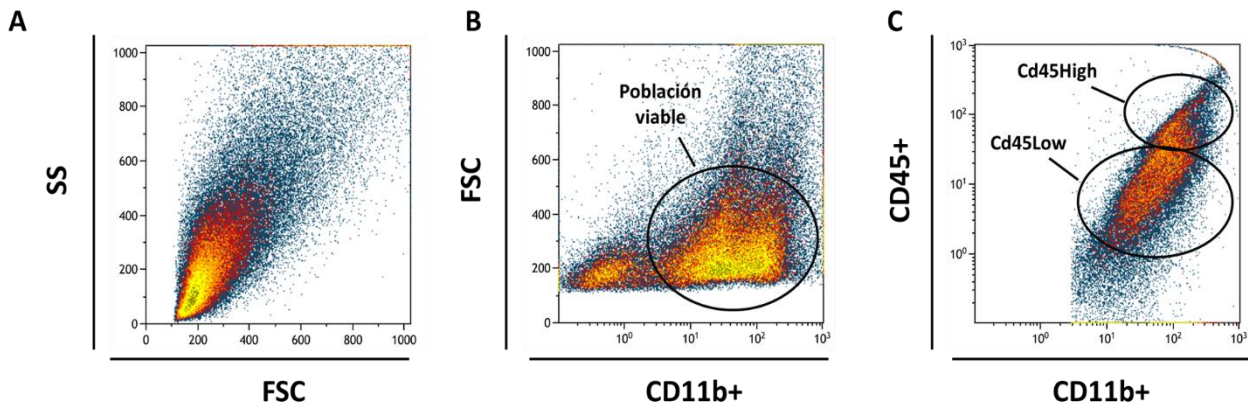
Tabla 7. Relación de anticuerpos utilizados en los ensayos de CF

### Análisis de la CF

Para el análisis de poblaciones celulares utilizamos el programa *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter). Primero, en función de la complejidad y tamaño de la población realizamos la determinación de la población viable, eliminando el posible fondo (**Fig. 32 A**). De esa población seleccionada, identificamos las células positivas para el biomarcador CD11b (CD11b<sup>+</sup>), que son las células mieloides de microglía y macrófagos (**Fig. 32 B**). De las células CD11b<sup>+</sup>, clasificamos la población en función de la expresión del marcador CD45, marcador específico del linaje hematopoyético (a excepción de células plaquetarias y eritrocitos), que también es expresado en menor medida por las células de microglía. Así, podemos distinguir entre CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>High</sup> (población que engloba a los macrófagos infiltrados), o CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>Low</sup> (población que hace referencia a la microglía) (**Fig. 32 C**). En estas dos poblaciones realizamos el análisis de los biomarcadores iNOS y Arg1. La ratio de expresión de estos marcadores nos definió el fenotipo predominante en cada muestra.

En cuanto al linaje oligodendroglial, una vez establecida la población viable en función del tamaño y la complejidad celular, se definió como oligodendrocitos (independientemente del grado de madurez) aquellos que expresaban el marcador O4, O1 y MOG (pre-OI; oligodendrocito inmaduro; oligodendrocito maduro respectivamente) en la población Cd45<sup>low</sup>. De la misma forma que en el apartado anterior, de esta población seleccionamos el porcentaje de células que presentaban los marcadores oligodendrogliales de manera independiente. De esta forma

consideramos como precursores oligodendrogiales a las células con marcaje O4; a los oligodendrocitos inmaduros como los O1 y a los maduros como MOG.



**Figura 32. Selección de las poblaciones viables de microglía y macrófagos. (A)** Población viable en función del tamaño y complejidad de las células. **(B)** Población viable con marcaje CD11b<sup>+</sup>. **(C)** Clasificación de las poblaciones de microglía y macrófagos según el marcaje CD11b<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>.

### ***Análisis estadístico***

Los datos presentados fueron expresados como la media  $\pm$  Error Estándar a la Media (SEM), o como la mediana, el rango intercuartílico y los valores máximos y mínimos en el caso de la clasificación del grado de lesión, ambos analizados con un paquete estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPadSoftware, San Diego,CA). Previamente al análisis estadístico, para evitar la posible variabilidad interensayo los valores de los animales lesionados (tratados y no tratados) fueron normalizados respecto a sus respectivos controles. En cuanto al análisis estadístico, en primer lugar, se aseguró si los datos obtenidos seguían una distribución Normal a través del test de Normalidad D'Agostino-Pearson. Para el análisis de varios grupos, si los datos seguían una distribución Normal se utilizó una ANOVA y la realización del Test de Bonferroni para las múltiples comparaciones. Por el contrario, aquellos que no seguían dicha distribución, se les ejecutó un test no paramétrico Kruskal-Wallis y múltiples comparaciones con el test de Dunn's. Cuando se compararon un grupo respecto a otro, se utilizó una t-student en los casos paramétricos, y Mann-Whitney en los casos no paramétricos. Para analizar las posibles correlaciones entre las pruebas realizadas, se utilizó una correlación de Spearman en los casos no paramétricos, y de Pearson en los paramétricos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0,05$ .

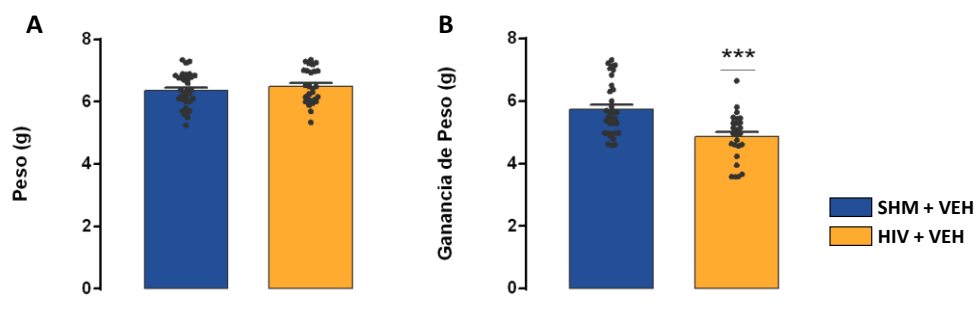
# **RESULTADOS**



# Validación de un modelo animal de HIV

## *Variabilidad en el porcentaje de casos producidos por la administración intraventricular de Colagenasa de Clostridium*

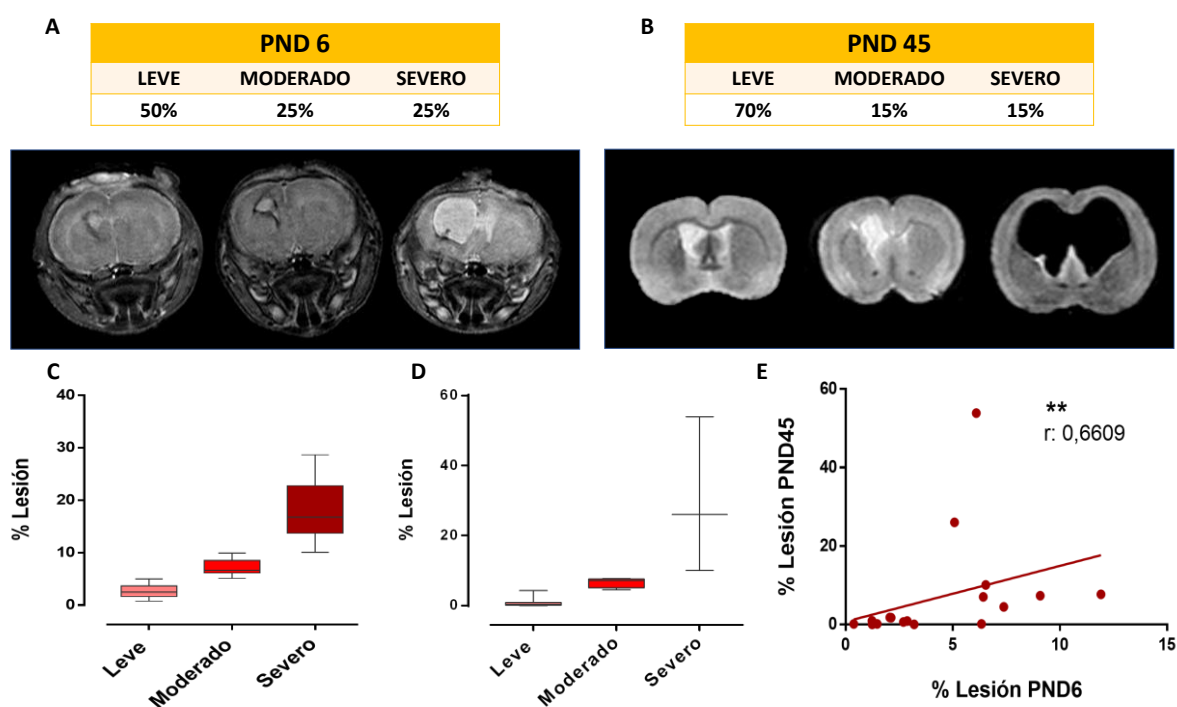
Como se ha mencionado anteriormente, no existen diferencias en los resultados obtenidos en las diferentes pruebas entre el grupo **SHAM** y el grupo **NEEDLE** (datos no mostrados). Por ello, durante este trabajo tomamos como controles al grupo SHAM. En el primer análisis se evaluó el peso inicial (PND 1) y la ganancia de este a lo largo del tiempo (PND 45) en ambos grupos. Este dato es usado de manera habitual para determinar el posible efecto de la enfermedad o el tratamiento en el bienestar de los animales. Inicialmente, no existían diferencias en el peso de los animales que integraban los diferentes grupos de estudio (**Fig. 33 A**); sin embargo, los animales lesionados presentaron una reducción de la ganancia de peso (**Fig. 33 B**).



**Figura 33. Efecto de la HIV sobre el peso.** La HIV produce un descenso en la ganancia de peso respecto al grupo control **(A)** Peso (g). **(B)** Ganancia de peso (g). Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=30)

Posteriormente, centramos nuestros estudios en el análisis del volumen de daño a corto y largo plazo. Anteriormente mencionamos que una de las razones por las que se escogió la dosis de 0.2 U fue debido a la variabilidad en el volumen de hemorragia en comparación con el resto de las dosis utilizadas. A corto plazo, aproximadamente la mitad de los individuos presentaron un

daño de carácter leve (entre 3-4 % respecto al volumen total de cerebro), mientras que el 50% restante eran de carácter moderado (alrededor de un 8% de lesión) y grave (con un porcentaje de lesión del 15%) (**Fig. 34 A y C**). Adicionalmente, a pesar de que el porcentaje de casos graves y moderados se redujo a largo plazo (**Fig. 34 B y D**), los estudios correlacionales demostraron que el daño relativo (porcentual respecto al volumen cerebral total) se mantenía de manera constante a lo largo del tiempo (**Fig. 34 E**). Además, eran independientes del sexo del animal (**Fig. S9**). Por lo tanto, la inyección de 0,2 U de *Colagenasa* de *Chlostridium* en ratas PND 1 produjo un porcentaje de daño variado y estable.

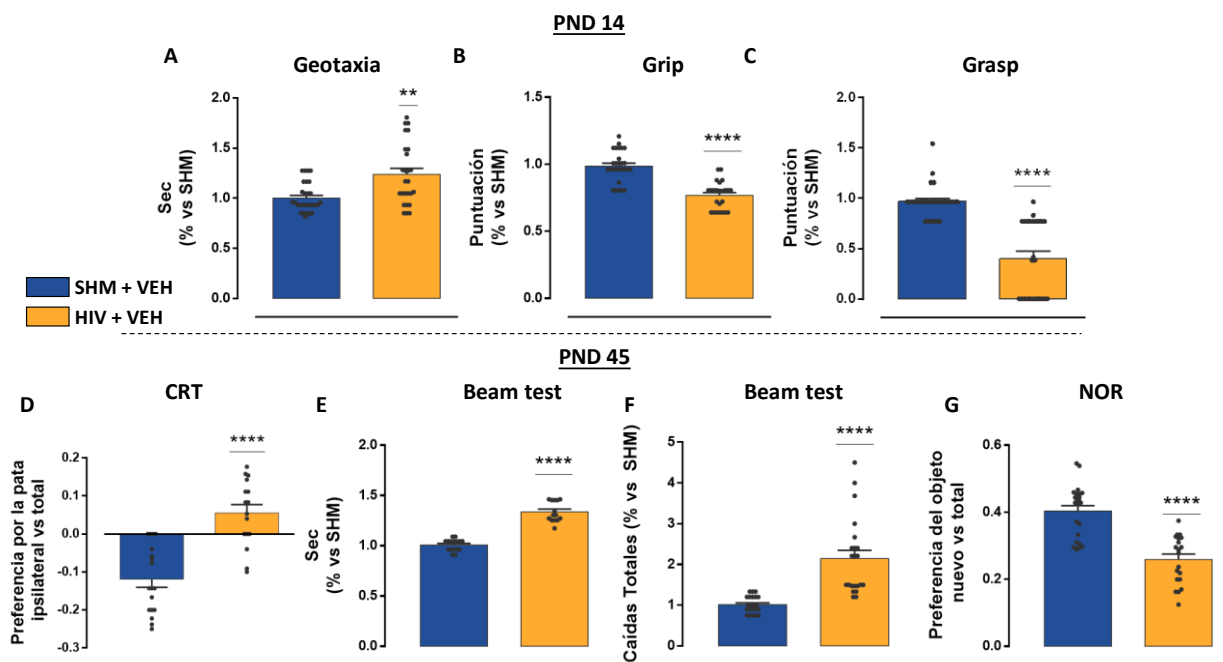


**Figura 34. Volumen de la hemorragia evaluada tanto a corto (PND 6) como a largo plazo (PND 45) y su evolución a lo largo del tiempo.** La inyección de *Colagenasa* de *Chlostridium* produce un daño variado que se mantiene a lo largo del tiempo. **(A)** Proporción de animales que presentan un porcentaje de lesión menor del 5% (casos leves), 5-10% (casos moderados) y superior al 10% (casos severos) evaluados a PND 6 **(B)** Proporción de animales que presenta un porcentaje de lesión menor del 5% (casos leves), 5-10% (casos moderados) y superior al 10% (casos severos) evaluados a PND 45 **(C)** Mediana y valores máximos y mínimos de cada grupo según la gravedad de la lesión a PND 6. **(D)** Mediana y valores máximos y mínimos de cada grupo según la severidad de la lesión a PND 45. **(E)** Correlación entre el volumen de la lesión a PND 6 respecto al volumen analizado a PND 45 del mismo animal. Las barras representan la mediana y el máximo y mínimo de cada grupo. Los datos siguen una distribución no normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. \*\*  $p < 0.01$  (% lesión PND 6 vs % lesión PND 45) (N=20)

### **Alteraciones neuroconductuales producidas por la inducción de la HIV**

De manera complementaria, dado que la HIV es una de las principales causas de la PCI, evaluamos si estos animales presentaban algún tipo de trastorno en la conducta a medio y largo plazo. A medio plazo, etapa de desarrollo equivalente a un niño de 2 años, los animales

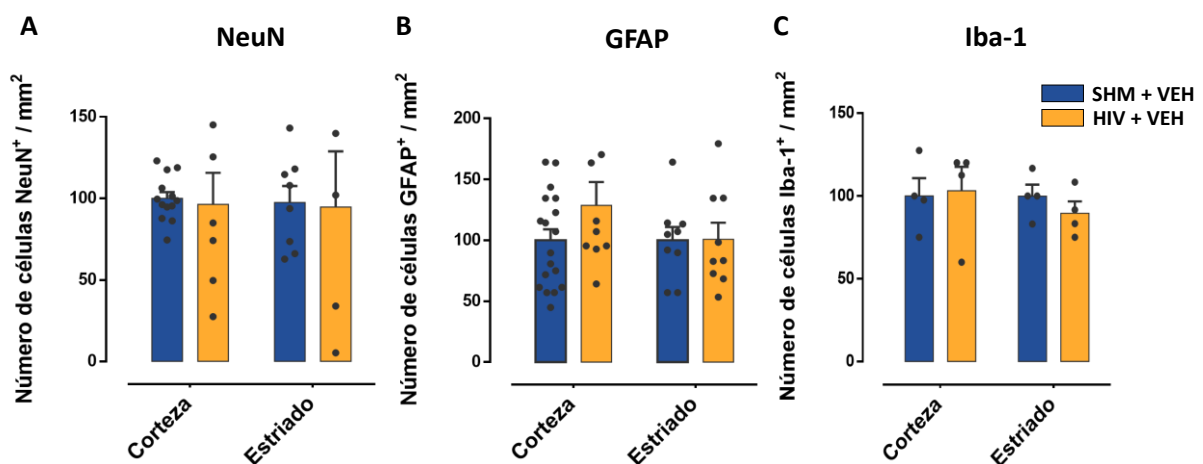
lesionados requirieron un mayor tiempo para realizar un giro de 180° en la prueba de la **Geotaxia inversa** en comparación con los controles (**Fig. 35 A**). Adicionalmente, estos mismos animales también presentaron una menor puntuación en **los test de Grasp y Grip** (**Fig. 35 B y C**). En conjunto, la puntuación obtenida en las pruebas indicó que, a medio plazo, existía una afectación neurológica secundaria a la HIV. Del mismo modo, un mes más tarde observamos como los animales HIV presentaron una preferencia mayor por la pata ipsilateral en la **prueba del CRT** (**Fig. 35 D**), así como un mayor tiempo y porcentaje de caídas en la **prueba del BW** (**Fig. 35 E y F**). Por otro lado, a pesar de ser un trastorno motor y postural, habitualmente la PC infantil incluye una serie de secuelas entre las que destaca las de tipo cognitivo. En este sentido, la prueba del **NOR** nos indicó que los animales con HIV presentaron un menor interés por el objeto nuevo en comparación con los controles (**Fig. 35 G**). De manera global, estos resultados confirman que, a consecuencia del daño producido por la hemorragia, se produce una serie de alteraciones motoras y cognitivas también a largo plazo. Por otro lado, no se observaron diferencias entre ambos grupos en los test del TS y el FST (datos no mostrados).



**Figura 35. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).** La HIV produce un déficit neuroconductual a medio y largo plazo. (A) Tiempo (s) necesario para que el animal gire 180° en una pendiente inclinada de 45°. (B) Suma de la puntuación del reflejo de grip en todas las patas del animal. (C) Fuerza ejercida por las patas traseras del animal sobre una superficie plana. Todos los resultados son el tanto por 1 respecto a los controles. (D) Preferencia por la pata ipsilateral. (E y F) Tiempo (s) para cruzar la barra y porcentaje de caídas. Los resultados de la barra es el tanto por 1 respecto al grupo control. (G) Preferencia por el objeto nuevo. Todos los datos representados son la media de cada grupo ± SEM. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=30)

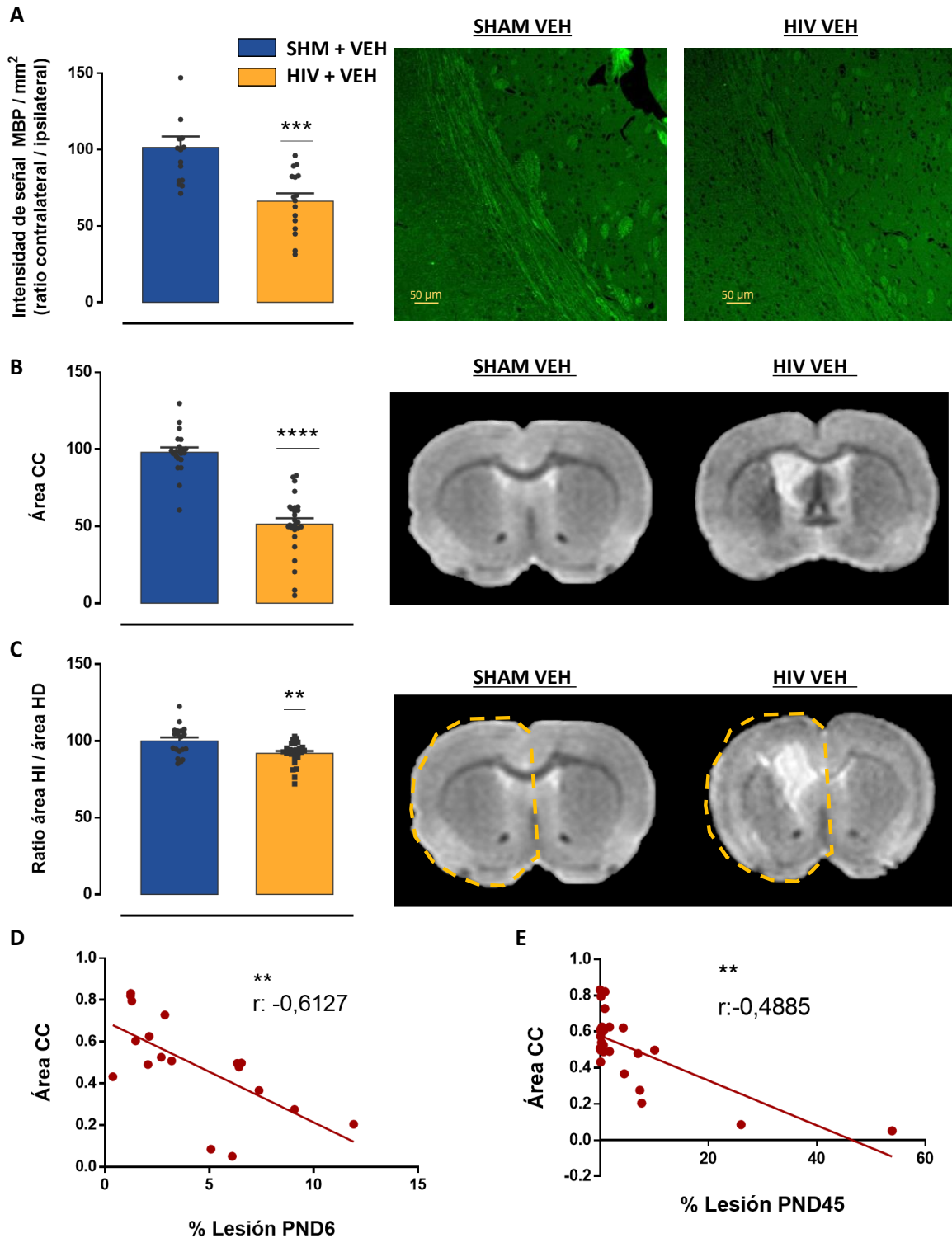
## Consecuencias neuroanatómicas de la HIV a largo plazo: el daño en la SB

Por otro lado, dado que las secuelas producidas por la HIV son consecuencia de las alteraciones de diversas estructuras neuroanatómicas, evaluamos si a largo plazo nuestros animales también presentaban este tipo de afección. En primer lugar, evaluamos la densidad de neuronas, astrocitos y microglía, tres componentes esenciales a la hora de explicar el correcto neurodesarrollo de un individuo. Los animales lesionados no presentaron diferencias en comparación con el grupo control en los marcajes de NeuN, GFAP y microglía ni en corteza y en estriado (**Fig. 36 A-C**).



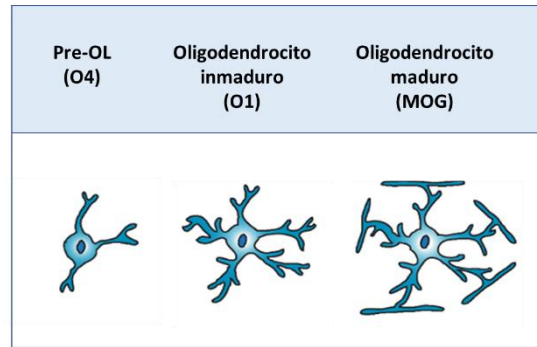
**Figura 36. Número de células con marcaje NeuN<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> e Iba-1<sup>+</sup> en corteza cerebral y cuerpo estriado.** No existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo HIV. **(A)** Células NeuN<sup>+</sup> en corteza cerebral y cuerpo estriado. **(B)** Células GFAP<sup>+</sup> en corteza cerebral y cuerpo estriado. **(C)** Células Iba-1<sup>+</sup> en corteza cerebral y cuerpo estriado. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes (N=4-10)

Asimismo, dado que la SB es la estructura más vulnerable y damnificada en esta enfermedad, decidimos complementar los estudios anteriores investigando también la integridad de esta. Para ello, se cuantificó el porcentaje de mielina y el área del CC, estructura de gran relevancia en la SB, ya que se encuentra implicada en los procesos de oligodendrogénesis. Del mismo modo, se evaluó la pérdida de volumen del hemisferio lesionado (HI), también marcador de daño en la SB. En este sentido, los estudios inmunohistoquímicos realizados en CC mostraron una intensidad de señal menor en la proteína MBP (**Fig. 37 A**) en el caso de los animales HIV. De manera similar, en los estudios de RM también se observó un menor grosor del CC (**Fig. 37 B**) que, de manera adicional, correlacionaba de manera inversa con el volumen de la lesión tanto a corto (**Fig. 37 D**) como a largo plazo (**Fig. 37 E**). Además, la HIV produjo una pérdida del área del HI (**Fig. 37 C**). En conjunto, estos datos revelan que, como esperábamos, la HIV es un claro inductor de daño en la SB.



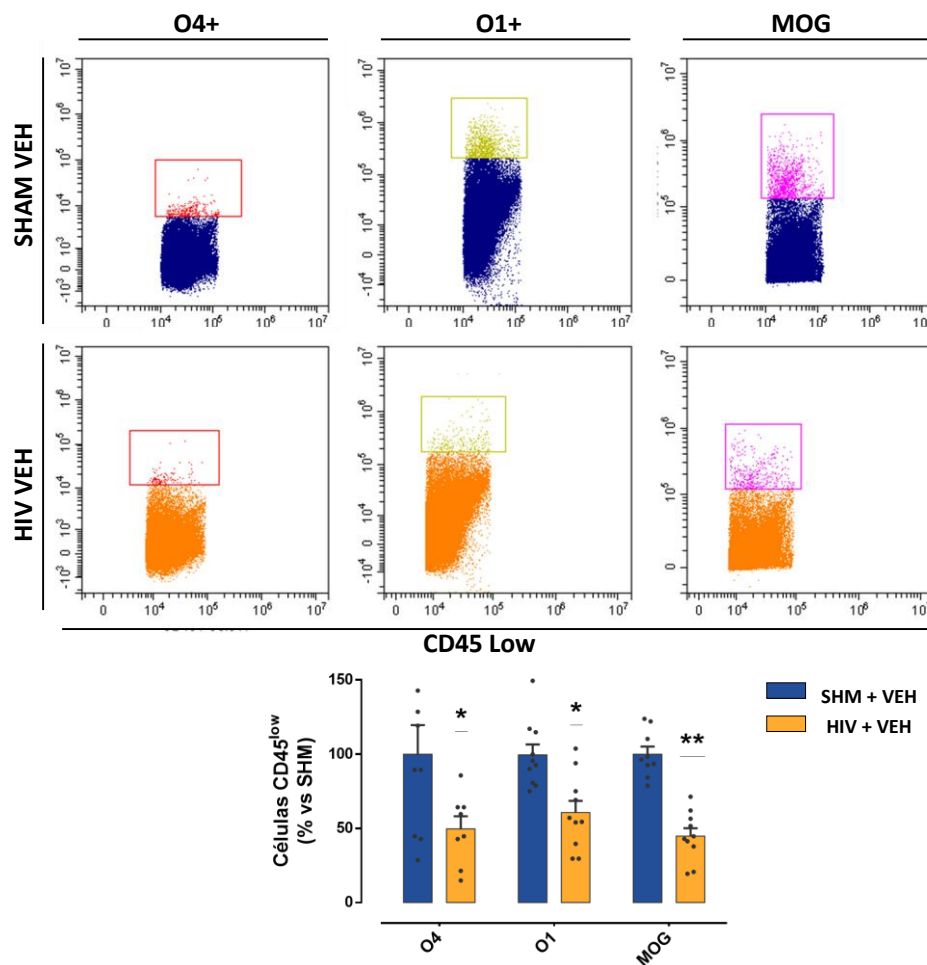
**Figura 37. Análisis del daño en la SB a largo plazo y relación con el volumen de lesión.** En nuestro modelo animal se produce una alteración en la SB que se relaciona directamente con el volumen de la lesión a corto y largo plazo. **(A)** Ratio de los niveles de intensidad de señal MBP en lado ipsilateral vs contralateral del CC Escala: 50µm. **(B)** Área del CC. **(C)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. **(D)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 6. **(E)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 45. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el test Mann-Whitney. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson. \*\* p < 0.01 (área CC vs % lesión PND 6 y % lesión PND 45) (N=20)

Se ha demostrado que tanto la hipomielinización, como la pérdida de volumen hemisférico a largo plazo son consecuencia de una alteración en el linaje oligodendroglial (**Fig. 39**)<sup>243</sup>. Por ello, decidimos conocer en qué estadio madurativo se veía comprometida su correcta maduración o supervivencia. Para ello, se analizó el número de integrantes del linaje oligodendroglial a medio plazo, periodo donde



**Figura 39. Marcadores de cada estadio madurativo del linaje oligodendroglial**

encontramos integrantes de los distintos estadios madurativos (preoligodendrocito, O4; oligodendrocito inmaduro, O1; oligodendrocito maduro, MOG) de esta estirpe celular. Como se puede ver en los ensayos llevados a cabo por CF, los animales HIV presentaron un porcentaje de células CD45<sup>low</sup> y marcaje O4, O1 y MOG inferior que los controles (**Fig. 38**).



**Figura 38. Análisis de la afectación del linaje oligodendroglial a medio plazo por CF** La HIV produce una reducción en el porcentaje de células CD45<sup>low</sup> y marcaje O4, O1, MOG. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10).

En este sentido, los datos indican que el daño en la SB producido en nuestro modelo animal tiene su origen en los estadios madurativo más tempranos del linaje oligodendroglial.

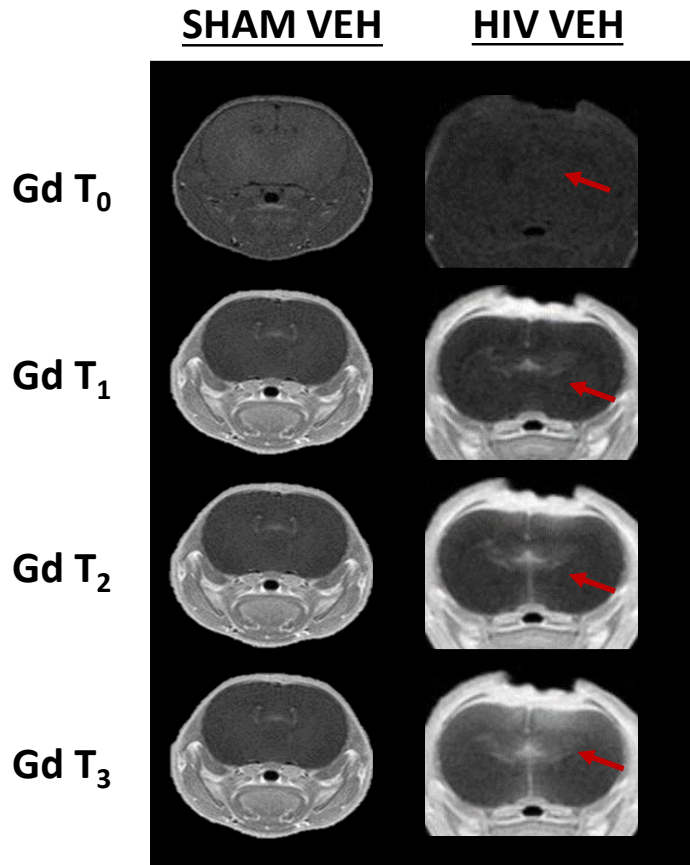
En resumen, nuestros resultados confirman que la inducción de la HIV en ratas PND 1 produce una afectación de tipo motor y cognitivo como consecuencia del daño en la SB en estadios muy tempranos. Por este motivo, dado que ya se conocen las principales secuelas y consecuencias de la HIV, fue necesario estudiar los posibles eventos fisiopatológicos implicados en dicho daño.

### ***Fisiopatología de la HIV en nuestro modelo animal***

Se ha discutido en numerosas enfermedades del SNC como la HIC o el *stroke*, los eventos fisiopatológicos presentes vienen precedidos por la alteración en el funcionamiento de la BHE, lo cual inducen la infiltración de macrófagos y otras moléculas circundantes<sup>77,244</sup>. Por otro lado, se ha demostrado como la inyección de *Colagenasa de Clostridium* produce la alteración de la MEC, uno de los principales integrantes de la BHE<sup>245,246</sup>. En este sentido, se realizó un estudio de los eventos fisiopatológicos que desencadena la HIV producida por la inyección de esta enzima a corto plazo, así como su mantenimiento o progresión a lo largo del tiempo.

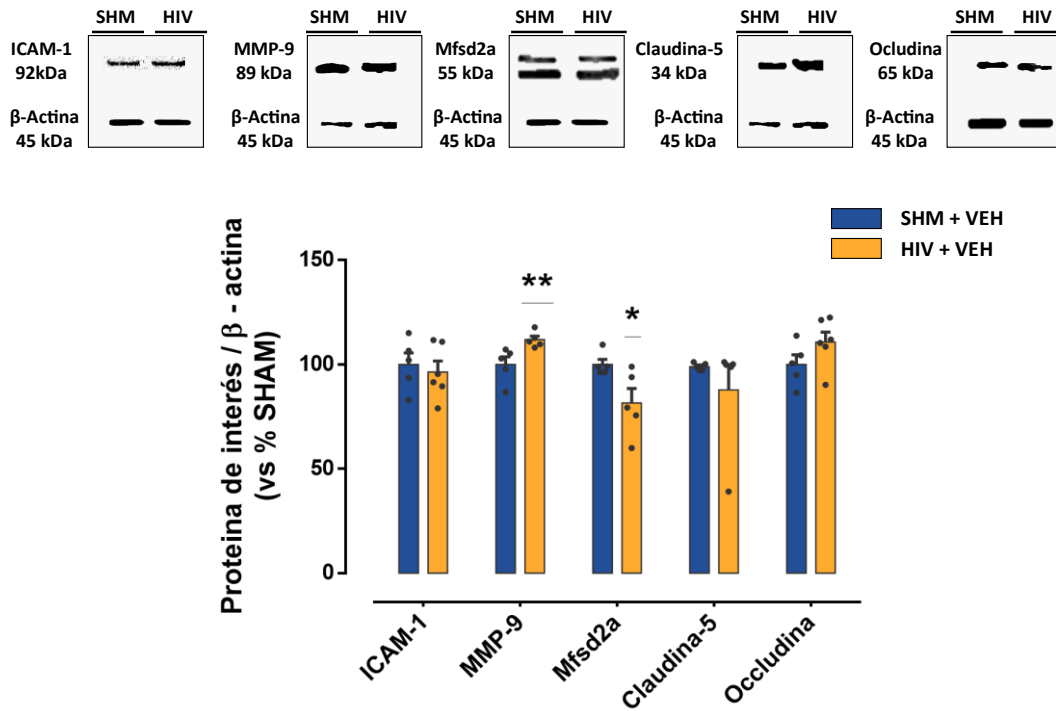
#### Fisiopatología evaluada a corto plazo (PND 6)

En primer lugar, dado que la alteración de la BHE ha demostrado tener un importante papel en la fisiopatología de numerosas enfermedades del SNC, se realizó el estudio de la integridad de esta estructura mediante técnicas de RM, BQ y CF, lo que permitió evaluar su estado tanto a nivel macroscópico como microscópico. Como se indica en la **Fig. 40**, los ensayos de RM realizados a corto plazo demostraron que, al contrario que los controles, los animales lesionados presentaron un aumento en el contraste en la imagen de RM a lo largo del tiempo, lo que se tradujo en una mayor extravasación de Gd y por tanto un aumento de la permeabilidad de la BHE.



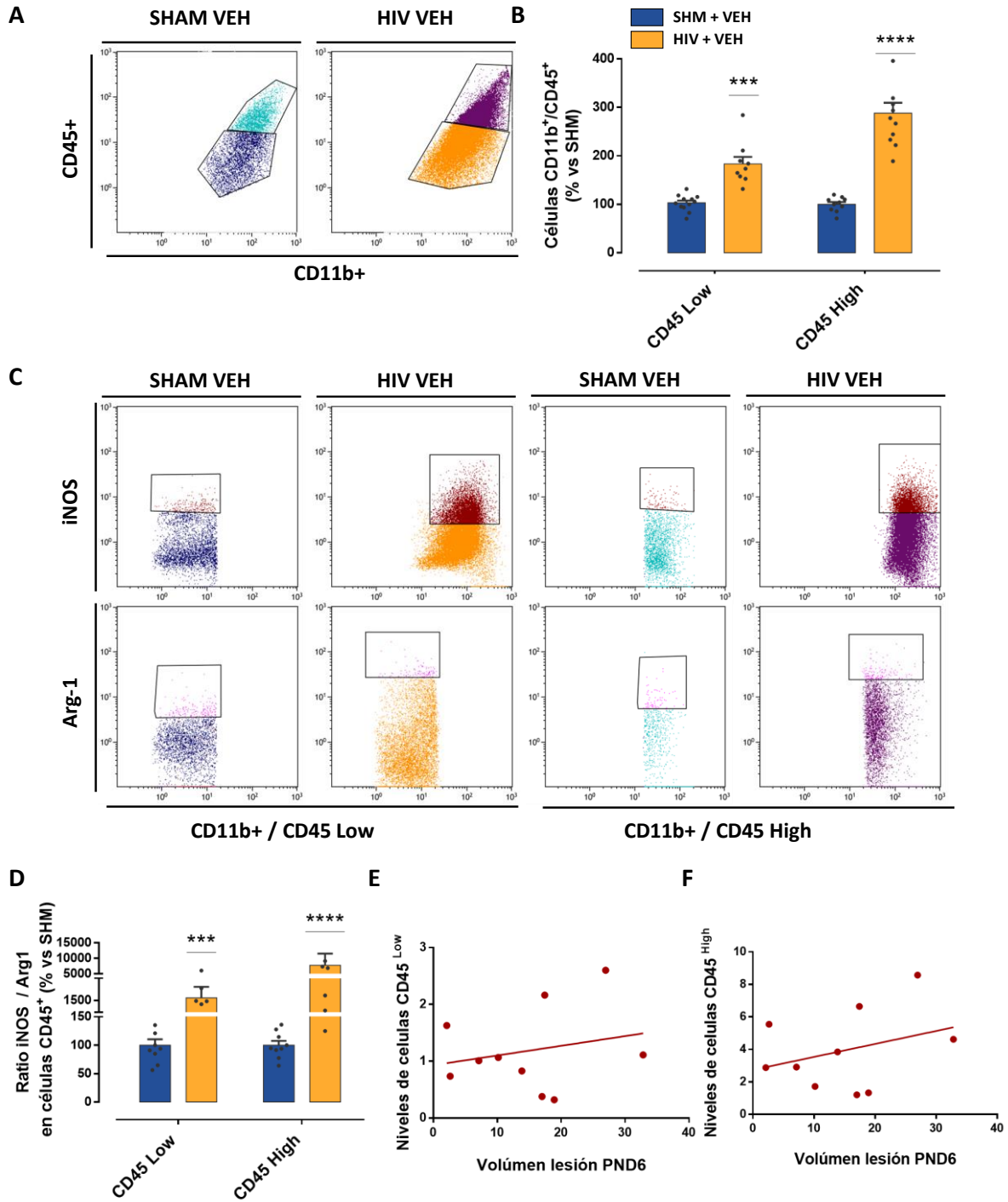
**Figura 40. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV llevado a cabo a PND 6.** Los animales lesionados presentan una extravasación de Gd tiempo-dependiente. La flecha roja indica el área de acumulación de Gd. Gd T<sub>0</sub>: imagen pre-contraste; T<sub>1</sub>: imagen 5' post-contraste; T<sub>2</sub>: imagen a 30' post-contraste; T<sub>3</sub>: imagen a 60' post-contraste. (N=8-10).

De manera complementaria, realizamos el análisis bioquímico de marcadores de daño e integridad de la BHE para confirmar macroscópicamente los resultados observados en las pruebas de neuroimagen. Los estudios de WB nos mostraron que, 5 días después del daño, se produjo en los animales lesionados un aumento de los niveles de MMP-9 y una reducción en los niveles del receptor Mfsd2a, marcadores de daño y funcionalidad de la BHE respectivamente. A su vez, no se observó ninguna diferencia cuando se analizaron los niveles de ICAM-1 o de las UEs claudina-5 y ocludina, dos de las proteínas encargadas del soporte físico de la BHE (**Fig. 41**). Por tanto, los análisis bioquímicos indican que la posible alteración de la BHE observada a corto plazo por RM se debe a alteraciones en la funcionalidad (particularmente en el flujo de iones) y desarrollo de esta estructura como consecuencia, en parte, de la liberación de MMP-9.



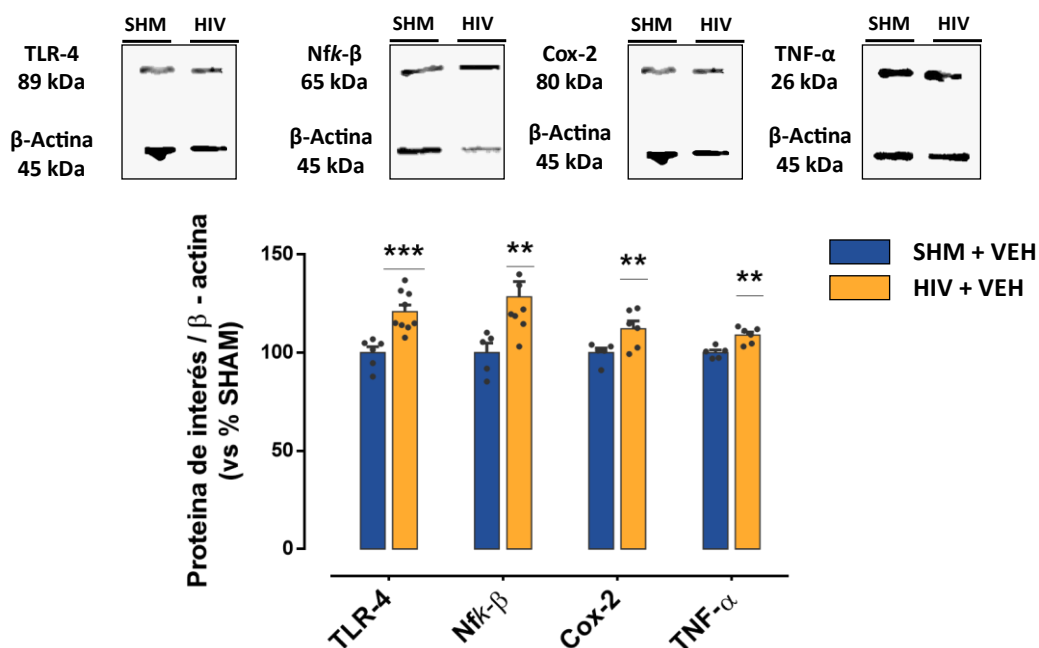
**Figura 41. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE a PND 6.** Los animales lesionados tienen alterados los niveles de Mfsd2a y MMP9. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10)

Es conocida la estrecha relación existente entre la afectación e hiperpermeabilidad de la BHE y la infiltración leucocitaria y reclutamiento microglial. En este sentido, dado que en nuestro modelo a corto plazo se podría estar produciendo una alteración de la barrera, decidimos evaluar las consecuencias de este evento. En consonancia con el análisis de los marcadores de BHE llevados por WB, los ensayos de CF nos mostraron que el grupo HIV presentaba mayores niveles de la población  $CD11b^+ / CD45^{high}$  y  $CD11b^+ / CD45^{medium/low}$  que el grupo control, indicando un posible aumento en la expresión de macrófagos y microglía respectivamente (**Fig. 42 A y B**). A su vez, en ambas subpoblaciones celulares, el grupo lesionado presentó una mayor ratio iNOS / Arg-1 (**Fig. 42 C y D**), proceso generalmente atribuido a un fenotipo proinflamatorio (M1). Por lo tanto, la HIV aumentó el reclutamiento e infiltrado de células del sistema inmune, ambas con un fenotipo de carácter proinflamatorio. Por otro lado, en contra de lo descrito habitualmente, también se observó que los niveles de hemorragia a corto plazo no correlacionaban con los niveles de expresión de la población  $CD45^{low}$  (**Fig. 42 E**) ni  $CD45^{high}$  (**Fig. 42 F**), sugiriendo que aquellos sujetos con escaso volumen de lesión también son susceptibles de sufrir activación microglial e infiltración de macrófagos.



**Figura 42. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> a PND 6.** En nuestro modelo animal se produce un aumento del número de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>. **(A)** Pictograma que representa el número de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> del grupo SHAM y HIV **(B)** Niveles de expresión de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> entre ambos grupos **(C)** Pictograma representativo del número de células que presentan el marcador iNOS o Arg-1 en la población CD45<sup>High</sup> & Low en ambos grupos **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>High</sup> & Low. **(E)** Relación entre el % de lesión PND 6 con CD45<sup>low</sup> **(F)** Relación entre el % de lesión PND 6 con CD45<sup>high</sup>. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el test Mann-Whitney. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson. (N=6-12)

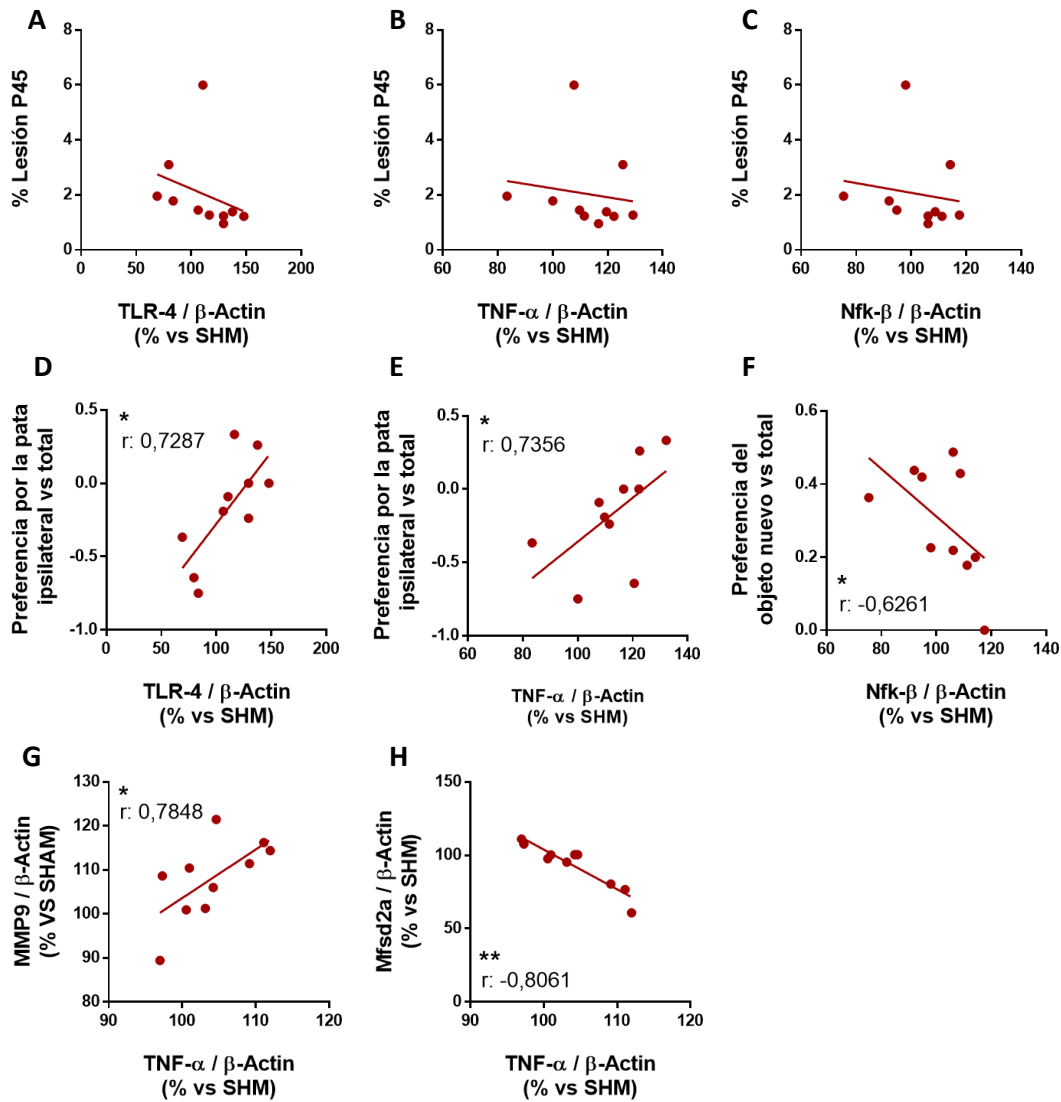
Como se ha descrito anteriormente, el reclutamiento e infiltración de microglía y macrófagos con un fenotipo M1 induce una serie de eventos fisiopatológicos que participan en el daño del SNC. Particularmente, la neuroinflamación producida por la activación de la vía de TLR-4 ha demostrado ser responsable de parte del daño producido en patologías similares. Como se observa en la **Figura 43**, el grupo HIV presentó a corto plazo un aumento de los niveles de expresión de este receptor. A su vez, también observamos como la lesión produjo un aumento en la expresión del factor nuclear Nfκ-B, y de los mediadores de daño Cox-2 y TNF-α, sugiriendo que en nuestro modelo animal se induce un estado proinflamatorio exacerbado posiblemente implicado en el daño neurológico.



**Figura 43. Análisis mediante WB de los niveles de expresión de marcadores proinflamatorios a PND 6.** Los animales lesionados presentan un aumento de los marcadores proinflamatorios. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10)

Dado que una de las hipótesis que nos planteamos en esta Tesis doctoral fue que **la inflamación, independientemente del sangrado, era capaz de producir alteraciones neuroconductuales y en la integridad y funcionalidad de la BHE**, llevamos a cabo estudios correlacionales que nos permitiesen confirmar este supuesto. En primer lugar, y basándonos en los estudios de CF, quisimos evaluar si efectivamente existía una relación entre el volumen de daño y los niveles de mediadores proinflamatorios a largo plazo. No existió ninguna correlación entre el porcentaje de lesión a PND 45 y los niveles de expresión de TLR-4, TNF-α y Nfκ-B (**Fig. 44 A-C**), confirmando de nuevo la independencia entre el volumen de sangrado y el daño secundario. También existía

una correlación directa entre los niveles de TLR-4 y TNF- $\alpha$  y los resultados obtenidos en la prueba del CRT (**Fig. 44 D y E**), indicando que a medida que aumentaban los niveles de estos marcadores los animales presentaban una menor preferencia por la pata contralateral. Del mismo modo, también correlacionó (en este caso de manera inversa) los niveles de expresión de Nfk-B y la preferencia por el objeto nuevo en la prueba del NOR (**Fig. 44 F**). En conjunto, estos datos sugieren que tanto el déficit motor como el cognitivo se relacionaba con un aumento en los niveles inflamatorios.

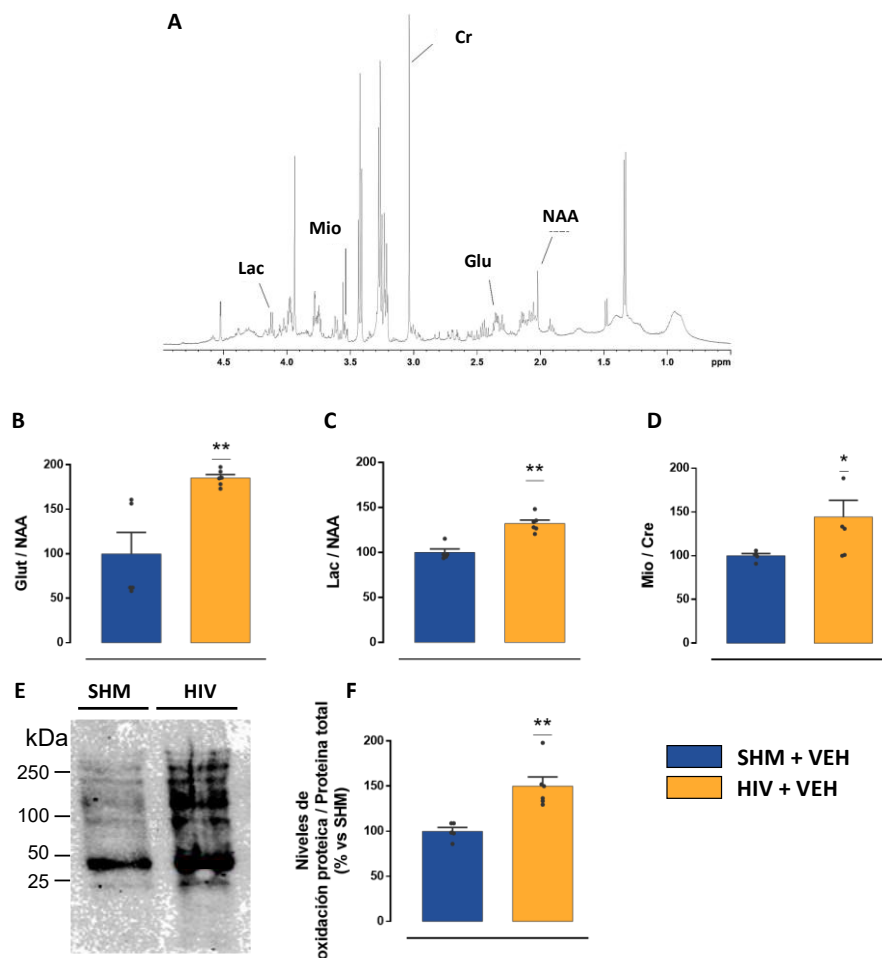


**Figura 44. Relación entre la inflamación y el daño a nivel funcional y en la BHE.** Independientemente del grado de lesión, la inflamación está directamente implicada en el déficit neuroconductual y en el daño de la BHE. **(A-C)** Relación entre el porcentaje de lesión a PND 45 y los niveles de expresión de TLR4, TNF $\alpha$  y NfkB respectivamente. **(D y E)** Relación entre prueba del CRT y los niveles de expresión de TLR4, TNF $\alpha$  **(F)** Relación entre la prueba del NOR y los niveles de expresión de NfkB. **(G y H)** Relación entre los niveles de expresión de TNF $\alpha$  y MMP9 y Mfsd2a respectivamente a PND 6. Los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (N=10-20)

Por último, dado que se ha observado la presencia de inflamación y daño de la BHE en estadios muy tempranos de la enfermedad, evaluamos si ambos eventos fisiopatológicos estaban relacionados a corto plazo en nuestro modelo. Como se indica en esta misma figura, existía una relación directamente proporcional entre los niveles de expresión de la CK TNF- $\alpha$  y MMP-9 (**Fig. 44 G**), indicando así la interacción presente entre la inflamación y el daño en BHE. A su vez, los niveles de este mismo marcador proinflamatorio y los del receptor Mfsd2a correlacionaban inversamente, de forma que a medida que aumentó la expresión de esta CK, los niveles de expresión de este descendieron (**Fig. 44 H**). Esto confirmó la relación existente entre la inflamación y la disfuncionalidad de la BHE. Por lo tanto, a corto plazo el aumento de la inflamación (independientemente del grado de lesión) influyó sobre el pronóstico del animal y la integridad de la BHE.

Como se ha descrito en apartados anteriores, la HIV es una patología multifactorial cuyo daño no se debe exclusivamente a la inflamación, sino que otros eventos fisiopatológicos desencadenados tras la lesión pueden potenciar el daño ya presente. En este sentido, evaluamos mediante H<sup>+</sup> MRS la posible alteración de los niveles de ciertos metabolitos presentes en la corteza somatosensorial (**Fig. 45 A**). En el grupo HIV se produjo un aumento de los niveles de Glutamato (**Fig. 45 B**), Lactato (**Fig. 45 C**) y Mioinositol (**Fig. 45 D**), marcadores de excitotoxicidad, daño tisular y disfunción astrocitaria respectivamente. De la misma forma, también se observó como estos mismos animales presentaron un mayor porcentaje de proteínas oxidadas (**Fig. 45 E y F**). Por lo tanto, de forma adicional a la inflamación, a corto plazo existen otros eventos fisiopatológicos que podrían estar contribuyendo al daño producido por la HIV.

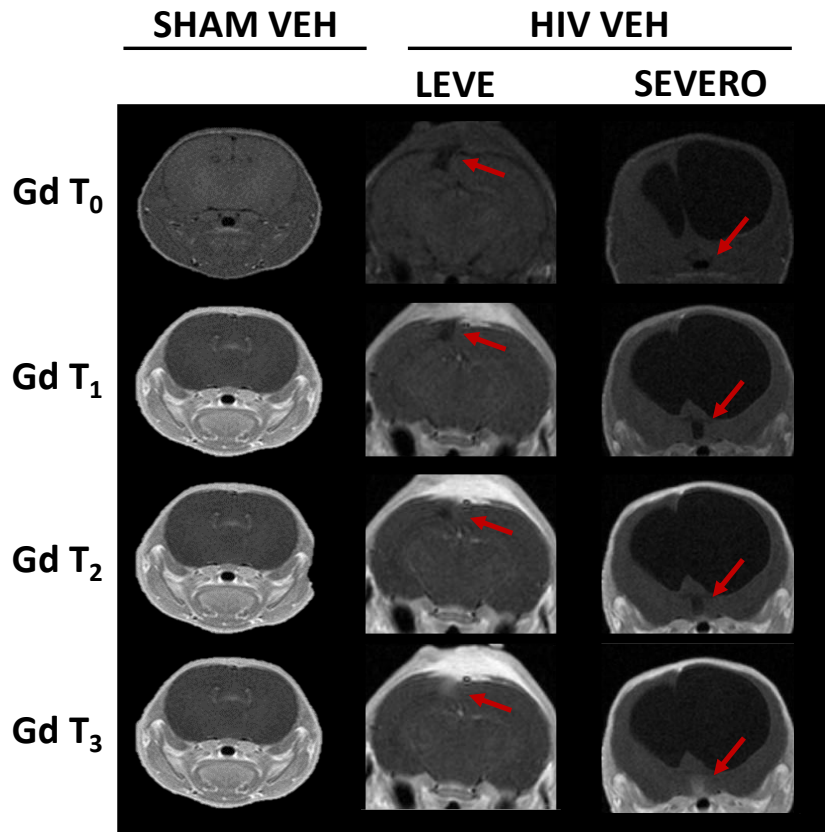
En resumen, la inyección de *Colagenasa de Clostridium* indujo la alteración de la BHE y el desencadenamiento de los eventos fisiopatológicos descritos previamente. No obstante, dada la relevancia de estos fenómenos, decidimos llevar a cabo su estudio a lo largo del tiempo con el objetivo de conocer de forma más precisa el transcurso de la fisiopatología en esta enfermedad.



**Figura 45. Niveles de Glutamato, Lactato, Mioinositol y oxidación proteica a PND 6.** En nuestro modelo animal se produce un aumento en los niveles de los metabolitos analizados por H+MRS y de la oxidación proteica analizada mediante el kit Oxyblot. **(A)** Representación de los metabolitos localizados en el espectro **(B)** Niveles de Glutamato (Ratio Glut / NAA) **(C)** Niveles de Lactato (Ratio Lac / NAA) **(D)** Niveles de Mioinositol (Ratio Mio / Cre). **(E)** Imagen representativa del *oxyblot*. **(F)** Análisis de la oxidación proteica de muestras cerebrales respecto a la proteína total. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante Mann-Whitney. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=6-10)

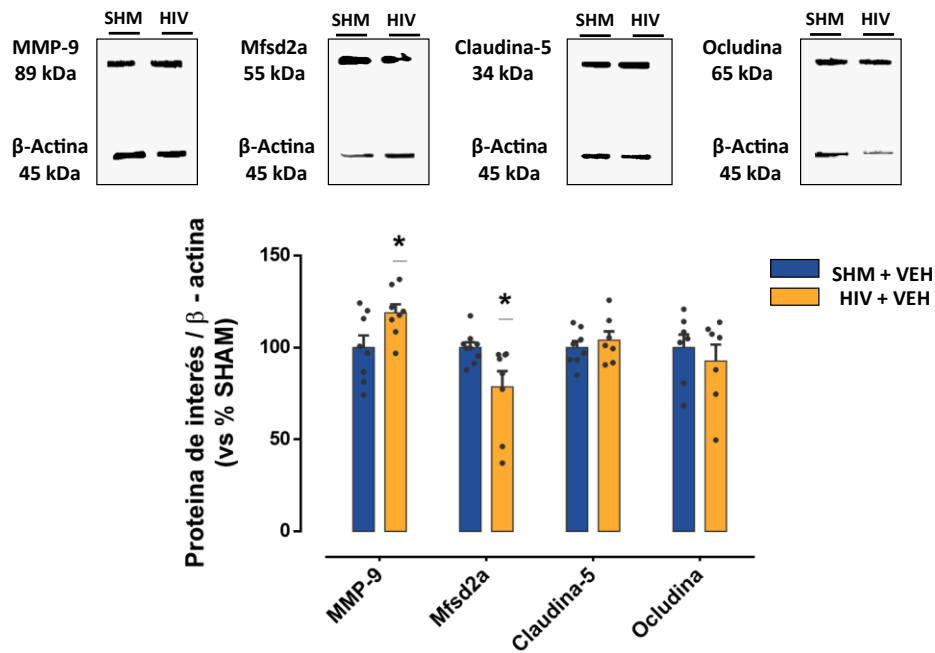
### Fisiopatología evaluada a medio plazo (PND 14)

Al igual que en el punto temporal anterior, decidimos continuar los estudios de RM para comprobar si la alteración de la BHE se mantenía. Tal y como se muestra en la **Figura 46**, los animales lesionados presentaron una menor área hiperintensa comparado con el apartado anterior, lo que se tradujo en una menor extravasación del Gd e hiperpermeabilidad. A su vez, se observó que en los casos leves esta afectación se localizaba en la zona cortical, mientras que en los casos graves se producía a nivel talámico. Por contra, en los sujetos controles no se producía ningún tipo de alteración.



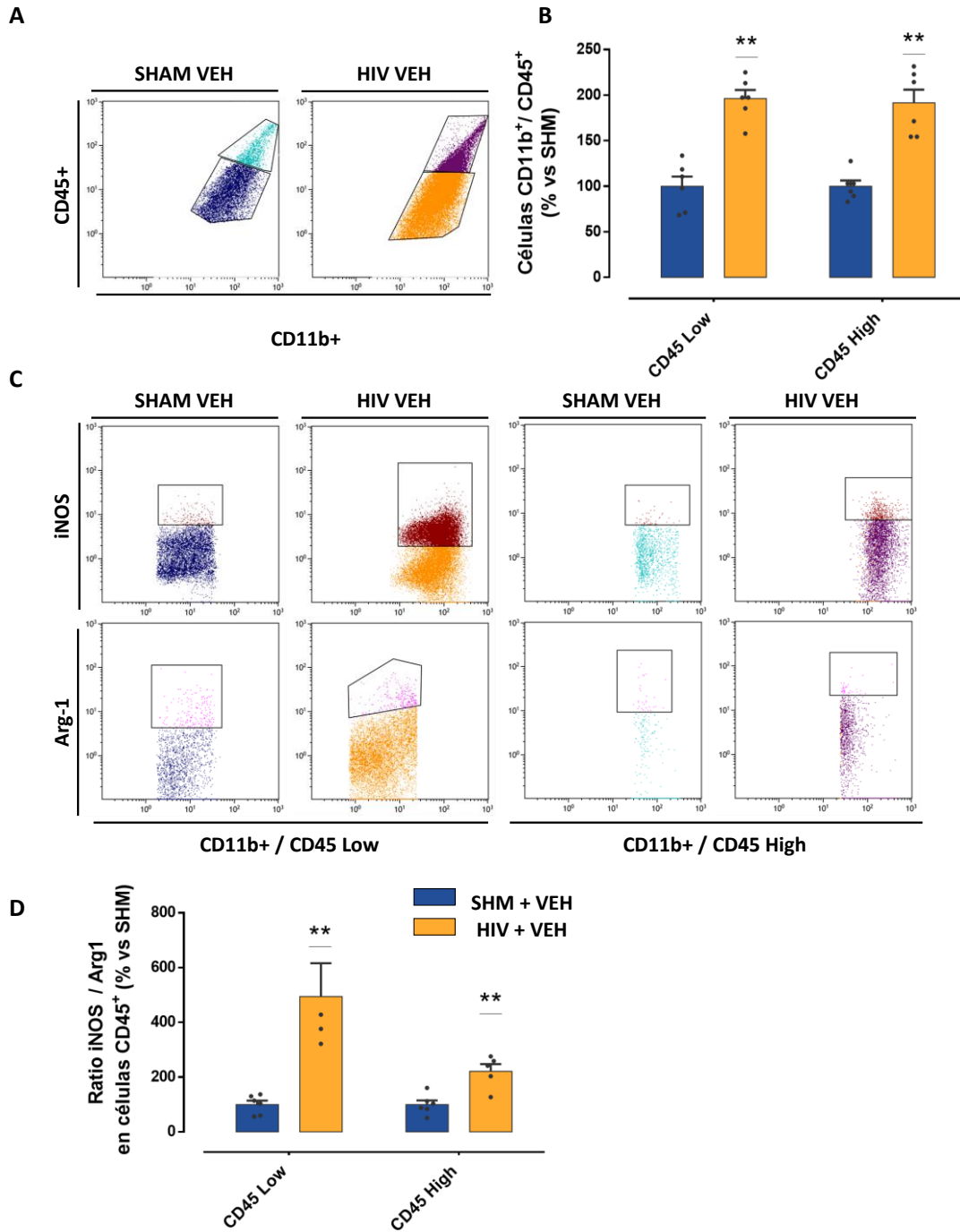
**Figura 46. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV llevado a cabo a PND 14.** A medio plazo se produce una acumulación de Gd en los HIV leves y severos, siendo diferente su localización en función de la severidad de la lesión. Las flechas indican la localización exacta en la que se sigue produciendo a PND 14 la extravasación y acumulación de Gd en el grupo HIV. Gd T<sub>0</sub>: imagen pre-contraste; T<sub>1</sub>: imagen 5' post-contraste; T<sub>2</sub>: imagen a 30' post-contraste; t<sub>3</sub>: imagen a 60' post-contraste. (N=5-10)

Nuevamente, decidimos complementar el análisis de la BHE midiendo los niveles de expresión de las proteínas Mfsd2a y MMP-9, dos de los marcadores que anteriormente resultaron alterados en presencia de la hemorragia. El grupo HIV presentó a medio plazo un aumento en los niveles de MMP-9 y un descenso en el porcentaje de expresión del receptor Mfsd2a, sugiriendo que el daño y disfuncionalidad de la BHE se mantenía también a medio plazo en nuestro modelo. Por otro lado, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de las UEs claudina-5 y ocludina (**Fig. 47**).



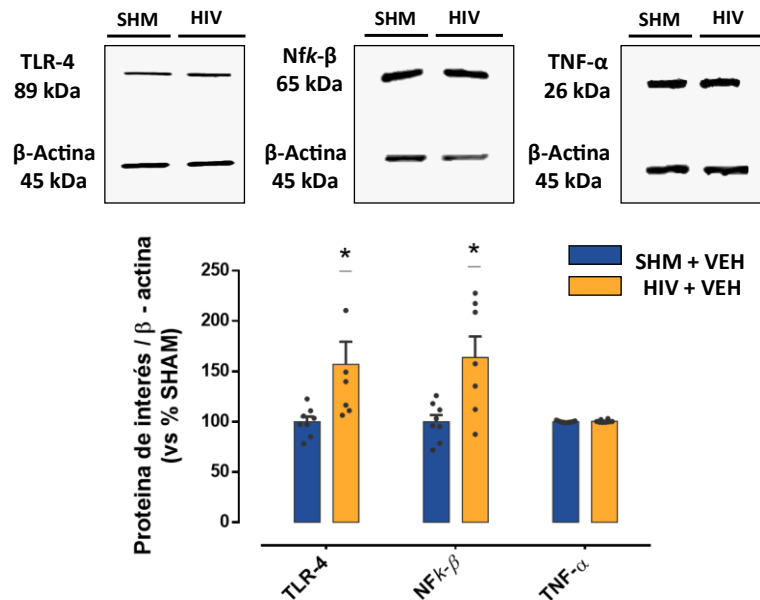
**Figura 47. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE a PND 14.** En los animales lesionados hay un aumento de MMP9 y Mfsd2a. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10)

Al igual que ocurría en el punto temporal anterior, la alteración de la BHE en los animales lesionados se tradujo en un mayor porcentaje de células CD11b<sup>+</sup> que expresaban los marcadores CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> (Fig. 48 A y B). A su vez, de nuevo en estos animales el ratio iNOS / Arg-1 fue mayor en ambas poblaciones (Fig. 48 C y D) en comparación con el grupo SHAM. Esto sugiere que, a medio plazo, en consonancia con los resultados observados en los análisis de RM y BQ, sigue existiendo un reclutamiento de macrófagos y microglía ambos con fenotipo M1 o proinflamatorio, que podrían estar involucrados en el daño cerebral.



**Figura 48. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> a PND 14.** En nuestro modelo animal se produce un aumento del número de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>. **(A)** Pictograma que representa el número de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> del grupo control y HIV **(B)** Niveles de expresión de células CD11b<sup>+</sup> con marcaje CD45<sup>low</sup> y Cd45<sup>high</sup> entre ambos grupos **(C)** Pictograma representativo del número de células que presentan el marcador iNOS o Arg-1 en la población CD45<sup>High</sup> & <sup>Low</sup> en ambos grupos **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> y CD45<sup>High</sup> & <sup>Low</sup>. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante Mann-Whitney. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10)

Asimismo, la alteración de la BHE y el reclutamiento de células inmunes con fenotipo M1 se tradujo a medio plazo en un aumento de la expresión proteica del receptor TLR-4 y del factor Nfκ-B en el grupo lesionado. Por el contrario, los niveles de expresión de la CK proinflamatoria TNF-α en este punto temporal no estaban incrementados (**Fig. 49**).

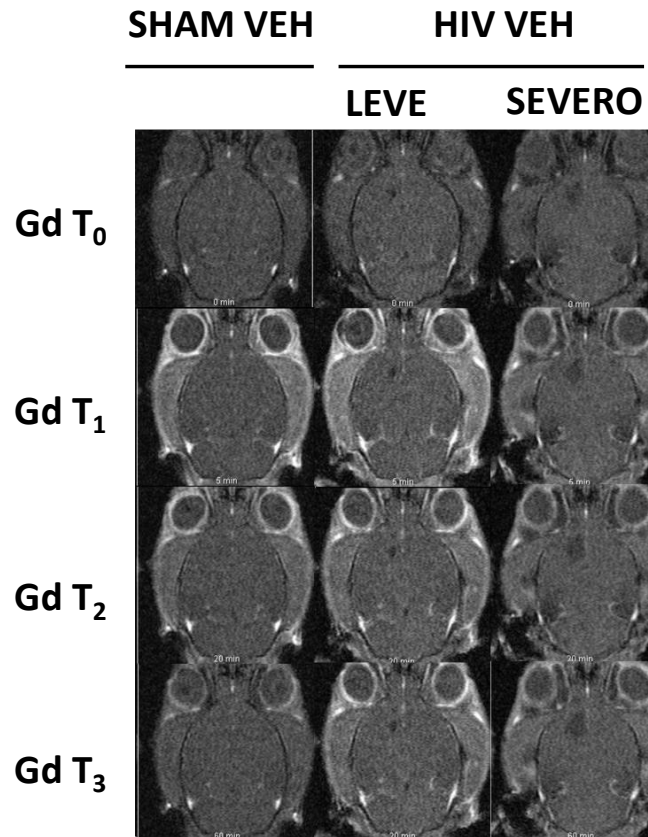


**Figura 49** Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a PND 14. En los animales lesionados hay un aumento de los marcadores proinflamatorios. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10)

En conclusión, los resultados observados a medio plazo nos indican que, a pesar de seguir manteniéndose parte de los procesos fisiopatológicos, a lo largo del tiempo estos comienzan a atenuarse. Por ello, decidimos concluir el estudio de la fisiopatología evaluando los niveles de los diferentes marcadores de daño también a largo plazo.

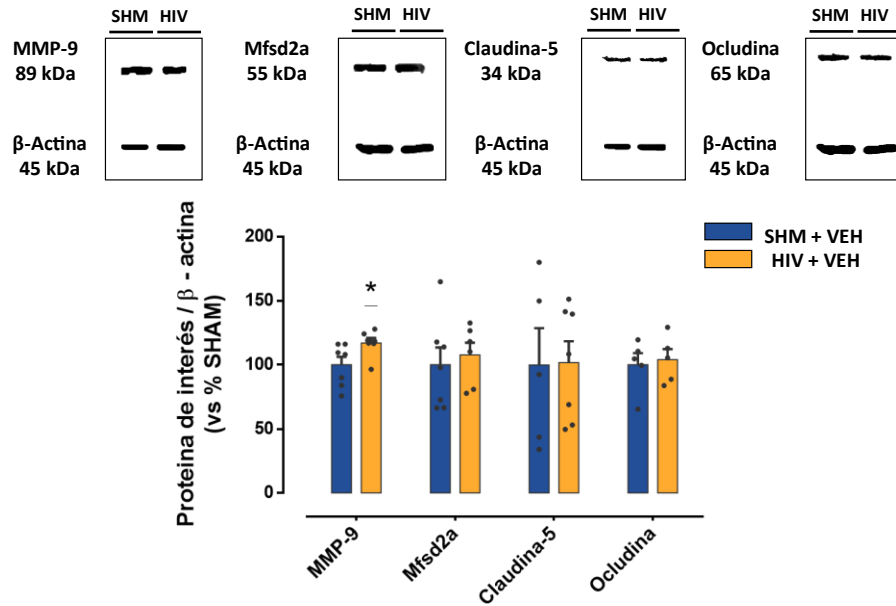
Fisiopatología evaluada a largo plazo (PND 45)

En la **Fig. 50**, los estudios de RM indicaron que, a largo plazo, independientemente del daño, desaparecía la hiperdensidad producida por la extravasación y acumulación de Gd. Este resultado confirma la tendencia observada en puntos anteriores, donde la afectación de la BHE se atenúa en el tiempo.



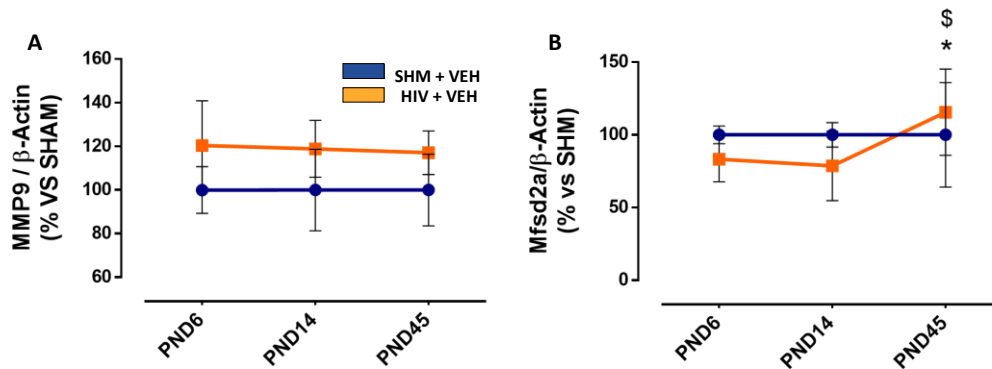
**Figura 50.** Imagen representativa de la posible extravasación de Gd en el grupo control y HIV llevado a cabo a PND 45. A largo plazo ya no se produce una acumulación de Gd en los animales lesionados. Gd T<sub>0</sub>: imagen pre-contraste; T<sub>1</sub>: imagen 5' post-contraste; T<sub>2</sub>: imagen a 30' post-contraste; T<sub>3</sub>: imagen a 60' post-contraste. (N=5-10)

De manera complementaria, de nuevo evaluamos los niveles de expresión de marcadores de daño y permeabilidad de la BHE. A pesar de encontrar unos niveles de MMP-9 elevados, los animales HIV no presentaron diferencias significativas con el grupo control en el resto de los marcadores, lo que confirma los resultados obtenidos a nivel macroscópico (**Fig. 51**).



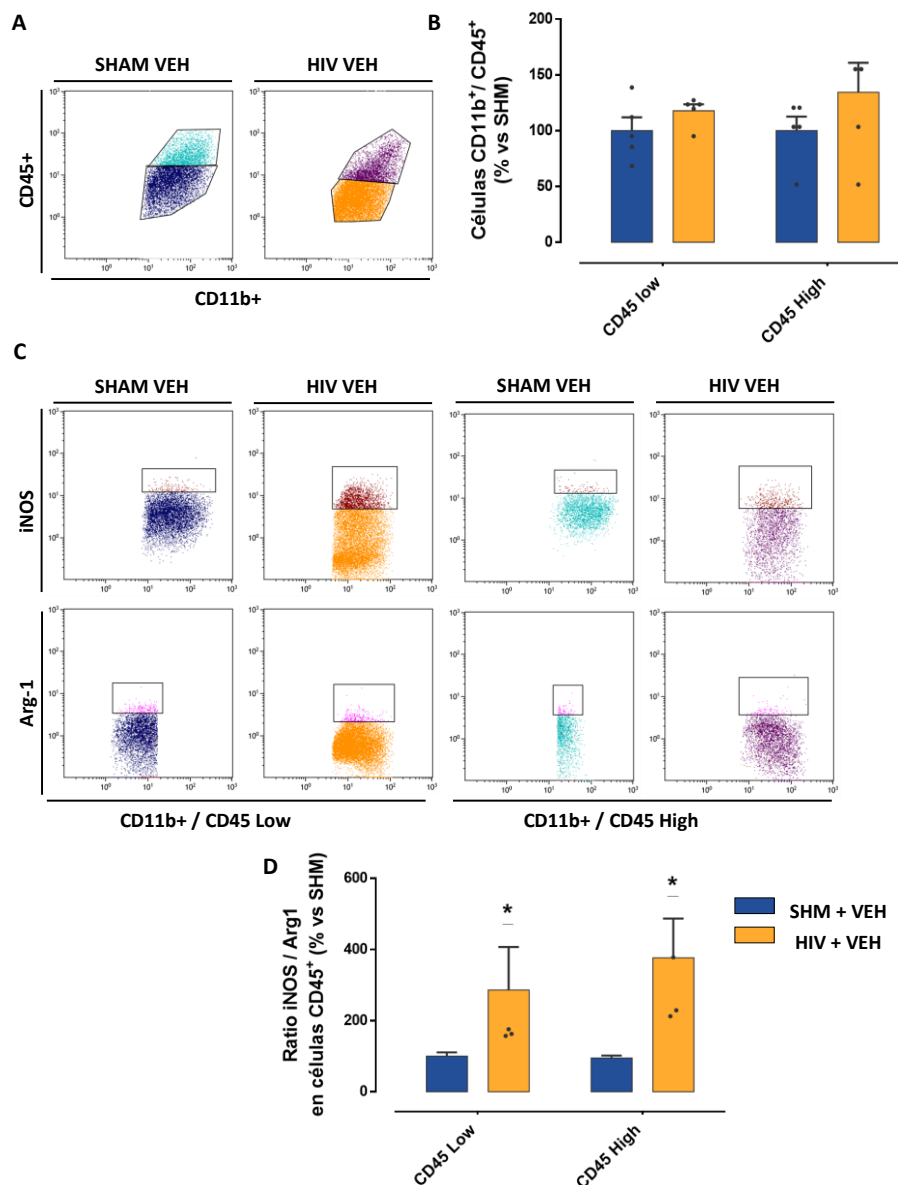
**Figura 51. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE a PND 45.** Los animales HIV presentan un aumento de MMP9. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=8-10)

A su vez, no se produjo ningún tipo de alteración en los niveles de MMP-9 a lo largo del tiempo, y esta siguió incrementada a largo plazo (**Fig. 52 A**). Sin embargo, los niveles del receptor Mfsd2a aumentaron a largo plazo en los animales HIV (**Fig. 52 B**). En este sentido, la recuperación de la BHE se relacionó, al menos en parte, a un aumento de la expresión del receptor Mfsd2a.



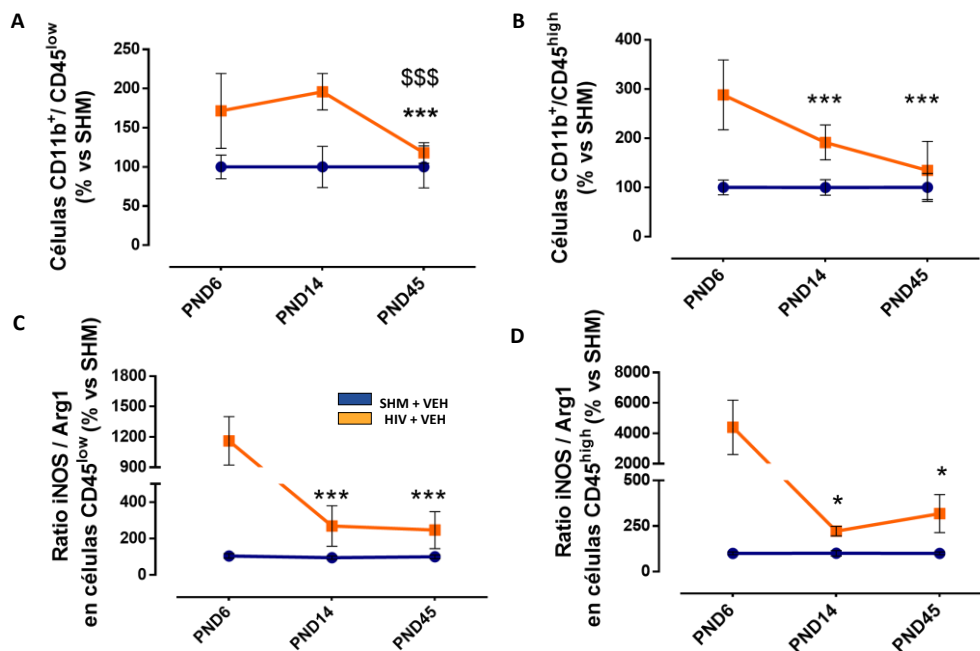
**Figura 52. Evolución de los niveles de MMP9 y Mfsd2a a lo largo del tiempo.** En nuestro modelo animal los niveles de MMP9 se mantienen, pero los del receptor Mfsd2a varían a largo plazo. **(A)** Niveles de expresión de MMP9 respecto de la proteína control  $\beta$ -actina. **(B)** Niveles de expresión de Mfsd2a respecto de la proteína  $\beta$ -actina. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías seguido de un post-test de Bonferroni entre los distintos puntos temporales de cada mismo grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (\* respecto a los animales HIV + VEH PND 6;  $\$$  respecto a los animales HIV + VEH PND 14) (N=8-16)

Por todo ello, decidimos analizar si la mejora en la BHE se tradujo en un menor reclutamiento de las células del sistema inmune. En consonancia con los resultados anteriores, a largo plazo no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles de la población CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>low</sup> (Fig. 53 A) y CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>high</sup> (Fig. 53 B). Los animales que sufrieron hemorragia seguían presentando un mayor ratio de iNOS / Arg-1, tanto en la población “low” (Fig. 53 C) como en la “high” (Fig. 53 D). Por tanto, a pesar de reducirse el reclutamiento de microglía y macrófagos a largo plazo, estos seguían presentando un fenotipo proinflamatorio.



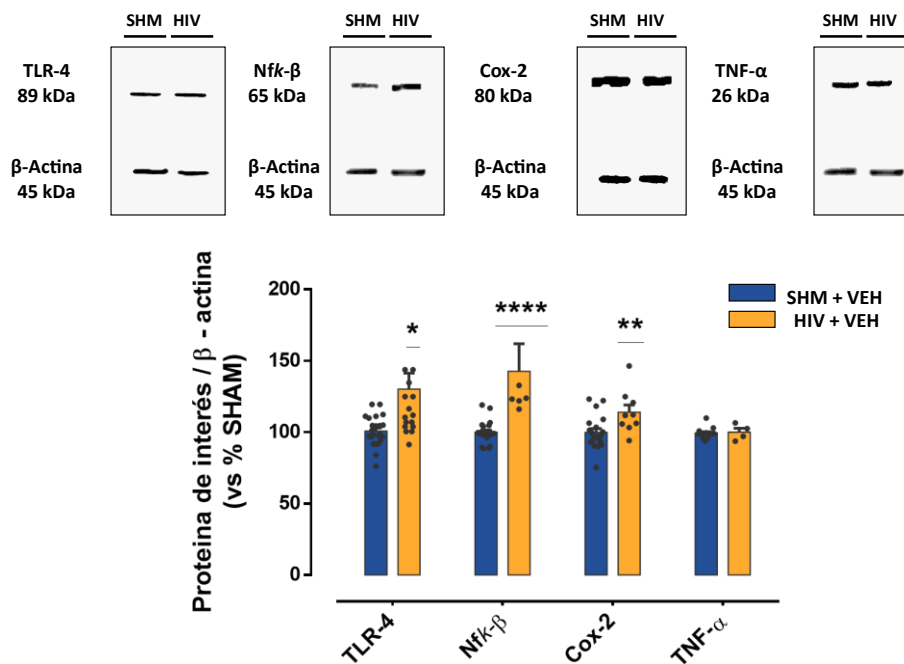
**Figura 53. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> a PND 45.** En nuestro modelo animal no existen diferencias en el número de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>. (A) Pictograma que representa el número de células CD11b<sup>+</sup> / Cd45<sup>+</sup> del grupo SHAM y HIV (B) Niveles de expresión de células CD11b<sup>+</sup> con marcaje CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> entre ambos grupos (C) Pictograma representativo del número de células que presentan el marcador iNOS o Arg-1 en la población CD45<sup>High</sup> & Low en ambos grupos (D) Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> y CD45<sup>High</sup> & Low. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico Mann-Whitney. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=5)

No obstante, al igual que hicimos en los análisis de la BHE, decidimos evaluar si las diferencias en la expresión a nivel temporal por parte de las poblaciones de microglía y macrófagos en los HIV eran significativas. Los niveles de la población CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>low</sup> se mantuvieron elevados hasta medio plazo, momento a partir del cual se redujeron de forma significativa (**Fig. 54 A**). Sin embargo, en el caso de la población CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>high</sup>, esta diferencia se produce a partir de PND 14 (**Fig. 54 B**), de forma que la reducción en los niveles de infiltración de macrófagos es más temprana que en la microglía. Por último, observamos también como en ambas poblaciones, el ratio iNOS / Arg-1 también se redujo a partir del día 14 después de la lesión (**Fig. 54 C y D**), indicando un descenso de la gravedad del daño a lo largo de los días.



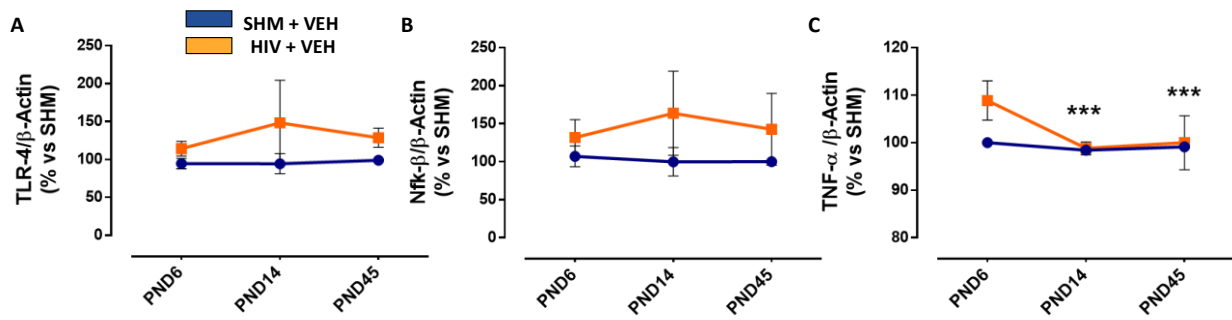
**Figura 54. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> a lo largo del tiempo.** En nuestro modelo animal se produce una alteración en los niveles de expresión de ambas poblaciones y de su fenotipo a lo largo del tiempo. **(A)** Niveles de expresión de células con marcaje CD11b<sup>+</sup>/ CD45<sup>low</sup>. **(B)** Niveles de expresión de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> y CD45<sup>high</sup> **(C)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> y Cd45<sup>Low</sup> **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> y CD45<sup>High</sup>. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías seguido de un post-test de Bonferroni entre los distintos puntos temporales de cada mismo grupo. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (\* respecto a los animales HIV + VEH PND 6; \$ respecto a los animales HIV + VEH PND 14) (N=5-10)

A pesar de observarse un descenso en la severidad del daño a largo plazo, dado que los niveles del ratio iNOS / Arg-1 aún estaban elevados en los animales HIV, decidimos evaluar si esto seguía promoviendo un estado proinflamatorio. A PND 45 los animales lesionados siguieron presentando una activación de los mediadores inflamatorios TLR-4, NfK-B y Cox-2; no obstante, los niveles de expresión de la CK TNF- $\alpha$  fueron iguales en ambos grupos (**Fig. 55**).



**Figura 55. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a PND 45.** Los animales HIV presentan un aumento de los niveles de marcadores proinflamatorios. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. El análisis de datos utilizado es una t de Student con la corrección de Welch cuando las varianzas son significativamente diferentes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=6-18)

La comparación de los niveles de expresión de estos marcadores a lo largo del tiempo nos indicó que, a pesar de no encontrarse ninguna diferencia en la expresión de TLR-4 ni NfK-B (**Fig. 56 A y B**), la CK proinflamatoria TNF- $\alpha$  demostró ser dependiente del tiempo en el daño hemorrágico, ya que se observó como a medio y largo plazo los niveles de expresión eran menores que a PND 6 (**Fig. 56 C**).



**Figura 56. Evolución de los niveles de expresión de TLR-4, Nfk-B y TNF- $\alpha$  a lo largo del tiempo.** En nuestro modelo animal se detectó un descenso en la expresión de TNF- $\alpha$  a partir de PND 14. **(A)** Niveles de expresión de TLR-4 respecto de la proteína control  $\beta$ -actina. **(B)** Niveles de expresión de Nfk-B respecto de la proteína control **(C)** Niveles de expresión de TNF $\alpha$  respecto de la proteína control. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías seguido de un post-test de Bonferroni entre los distintos puntos temporales de cada mismo grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (\* respecto a los animales HIV + VEH PND 6; § respecto a los animales HIV + VEH PND 14) (N=8-16)

En conclusión, los resultados del **Diseño experimental 1** permiten demostrar que la inyección paraventricular de 0,2 U de *Colagenasa de Clostridium* provocó una hemorragia de tamaño variable y constante que, de manera secundaria, indujo la alteración de la BHE y de diversos eventos fisiopatológicos descritos en esta enfermedad. Por otro lado, se observó cómo independientemente del volumen de la lesión, este daño se atenuó a lo largo del tiempo, lo que, a pesar de todo, no exime al individuo de sufrir alteraciones funcionales y neuroanatómicas a largo plazo.

# Efecto terapéutico del CBD

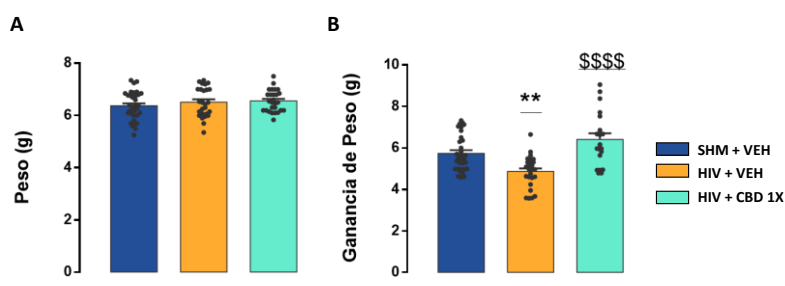
Una vez desarrollado un modelo animal que reproduce de manera eficaz la fisiopatología y secuelas de la HIV, iniciamos la búsqueda de una terapia que pudiese prevenir el desarrollo de la PC. Para ello, este diseño experimental se dividió en tres subapartados diferentes en los que se valoró el posible efecto neuroprotector del CBD administrado postlesionamente y prenatalmente de forma única o combinada.

## ***Tratamiento postnatal con CBD***

Para evaluar el efecto terapéutico del CBD administrado postlesionalmente, en primer lugar, analizamos su eficacia tras ser administrado 6 horas después del daño, ya que en la clínica el diagnóstico nunca suele ser inmediato.

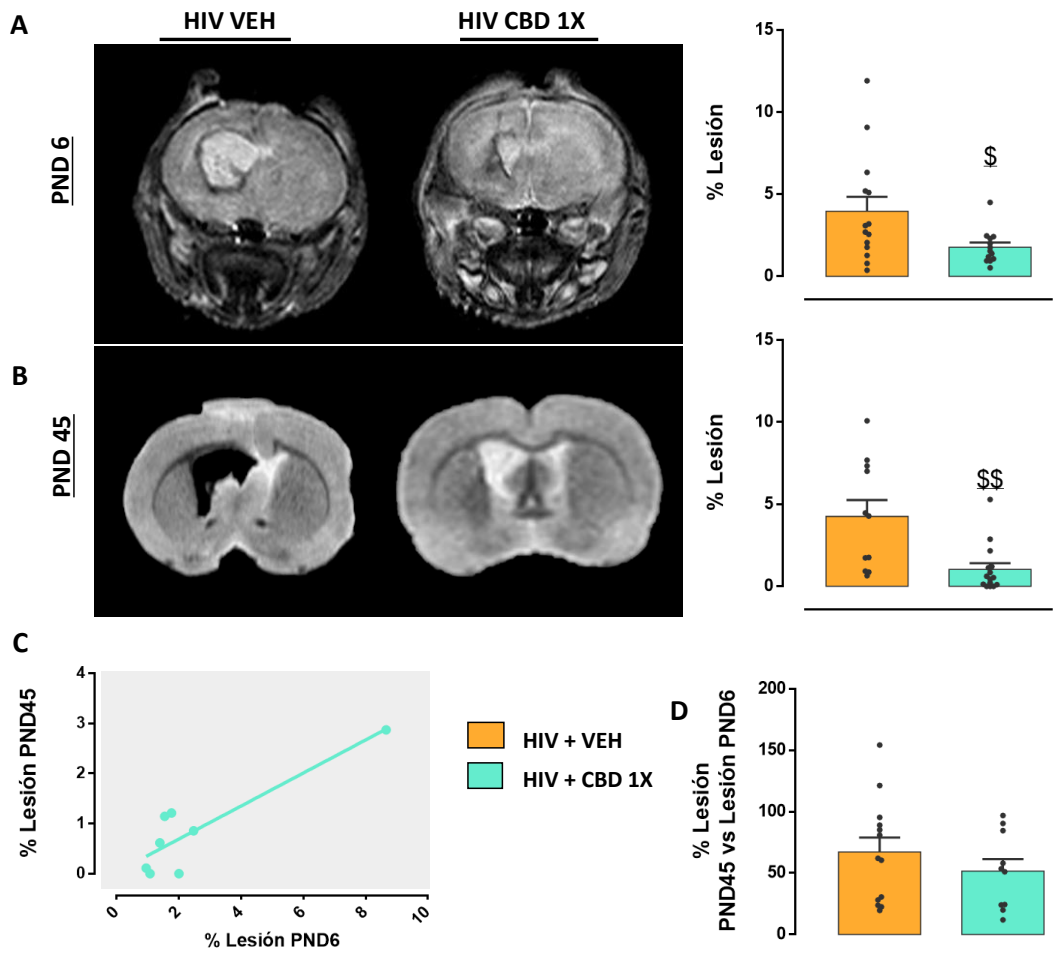
### Efecto neuroprotector del CBD administrados 6 horas después de la hemorragia

Al igual que en el Diseño experimental anterior, inicialmente evaluamos la ganancia de peso de los animales tratados en comparación con los otros grupos. Como se indica en la **Fig. 57**, el tratamiento con CBD evitó la pérdida de peso a largo plazo presente en los animales HIV tratados con vehículo, a pesar de presentar un peso inicial (PND 1) similar.



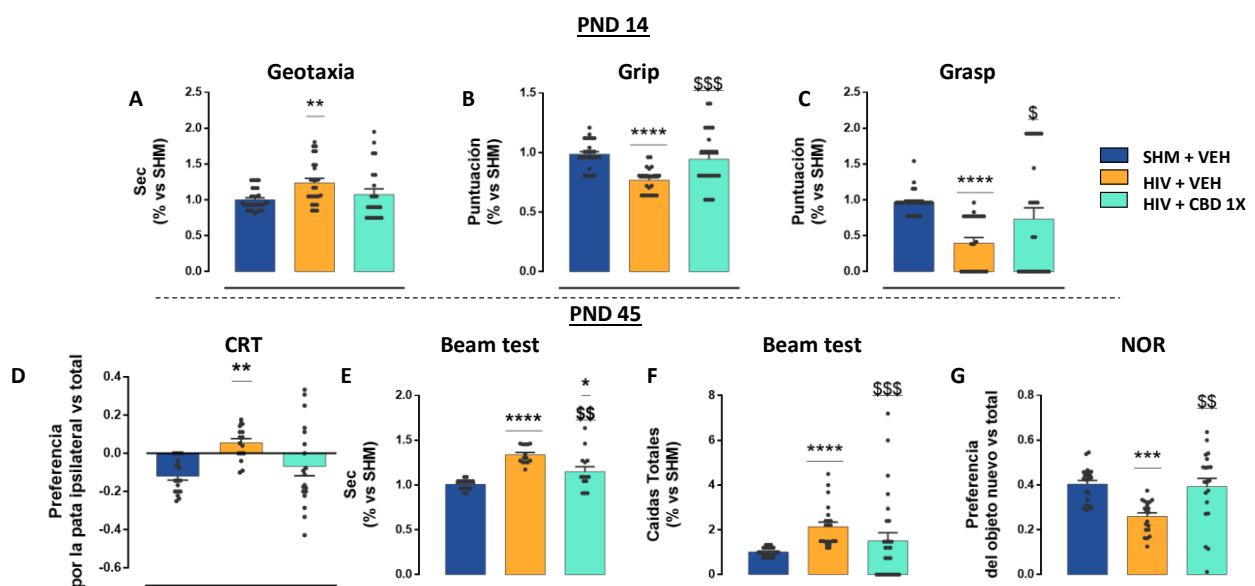
**Figura 57. Efecto del CBD sobre el peso.** El tratamiento con CBD a las 6 horas después del daño previene de forma total la pérdida de peso presente en el modelo **(A)** Peso (g). **(B)** Ganancia de peso (g). Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=30)

En cuanto al efecto producido sobre el volumen de sangrado, la administración postlesional de CBD a las 6 horas redujo el volumen de la lesión a corto (Fig. 58 A) y a largo plazo (Fig. 58 B). Por otro lado, aunque en los estudios que realizamos para evaluar el progreso de la lesión no hubo correlación entre el volumen a corto y largo plazo (Fig. 58 C), las diferencias con el grupo HIV + VEH no fueron estadísticamente significativas (Fig. 58 D). Por lo tanto, aunque el tratamiento postlesional con CBD a las 6 h después del daño redujo el volumen de daño, su mantenimiento a lo largo del tiempo no es significativamente diferente al de los animales tratados con vehículo.



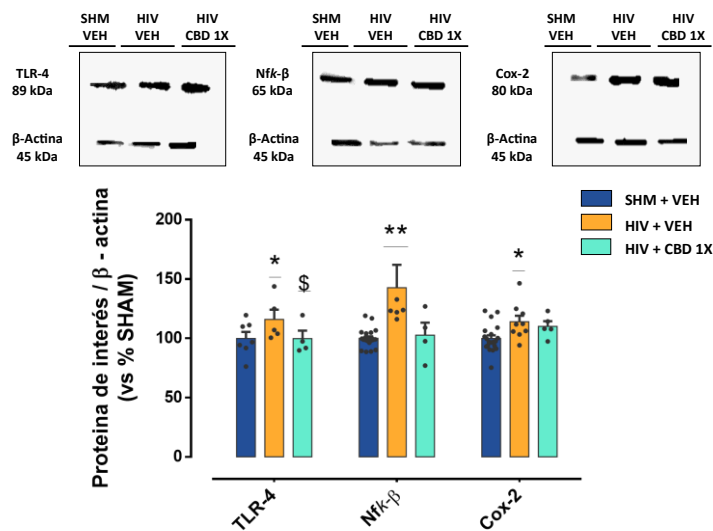
**Figura 58. Efecto del CBD administrado 6 horas después del daño sobre el volumen de lesión.** El tratamiento con CBD a las 6 horas reduce el volumen de daño a corto y largo plazo (A) Porcentaje de lesión a PND 6 (B) Porcentaje de lesión a PND 45. (C) Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD 1X. (D) Porcentaje de lesión a largo plazo respecto corto plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una t-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (§ respecto a los animales HIV + VEH). En la Fig. C, los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. (N=8-12)

Como se indica en la **Fig. 59**, cuando los animales con HIV fueron tratados postlesionalmente con CBD, en la prueba de la **Geotaxia invertida** los resultados fueron similares al grupo control (**Fig. 59 A**); sin embargo, como tampoco hubo diferencias con los animales HIV + VEH, la mejora en esta prueba fue solo parcial. No obstante, en las pruebas del **Grip y Grasp (Fig. 59 B y C)**, los animales tratados con CBD presentaron una puntuación similar a los controles y mayor que el grupo lesionado tratado con vehículo. En este sentido, el tratamiento postlesional en una única dosis evitó parcialmente las secuelas del modelo presentes a medio plazo. Así mismo, a largo plazo a pesar de que el grupo tratado no logró reducir las diferencias observadas respecto de los controles en la prueba del **CRT (Fig. 59 D)**, si se produjo diferencias en el resto de test realizados. En este sentido, los animales tratados presentaban un tiempo en cruzar la **barra** de 1 m inferior que el grupo HIV + VEH, pero también superior al grupo control (**Fig. 59 E**); sin embargo, las diferencias entre el grupo SHAM y el grupo CBD desaparecía cuando se evaluó el porcentaje de caídas en esta misma prueba (**Fig. 59 F**). Asimismo, en la prueba del **NOR**, los animales HIV tratados con CBD presentaron una mayor preferencia por el objeto nuevo que los animales lesionados sin tratar (**Fig. 59 G**). En conjunto, estos datos indican que el tratamiento postlesional con CBD redujo, al menos parcialmente, las secuelas motoras y cognitivas presentes a largo plazo en nuestro modelo.



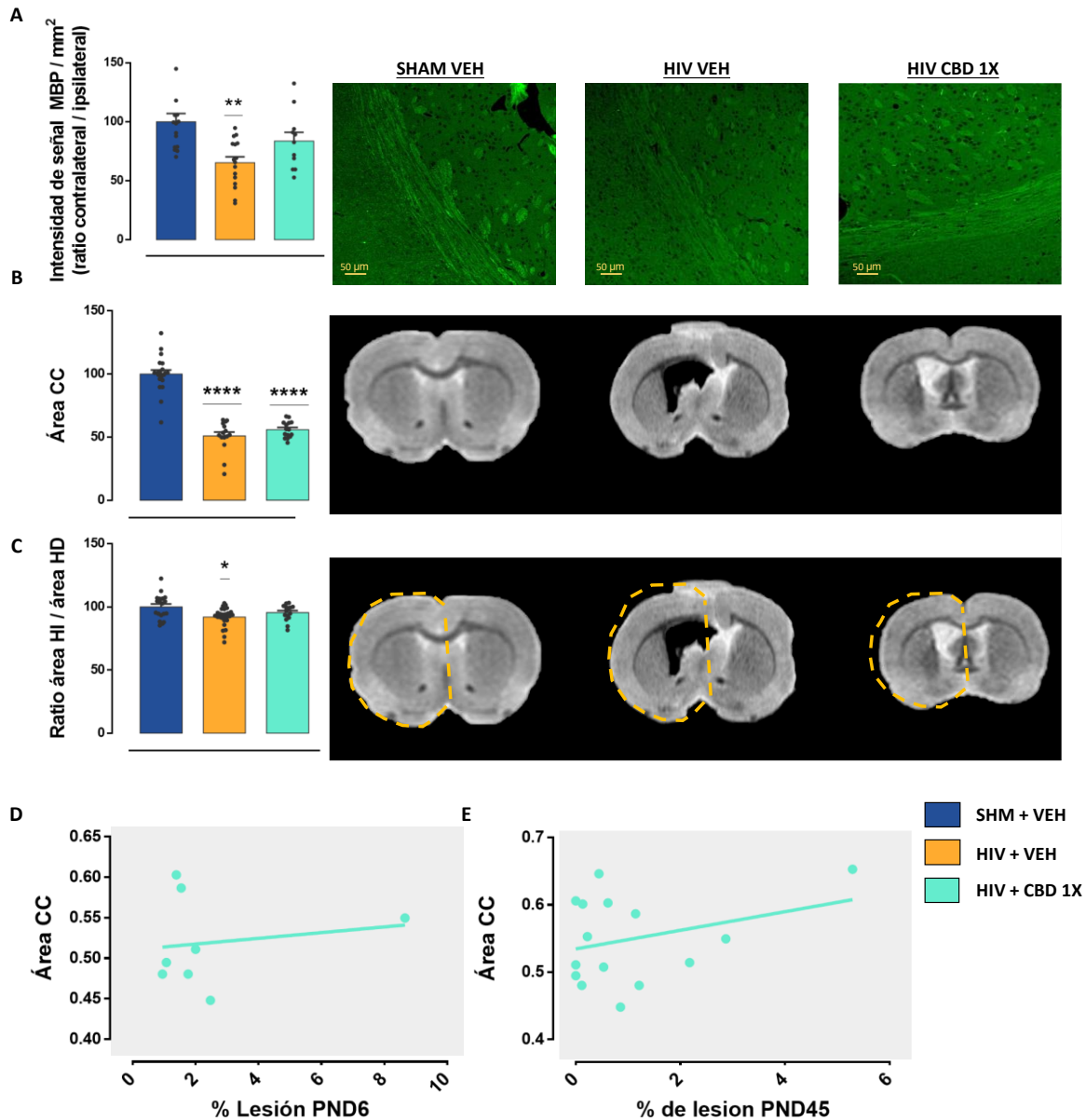
**Figura 59. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).** El tratamiento con CBD a las 6h previene parcialmente el déficit neuroconductual a medio y largo plazo. **(A)** Segundos necesarios para que el animal gire 180° en una plataforma con una pendiente de 45°. **(B)** Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. **(C)** Fuerza ejercida por las patas traseras del animal sobre una superficie plana. Todos los resultados son el tanto por 1 de los controles de la cada una de las camadas. **(D)** Preferencia por la pata ipsilateral. **(E y F)** Tiempo y porcentaje de caídas. Los resultados de la barra es el tanto por 1 respecto al grupo control. **(G)** Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=25)

Dado que parte del efecto terapéutico del CBD sobre el daño cerebral se debe a sus propiedades antiinflamatorias, y en nuestro modelo existe un ambiente inflamatorio exacerbado, decidimos evaluar hasta qué punto el CBD logró reducir este evento fisiopatológico a largo plazo. Al igual que en otros modelos animales de PCI, el tratamiento postlesional con CBD en una única dosis redujo los niveles de expresión del receptor TLR-4, incrementados como consecuencia de la lesión. No obstante, este efecto fue menos potente cuando analizamos los niveles de expresión de Nfk-B y Cox-2, ya que se perdieron las diferencias significativas con los grupos control y HIV+VEH (**Fig. 60**). Estos resultados sugieren que los efectos protectores del CBD en nuestro modelo animal se debieron, al menos parcialmente, a su efecto antiinflamatorio.



**Figura 60. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.** El CBD administrado a las 6h previene parcialmente la inflamación. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=5-12)

Aunque anteriormente relacionamos los déficits neuroconductuales con el daño en la SB a largo plazo, en contra de lo esperado, el tratamiento con CBD no consiguió evitar el descenso de la inmunorreactividad de MBP en el CC tras la HIV (**Fig. 61 A**), ni la pérdida de área de esta estructura (**Fig. 61 B**), ya que no hubo diferencias con el grupo HIV + VEH pero sí con los animales controles. En el caso de la pérdida de volumen del HI, el CBD solamente consiguió reducirla parcialmente (**Fig. 61 C**). Curiosamente, los estudios correlacionales demostraron que la afectación del CC era independiente del volumen de lesión (**Fig. 61 D y E**), resaltando la relevancia de otros elementos más allá que el volumen de sangrado.



**Figura 61. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento de CBD a las 6h.** El tratamiento con CBD a las 6h no previene el daño en la SB a largo plazo. **(A)** Ratio de los niveles de intensidad de señal MBP en lado ipsilateral vs contralateral del CC. Escala: 50µm. **(B)** Área del CC. **(C)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. **(D)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 6. **(E)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 45. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson (N=8).

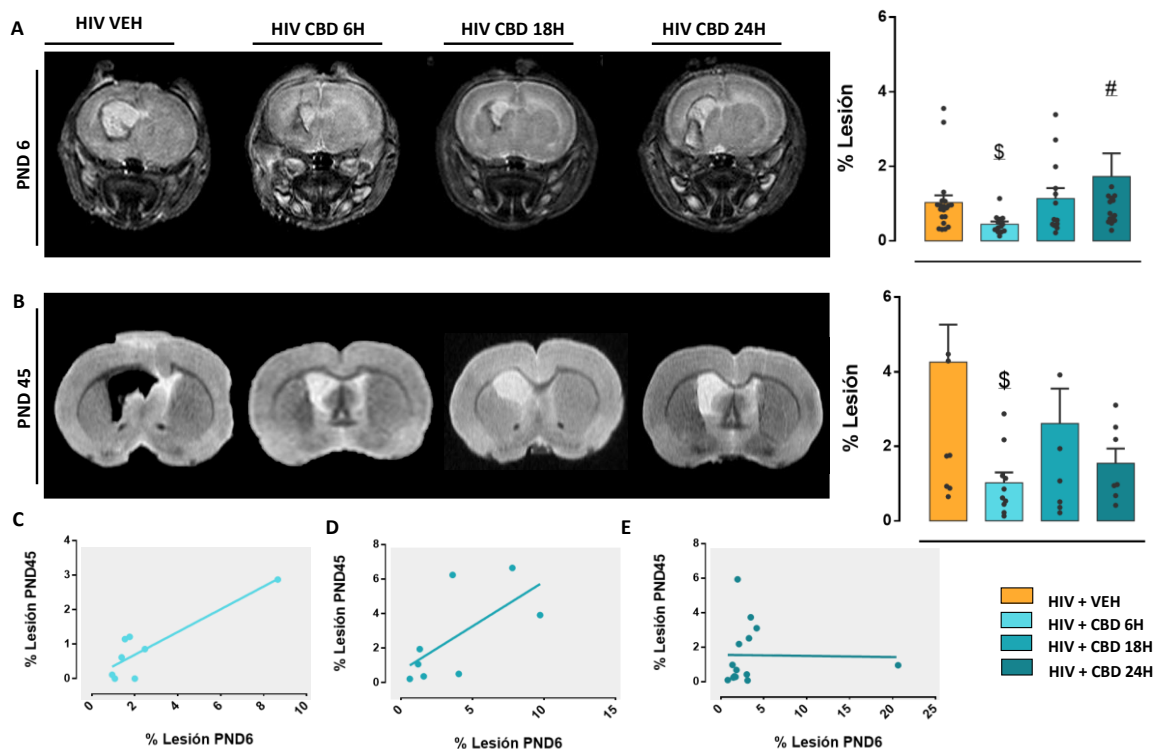
En definitiva, a pesar de que el CBD administrado 6 h después de la HIV fue capaz de evitar parcialmente el déficit conductual y la neuroinflamación, no ejerció ningún efecto sobre el daño

de la SB evaluada a largo plazo. Por ello, fue necesario evaluar cuando es necesario iniciar el tratamiento para aumentar su potencial terapéutico.

#### Ventana terapéutica del CBD

La PCOH es una enfermedad cuya incidencia es mayor en países subdesarrollados, en los que el diagnóstico e inicio del tratamiento pueden llegar a ser en algunos casos demasiado tarde. Por otro lado, el CBD es un fármaco que ha conseguido obtener efectos neuroprotectores 18 h después del daño<sup>229</sup>. En este sentido, se comparó el efecto del CBD administrado a las 18, 24 y 48 h con el grupo que inició su tratamiento 6 h después, con el objetivo de identificar el momento óptimo en el que se debería tratar a los individuos o su ventana terapéutica.

Para ello, primero se evaluó el efecto del CBD administrado en diferentes puntos temporales sobre el volumen de daño a corto y largo plazo. Cabe destacar que como consecuencia de la ausencia de efecto en esta y en el resto de las pruebas, los datos del grupo CBD que inició su tratamiento a las 48 h no se incluyeron. En cuanto al resto de grupos, observamos cómo el grupo tratado a las 6 h fue el único capaz de reducir el volumen de HIV respecto al grupo tratado con VEH tanto a corto y largo plazo (**Fig. 62 A y B**). Sin embargo, independientemente del momento en el que se iniciara el tratamiento, el CBD fue capaz de evitar el mantenimiento del daño a lo largo del tiempo (**Fig. 62 C-E**).

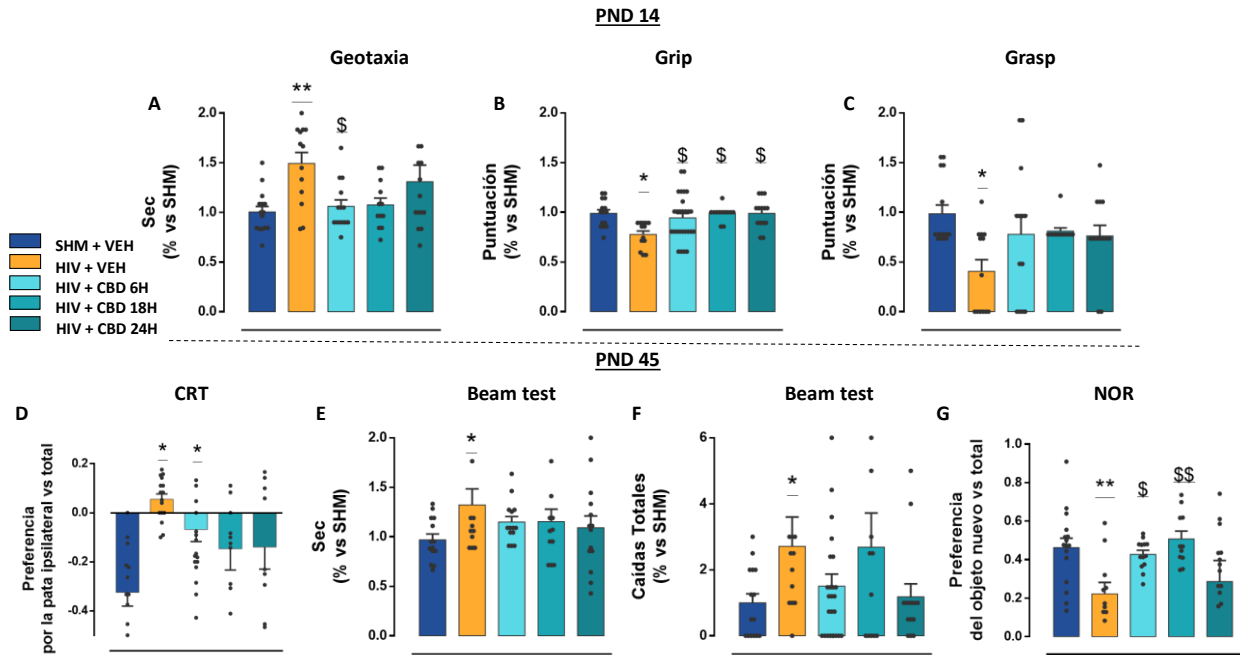


**Figura 62. Efecto del CBD administrado a las 6, 18 y 24 horas después del daño sobre la lesión.** El tratamiento con CBD a las 6 horas fue la única dosis capaz de reducir el volumen de daño tanto a corto como a largo plazo **(A)** Porcentaje de lesión a PND 6. **(B)** Porcentaje de lesión a PND 45. **(C)** Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD 6h. **(D)** Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD 18h. **(E)** Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD 24h. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$  (\$) respecto a los animales HIV + VEH; # respecto a los animales HIV + CBD 6h). En la **Fig. C-E**, los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. (N=8-12)

En los estudios neuroconductuales observamos cómo en el test de la **Geotaxia Invertida**, solo el grupo que recibió la administración de CBD a las 6 horas presentó un tiempo de rotación menor que el grupo lesionado sin tratamiento (**Fig. 63 A**). Por otro lado, en la prueba de **Grip** se observó como el tratamiento con este fitocannabinoide, independientemente del momento de administración, condujo a una puntuación igual a la de los controles y superior que el grupo HIV + VEH (**Fig. 63 B**). Por el contrario, estos mismos grupos solo lograron evitar parcialmente la alteración motora en la prueba del **Grasp**, ya que no mostraron diferencias con ninguno de los grupos tratados con VEH (**Fig. 63 C**).

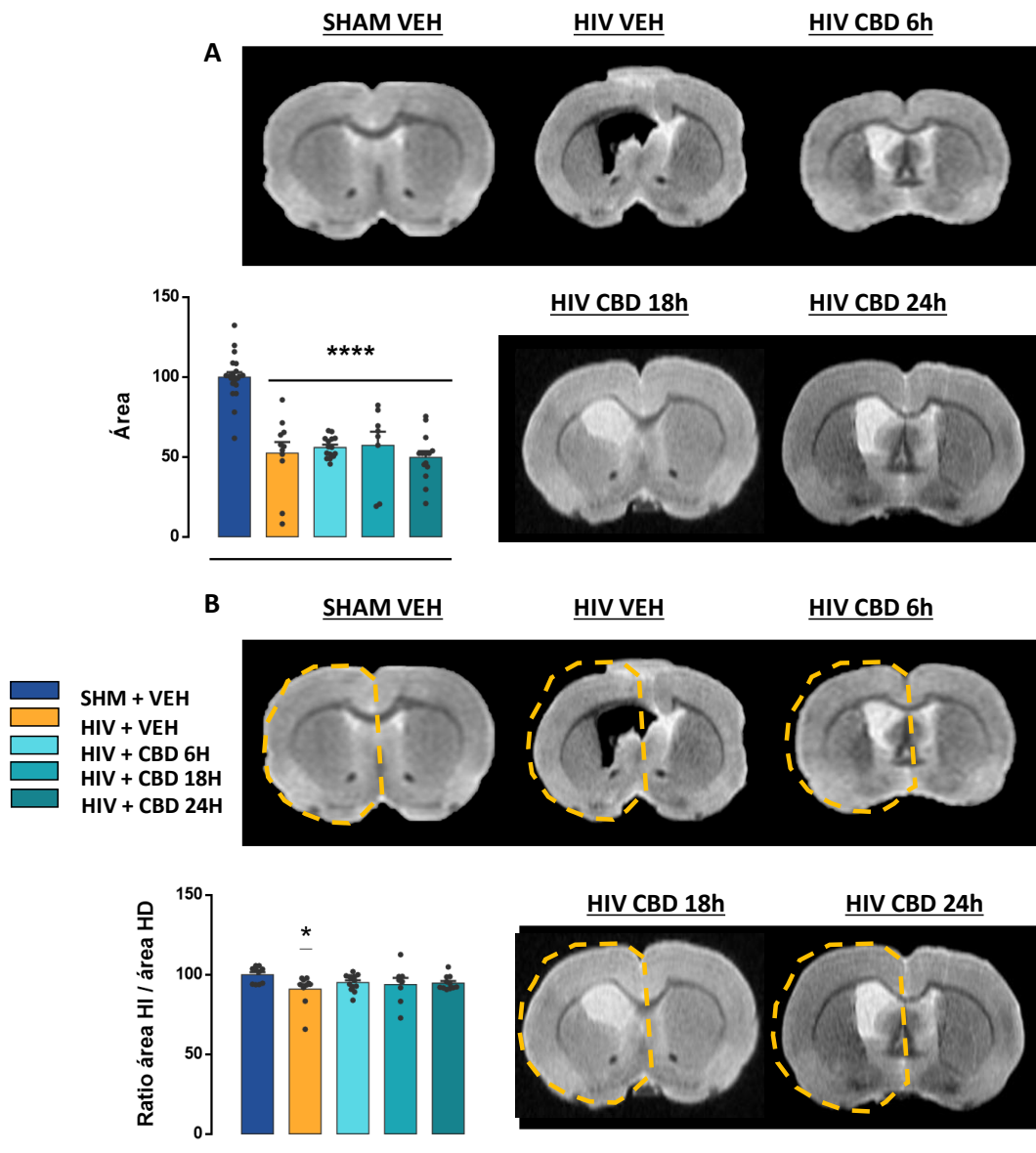
De manera adicional, a largo plazo, en la prueba del **CRT**, solo los animales tratados a las 6 h presentaban una mayor tasa de contactos realizados con la pata contralateral en comparación con el grupo VEH, mientras que el resto de los grupos tratados no presentaron diferencias entre ellos ni con los animales tratados con VEH (**Fig. 63 D**). Asimismo, todos los grupos con

tratamiento mejoraron parcialmente la puntuación obtenida en la prueba de **BW** tanto en la latencia como en el porcentaje de caídas (**Fig. 63 E y F**). Finalmente, en la prueba del **NOR** los grupos tratados a las 6 y 18 h presentaron una preferencia por el objeto nuevo similar a los controles y mayor que el grupo HIV sin tratar, mientras que en el grupo restante la mejora fue solamente parcial (**Fig. 63 G**).



**Figura 63. Puntuación de las pruebas neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).** El CBD independientemente de su momento de administración ejerce una mejora parcial a nivel neuroconductual. **(A)** Segundos necesarios para que el animal gire 180° en una plataforma con una pendiente de 45°. **(B)** Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. **(C)** Fuerza ejercida por las patas traseras del animal sobre una superficie plana. Todos los resultados son el tanto por 1 de los controles de la cada una de las camadas. **(D)** Preferencia por la pata ipsilateral. **(E y F)** Tiempo y porcentaje de caídas. Los resultados de la barra es el tanto por 1 respecto al grupo control. **(G)** Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=10-15)

Finalmente, se evaluó si esta mejora funcional era consecuencia de un efecto neuroprotector sobre el daño de la SB. Ninguno de los tratamientos evitó la pérdida de área del CC, ya que todos los grupos HIV mostraron diferencias con el grupo SHAM (**Fig. 64 A**). Por otro lado, a pesar de que en todos los grupos tratados desaparecían las diferencias con los controles en la pérdida de área del hemisferio ipsilateral (HI), no alcanzaron diferencias con el grupo lesionado tratado con vehículo (**Fig. 64 B**). En este sentido, en contra de los resultados obtenidos en el volumen de daño y en la funcionalidad neurocognitiva donde había una mejora parcial, el CBD, independientemente del momento en el que se administra, no evita el daño en la SB.

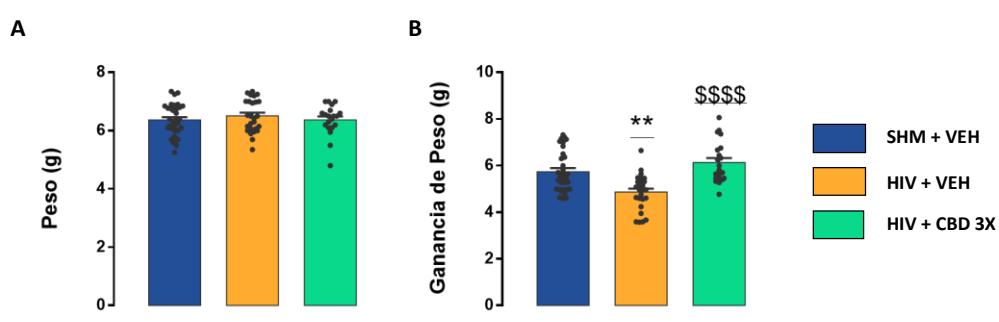


**Figura 64. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento con CBD.** El tratamiento con CBD no previene el daño en la SB a largo plazo. **(A)** Área del CC. **(B)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH) (N=10-15)

En conclusión, aunque el tratamiento con CBD a las 6 h después del daño ejerce un efecto neuroprotector más potente que en el resto de los tratamientos, su eficacia puede ser significativa hasta 24 h después. Asimismo, se ha observado que en nuestro modelo animal la administración de CBD a las 6 h es el punto óptimo en el que iniciar el tratamiento. No obstante, dado que se ha demostrado que el daño se mantiene a lo largo del tiempo, una única dosis de CBD parece ser insuficiente. Por ello, el siguiente objetivo que propusimos fue evaluar si la administración múltiple de CBD a las 6, 24 y 48 h mejoraba los resultados vistos previamente.

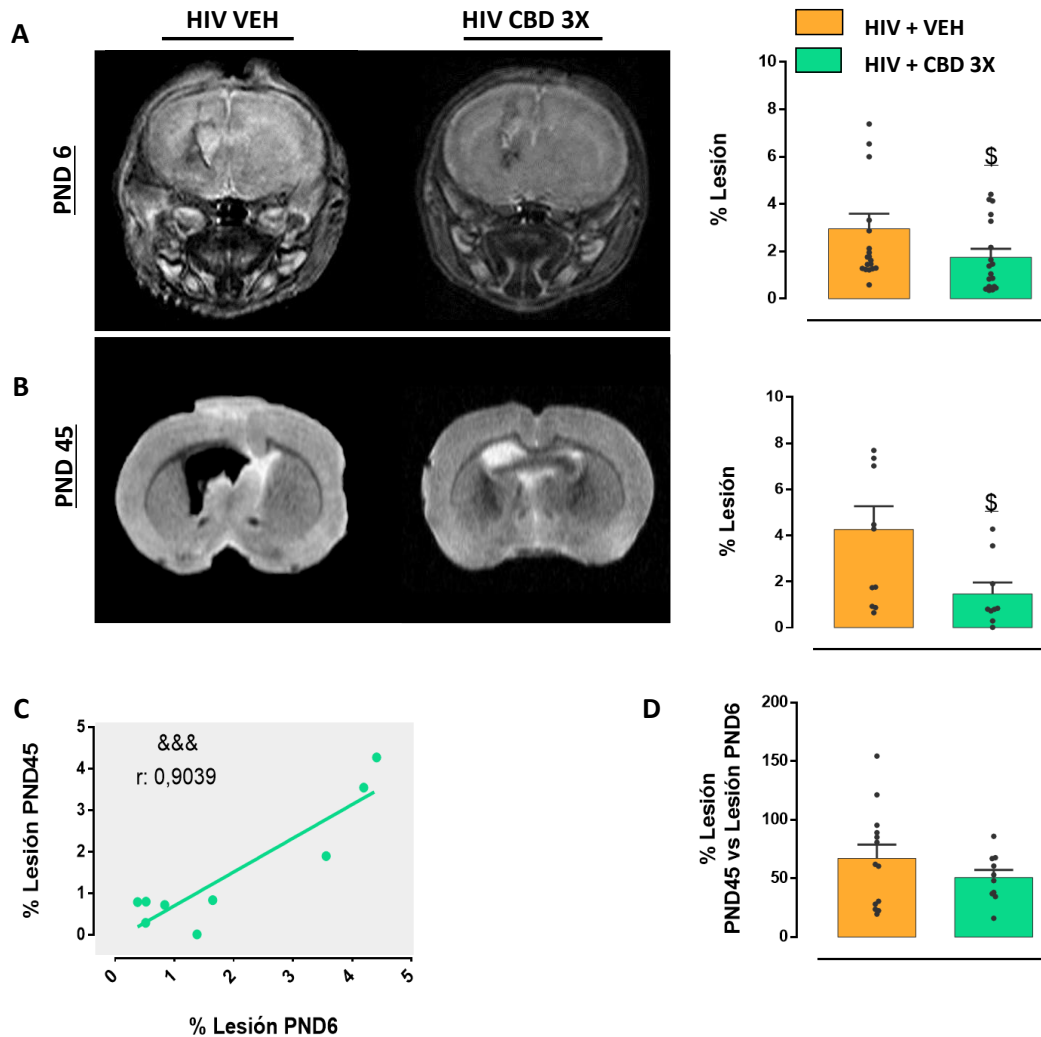
### Efecto neuroprotector del CBD administrados en múltiples dosis

Al igual que en los puntos anteriores, realizamos una comparación del peso inicial así como la ganancia de este entre los diferentes grupos experimentales. A pesar de no encontrarse diferencias en el peso inicial (**Fig. 65 A**), la diferencia en la ganancia de peso entre el grupo SHAM y HIV + VEH desaparecía por completo cuando recibían el tratamiento múltiple con CBD (**Fig. 65 B**). Esto sugiere nuevamente que el tratamiento con CBD podría estar produciendo una mejora en el bienestar del animal.



**Figura 65. Efecto del CBD sobre el peso.** El tratamiento con CBD en múltiples dosis después del daño previene de forma total la pérdida de peso presente en el modelo **(A)** Peso (g). **(B)** Ganancia de peso (g). Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=30)

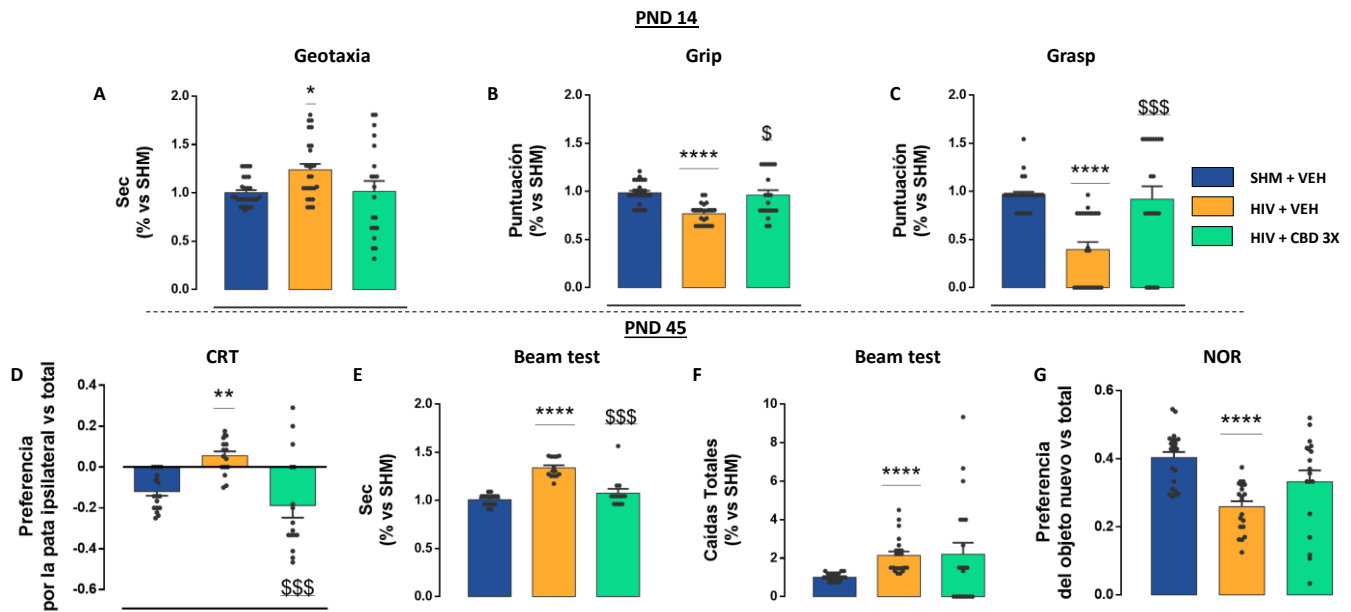
En cuanto al efecto del CBD sobre la hemorragia *per se*, la administración múltiple de este fármaco redujo el porcentaje de la lesión tanto a corto (**Fig. 66 A**) como a largo plazo (**Fig. 66 B**). No obstante, los estudios correlacionales indicaron que la administración de CBD en múltiples dosis no fue capaz de evitar que la lesión se mantuviese a lo largo del tiempo (**Fig. 66 C**); este dato se confirma nuevamente en la siguiente gráfica, donde no se aprecian diferencias significativas entre el HIV + VEH y CBD3X (**Fig. 66 D**). Por lo tanto, aunque el tratamiento con CBD en múltiples dosis redujo el volumen de lesión a corto y largo plazo, fue incapaz de evitar la progresión de esta durante la vida del individuo.



**Figura 66. Efecto del CBD administrado en múltiples dosis sobre la lesión.** El tratamiento con CBD en múltiples dosis reduce el volumen de lesión tanto a corto como a largo plazo (**A**) Porcentaje de lesión a PND 6 (**B**) Porcentaje de lesión a PND 45. (**C**) Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD 3X. (**D**) Porcentaje de lesión a largo plazo respecto corto plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una t-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\$) respecto a los animales HIV + VEH). En la Fig. C, los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. (N=8-12).

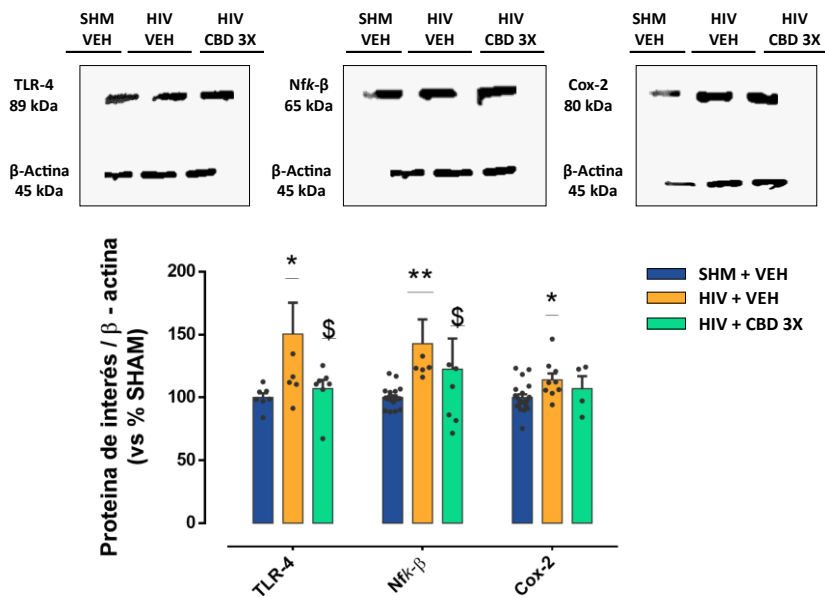
En cuanto a los estudios neuroconductuales realizados a medio plazo, al igual que anteriormente, los animales tratados presentaron una reducción parcial en el tiempo de la prueba de la **Geotaxia inversa** en comparación con el grupo lesionado tratado con VEH (**Fig. 67 A**). En cuanto a las pruebas de **Grasp y de Grip**, en ambos tests los animales tratados presentaron una puntuación mayor que el grupo HIV + VEH y similar a la de los controles (**Fig. 67 B y C**). Por lo tanto, al igual que en el grupo tratado a las 6 h, la administración de CBD durante 3 días consecutivos fue capaz de evitar la alteración de los reflejos estudiados a PND 14. En cuanto a las pruebas realizadas a PND 45, los animales que recibieron CBD de forma múltiple presentaron en la prueba del **CRT** una preferencia por la pata contralateral mayor que los animales lesionados

sin tratar (**Fig. 67 D**). Un resultado similar se observó al evaluar el tiempo en cruzar la **Barra** (**Fig. 67 E**); no obstante, el tratamiento solo fue capaz de reducir parcialmente el porcentaje de caídas, ya que este grupo no presentó diferencias con ninguno de los grupos restantes (**Fig. 67 F**). Igualmente, en la prueba del **NOR**, los animales tratados no presentaron diferencias con el resto de los grupos (**Fig. 67 G**). En conjunto, el tratamiento con CBD, esta vez en múltiples dosis, fue capaz de reducir las secuelas producidas por la HIV en nuestro modelo animal.



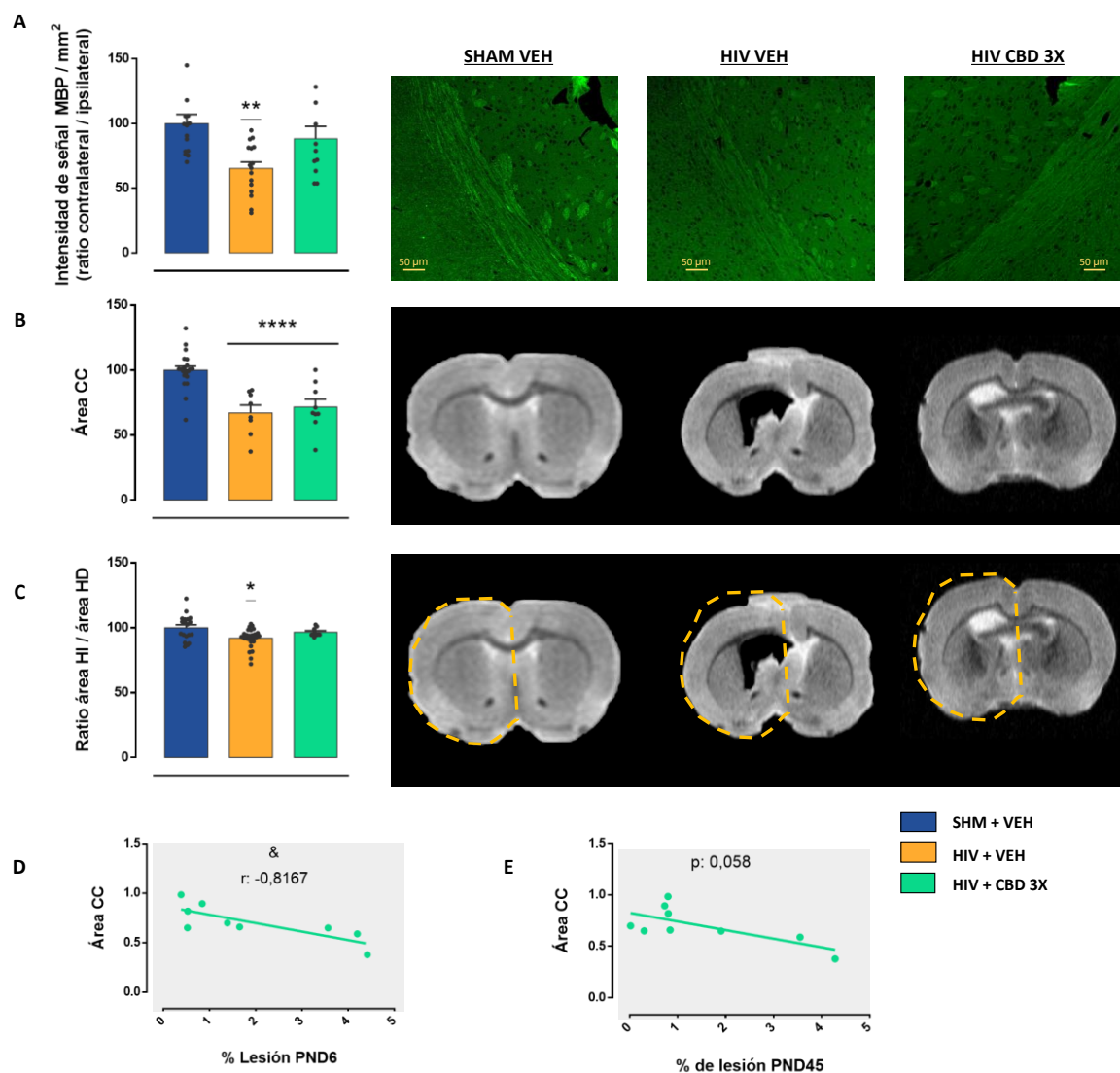
**Figura 67. Resultados de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).** El tratamiento con CBD previene el déficit motor a medio y largo plazo. **(A)** Tiempo (s) necesario para que el animal gire 180° en una pendiente inclinada de 45°. **(B)** Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. **(C)** Fuerza ejercida por las patas traseras del animal sobre una superficie plana. Los resultados son el tanto por 1 de los controles de la cada una de las camadas. **(D)** Preferencia por la pata ipsilateral. **(E y F)** Tiempo y porcentaje de caídas. Los resultados de la barra es el tanto por 1 respecto al grupo control. **(G)** Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; (§ respecto a los animales HIV + VEH) (N=25)

En cuanto a su posible potencial antiinflamatorio, se comprobó que el tratamiento de CBD en múltiples dosis redujo los niveles de expresión del receptor TLR-4, y del factor NfK-B, ambos marcadores clásicos de neuroinflamación. Sin embargo, la mejora sobre los niveles de la enzima Cox-2 fue solo parcial, ya que los animales tratados no mostraron diferencias con los grupos restantes (**Fig. 68**). Así, la administración de CBD durante 3 días consecutivos consiguió un mayor potencial antiinflamatorio en comparación con los animales tratados en una única dosis.



**Figura 68. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.** El CBD administrado en múltiples dosis reduce los niveles de marcadores inflamatorios. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=8)

En cuanto al daño en la SB, en los análisis inmunohistoquímicos los animales con tratamiento múltiple presentaban una intensidad de señal de la proteína MBP similar a los controles, pero sin alcanzar diferencias con los animales tratados con VEH (**Fig. 69 A**). En cuanto a los estudios macroscópicos, observamos como los animales con tratamiento múltiple presentaban un grosor del CC menor que los controles (e igual al de los animales lesionados sin tratar) (**Fig. 69 B**), indicando de nuevo que el tratamiento postlesional de CBD no evitó la hipomielinización a largo plazo en el CC. Por último, el CBD administrado en múltiples dosis tampoco evitó completamente la pérdida de área del HI, ya que, no presenta diferencias ni con los controles ni con los animales lesionados tratados con vehículo (**Fig. 69 C**). Sin embargo, de manera contraria a lo observado en el grupo tratado a las 6 h con una sola dosis, los estudios correlacionales mostraron una relación entre el volumen de la hemorragia tanto a corto (**Fig. 69 D**) como a largo plazo (**Fig. 69 E**) y el grosor del CC evaluado a nivel macroscópico. En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento postlesional con CBD es incapaz de evitar de manera total la alteración de la SB a largo plazo.



**Figura 69. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento con CBD en múltiples dosis.** El tratamiento con CBD de forma múltiple no previene el daño en la SB a largo plazo. **(A)** Ratio de los niveles de intensidad de señal MBP en lado ipsilateral vs contralateral del CC. Escala: 50μm. **(B)** Área del CC. **(C)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. **(D)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 6. **(E)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 45. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson (& respecto al grupo HIV+CBD 3X) (N=10-15).

En conclusión, aunque la administración de CBD en múltiples dosis fue capaz de ejercer un efecto neuroprotector más potente que cuando se administró de manera única, ciertos parámetros como la prueba del NOR o el daño en la SB no se normalizaron completamente.

### Tratamiento prenatal con CBD

Debido a que no se encontró un efecto terapéutico totalmente eficaz por parte del CBD cuando es administrado postlesionalmente, se planteó la posibilidad de aplicarlo antes del daño, es decir, prenatalmente. Debido a la ausencia de estudios previos, en este apartado se evaluó la dosis mínima necesaria con la que el CBD atraviesa la barrera placentaria y alcanza el SNC de las crías, así como su potencial terapéutico sobre la HIV.

#### El CBD administrado prenatalmente es capaz de atravesar la barrera placentaria

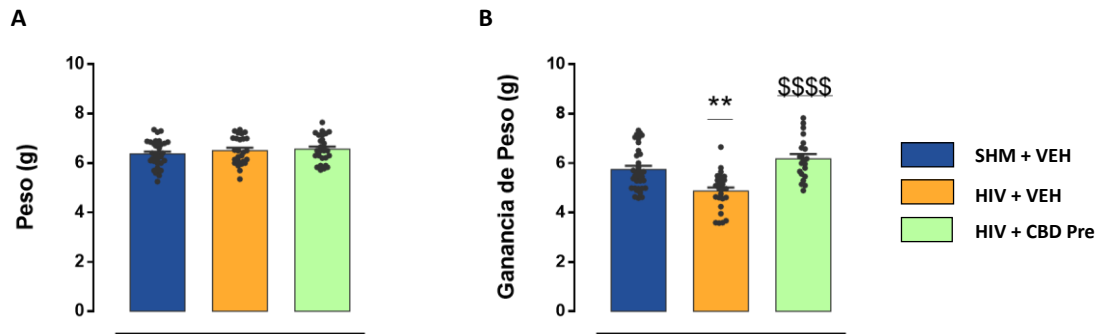
Como se indica en la **Tabla 8**, en todas las dosis administradas en E21 se encontraron diferentes cantidades de CBD tanto en cerebro como en el plasma de los recién nacidos, confirmando así la capacidad de este fitocannabinoide para atravesar la barrera placentaria. Además, la concentración cerebral de este cannabinoide fue dosis-dependiente. Sin embargo, dado que en estudios previos se estableció la concentración comprendida entre 0,03-0,06 ng / kg como neuroprotectora <sup>239</sup>, escogimos la dosis prenatal de 10 mg / kg como válida para llevar a cabo los estudios de neuroprotección del CBD en la HIV.

Dosis madre	Cantidad CBD de tejido (pmol/mg)	Cantidad CBD de sangre (pmol/mg)
10 mg /kg	0.04 (0.007)	1.55 (0.25)
50 mg /kg	0.29 (0.04)	9.75 (1.48)
100 mg /kg	0.85 (0.20)	27.29 (7.16)
200 mg /kg	11.07 (6.32)	300.52 (175.30)

**Tabla 8. Niveles de CBD (pmol/mg) en tejido cerebral y en sangre de las crías en cada una de las dosis administradas prenatalmente.**

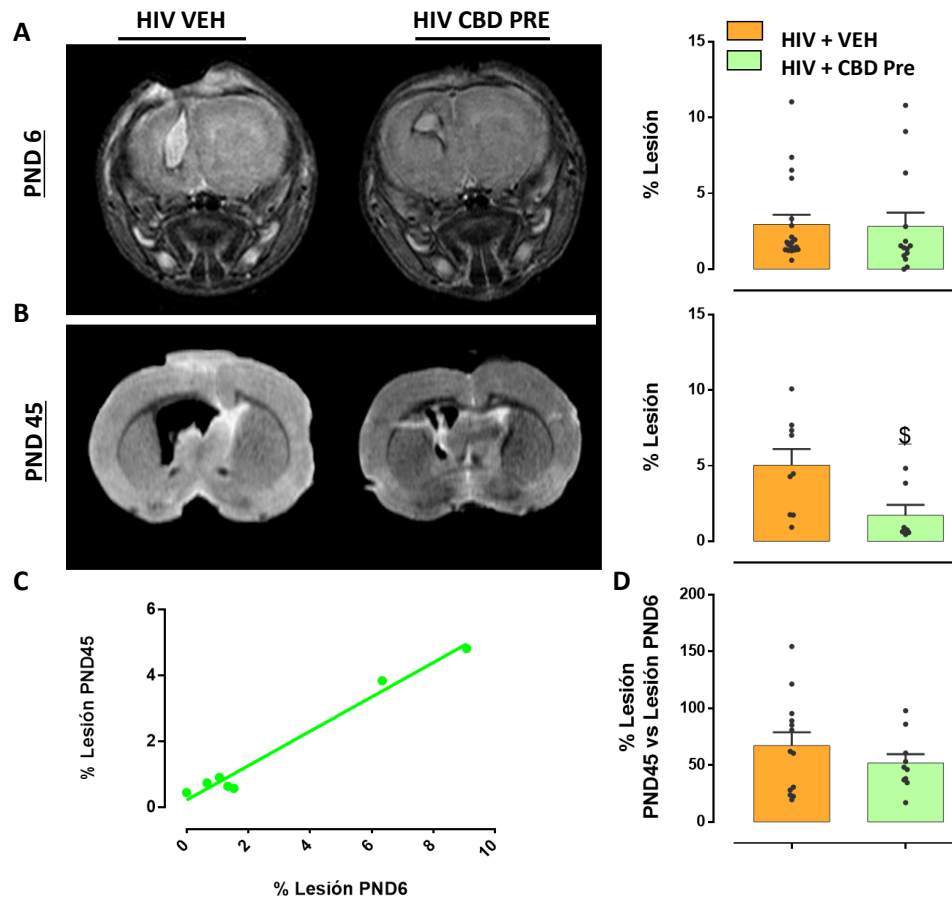
#### La administración prenatal de CBD ejerce un efecto neuroprotector en la PCOH

Al igual que en puntos anteriores, se evaluó inicialmente si los animales presentaban un peso inicial similar a la del resto de grupos. Como se muestra en la **Fig. 70 A**, la ausencia de diferencias en la media de peso inicial de los diferentes animales sugiere que el tratamiento prenatal con CBD no produjo ningún efecto sobre el tamaño o desarrollo de las crías al nacer. En cuanto a la ganancia de peso, requisito que usamos para valorar la mejora del bienestar animal, observamos como el tratamiento prenatal evitó la pérdida de peso observada en el grupo HIV + VEH (**Fig. 70 B**).



**Figura 70. Efecto del CBD administrado prenatalmente sobre el peso.** El tratamiento prenatal con CBD previene de forma total la pérdida de peso presente en el modelo **(A)** Peso (g). **(B)** Ganancia de peso (g). Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=20)

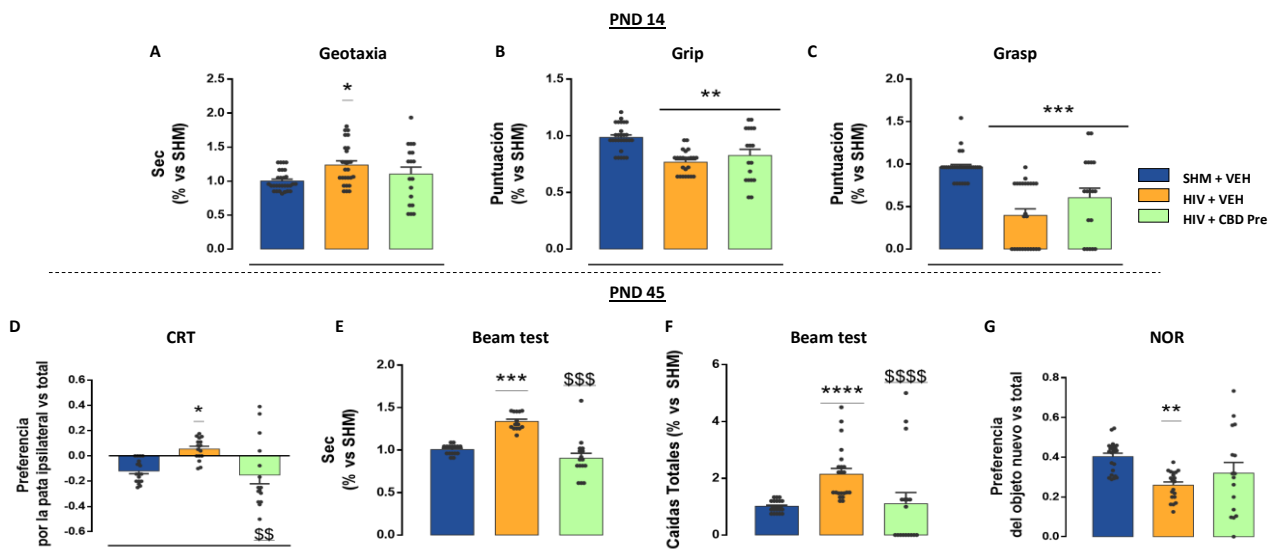
A diferencia de los resultados mostrados en apartados anteriores, esta vez el tratamiento prenatal con CBD no redujo el volumen de hemorragia a corto plazo (**Fig. 71 A**), aunque sí tuvo un resultado positivo cuando se analizó a largo plazo (**Fig. 71 B**). Adicionalmente, observamos como estos mismos animales no presentaron ningún tipo de correlación entre los volúmenes de lesión a corto y largo plazo (**Fig. 71 C**); aunque no se apreciaron diferencias respecto al grupo vehículo (**Fig. 71 D**).



**Figura 71. Efecto del CBD administrado prenatalmente sobre el porcentaje de lesión.** El tratamiento con CBD administrado prenatalmente reduce el porcentaje de lesión tanto a corto como a largo plazo **(A)** Porcentaje de lesión a PND 6 **(B)** Porcentaje de lesión a PND 45. **(C)** Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD PRE. **(D)** Porcentaje de lesión a largo plazo respecto corto plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una t-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (§ respecto a los animales HIV + VEH). En la **Fig. C**, los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. (N=8-12).

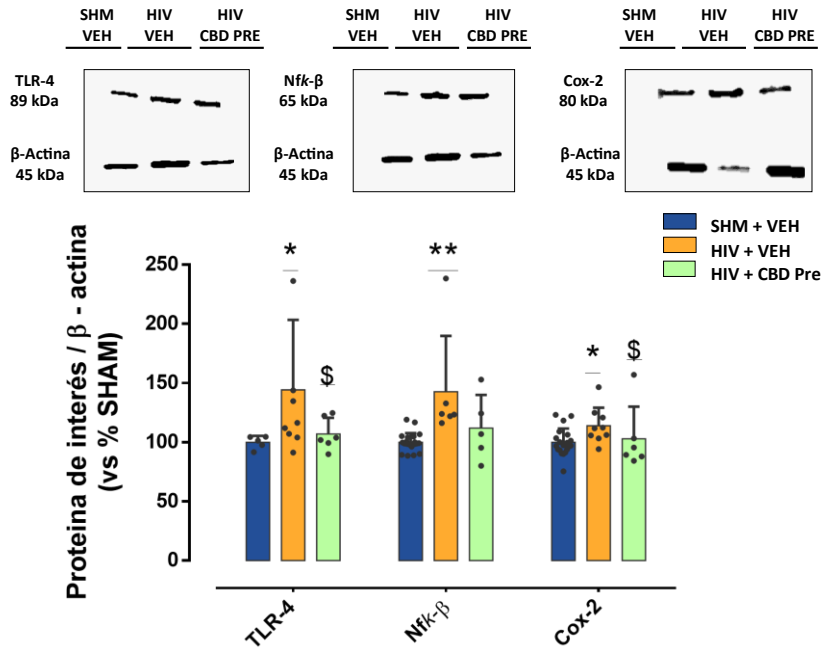
En cuanto a las pruebas neuroconductuales, observamos como los animales tratados con CBD prenatalmente presentaron un menor tiempo en la prueba de la **Geotaxia invertida (Fig. 72 A)**, sin embargo, estas diferencias solo fueron parciales. Asimismo, en las pruebas de **Grip y Grasp**, el grupo tratado con CBD presentó resultados similares a los HIV + VEH y menores que los controles **(Fig. 72 B y C)**. Por lo tanto, en conjunto, estos datos indican que el CBD administrado prenatalmente apenas tiene un efecto sobre la afectación motora a corto plazo. En cuanto a las pruebas realizadas a largo plazo, el grupo tratado prenatalmente presentó una mayor preferencia por la pata contralateral en la prueba del **CRT (Fig. 72 D)**, y un menor tiempo y porcentaje de caídas en la prueba de la **Barra (Fig. 72 E y F)** en comparación con el grupo HIV + VEH. Sin embargo, en la prueba del **NOR**, el grupo que recibió tratamiento prenatal solo mejoró parcialmente la puntuación obtenida por el grupo HIV tratado con vehículo **(Fig. 72 G)**. Por lo

tanto, a pesar de que a largo plazo el tratamiento prenatal evitó el déficit motor, la mejora sobre la funcionalidad cognitiva fue parcial.



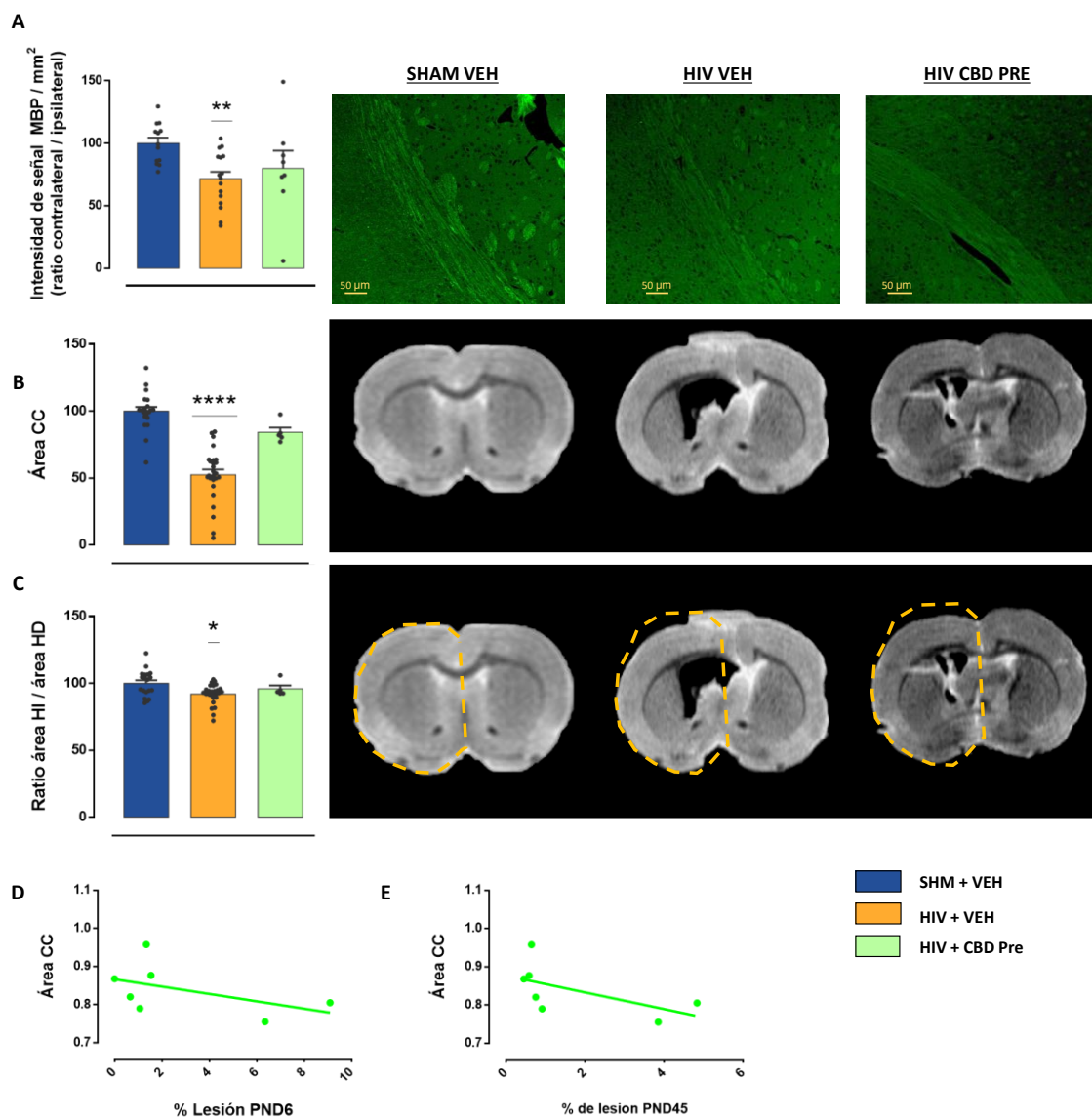
**Figura 72. Resultado de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).** El pretratamiento con CBD previene parcialmente el déficit motor a medio y largo plazo. (A) Segundos necesarios para que el animal gire 180° en una plataforma con una pendiente inclinada de 45° (B) Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. (C) Fuerza ejercida por las patas traseras del animal sobre una superficie plana. Todos los resultados son el tanto por 1 de los controles de la cada una de las camadas. (D) Preferencia por la pata ipsilateral. (E y F) Tiempo y porcentaje de caídas. Los resultados de la barra es el tanto por 1 respecto al grupo control. (G) Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH; (\$) respecto a los animales HIV + VEH) (N=25)

De nuevo, para evaluar el potencial antiinflamatorio del CBD, esta vez administrado prenatalmente, se analizó por WB los niveles de expresión de varios integrantes de la vía de activación de TLR-4. Los animales tratados prenatalmente presentaron unos niveles de expresión del receptor **TLR-4** y de **Cox-2** similares a los controles e inferiores que los animales HIV + VEH; sin embargo, aunque los niveles de expresión del factor **Nfk-B** fueron similares a los del control, no se observaron diferencias respecto al grupo lesionado sin tratar (**Fig. 73**). Por lo tanto, el pretratamiento con CBD promovió un ambiente antiinflamatorio que se mantuvo a lo largo del tiempo.



**Figura 73. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.** El pretratamiento con CBD reduce los niveles inflamatorios. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=8)

En cuanto al efecto del CBD prenatal sobre el daño en la SB, observamos como los animales tratados presentaron una mayor inmunorreactividad de MBP (**Fig. 74 A**), y una menor pérdida del área del CC y del HI (**Fig. 74 B y C**). Sin embargo, esta prevención fue solamente parcial, ya que aunque no se observaron diferencias con los controles, tampoco existían con los HIV + VEH. A su vez, no hubo ningún tipo de relación entre el porcentaje de lesión a corto (**Fig. 74 D**) ni a largo (**Fig. 74 E**) plazo con el área del CC. Por tanto, el tratamiento prenatal con CBD impidió de una manera más eficaz que en el tratamiento postlesional, la pérdida de volumen de SB así, como la mielinización de diferentes estructuras encargadas de la funcionalidad motora.



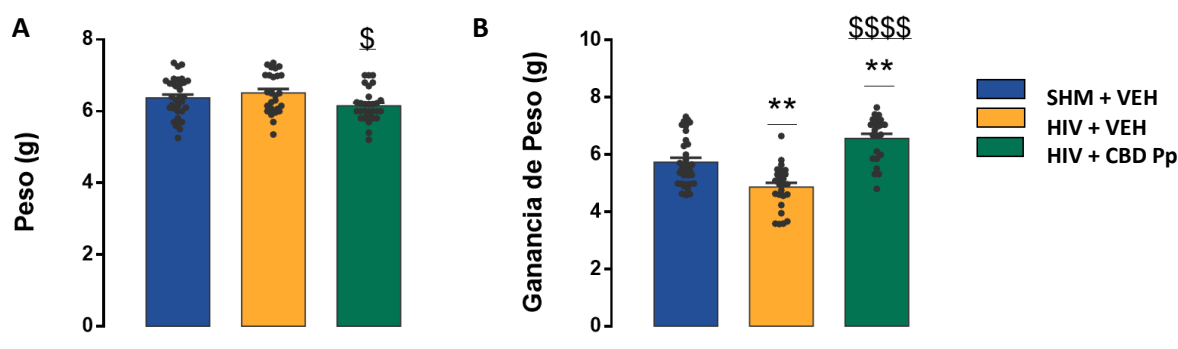
**Figura 74. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el pretratamiento con CBD.** El tratamiento prenatal con CBD previene parcialmente el daño en la SB a largo plazo. **(A)** Ratio de los niveles de intensidad de señal MBP en lado ipsilateral vs contralateral del CC. Escala: 50μm. **(B)** Área del CC. **(C)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. **(D)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 6. **(E)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 45. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson (N=8).

En conclusión, la administración de CBD prenatal a 10 mg/kg fue capaz de atravesar la barrera placentaria y alcanzar en el cerebro de las crías concentraciones que, al menos parcialmente, pueden ser consideradas como neuroprotectoras. A su vez, se demostró que a pesar de no reducir el volumen de lesión, la actuación sobre los eventos fisiopatológicos pueden reducir las consecuencias de la PCOH, algo que se ha demostrado también cuando los animales fueron tratados postnatalmente con el derivado terpenoide VCE-005.1 (**Fig. S1-3**).

### Administración combinada de CBD pre y postnatalmente

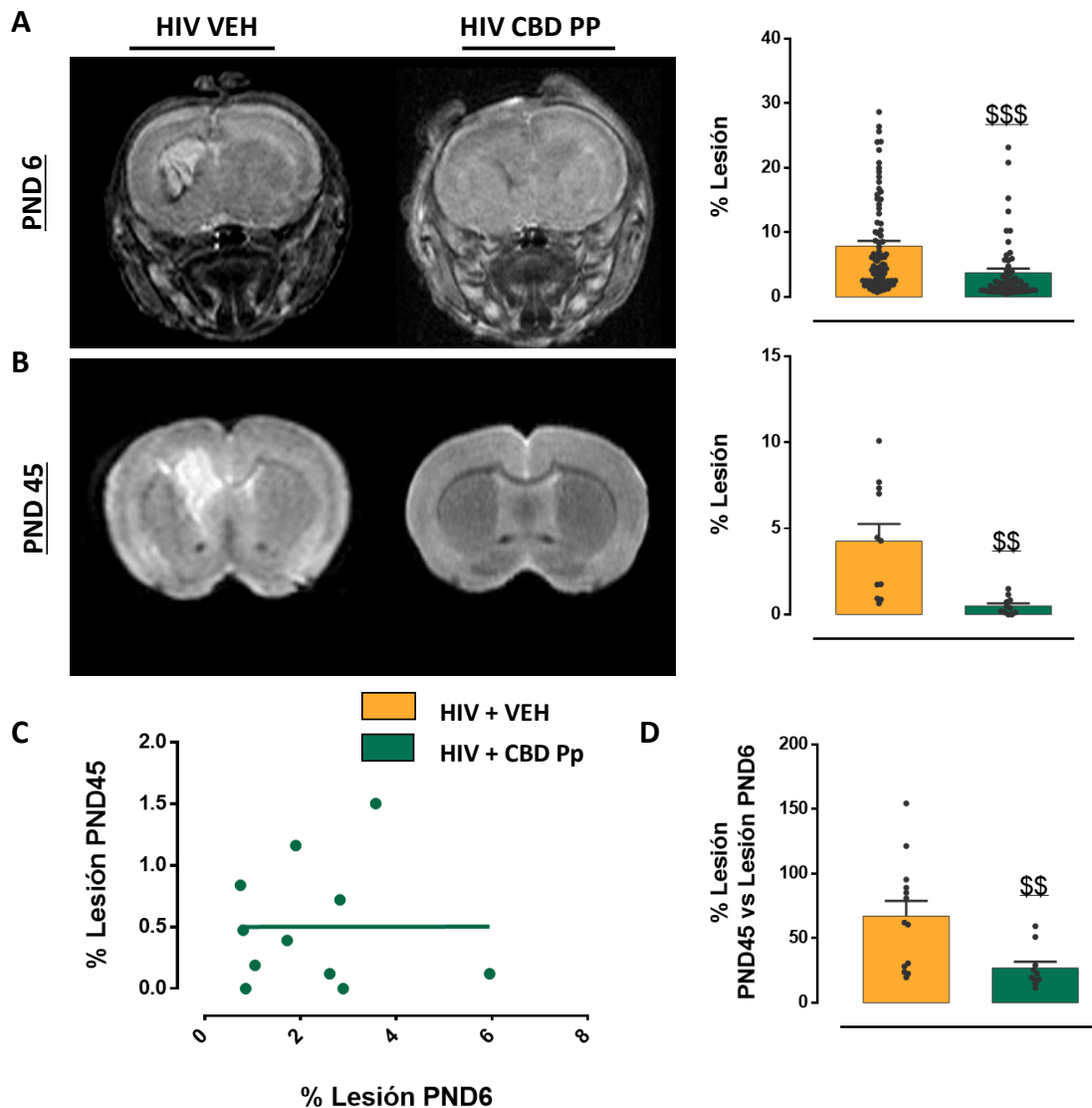
Tomados en conjunto los resultados obtenidos en el tratamiento de CBD antes y después del daño, se decidió combinar ambas formas de tratamiento con el objetivo de actuar lo antes posible, y de mantener el efecto protector del CBD durante el mayor tiempo posible. En este sentido, se evaluó el efecto del CBD administrado a una madre en periodo gestacional E21, y posteriormente tratando a las crías 6, 24 y 48 h después del daño.

Si nos fijamos en el peso inicial de los animales y la ganancia de este a lo largo del tiempo, inicialmente observamos como el grupo tratado presentaba un menor peso que el resto de los grupos (**Fig. 75 A**). No obstante, observamos que al tratar de forma combinada a los animales HIV la pérdida de peso se reducía en relación con los animales tratados con VEH (**Fig. 75 B**).



**Figura 75. Efecto del CBD administrado antes y después del daño sobre el peso.** El tratamiento pre y postnatal con CBD previene de forma total la pérdida de peso presente en el modelo **(A)** Peso (g). **(B)** Ganancia de peso (g). Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=20)

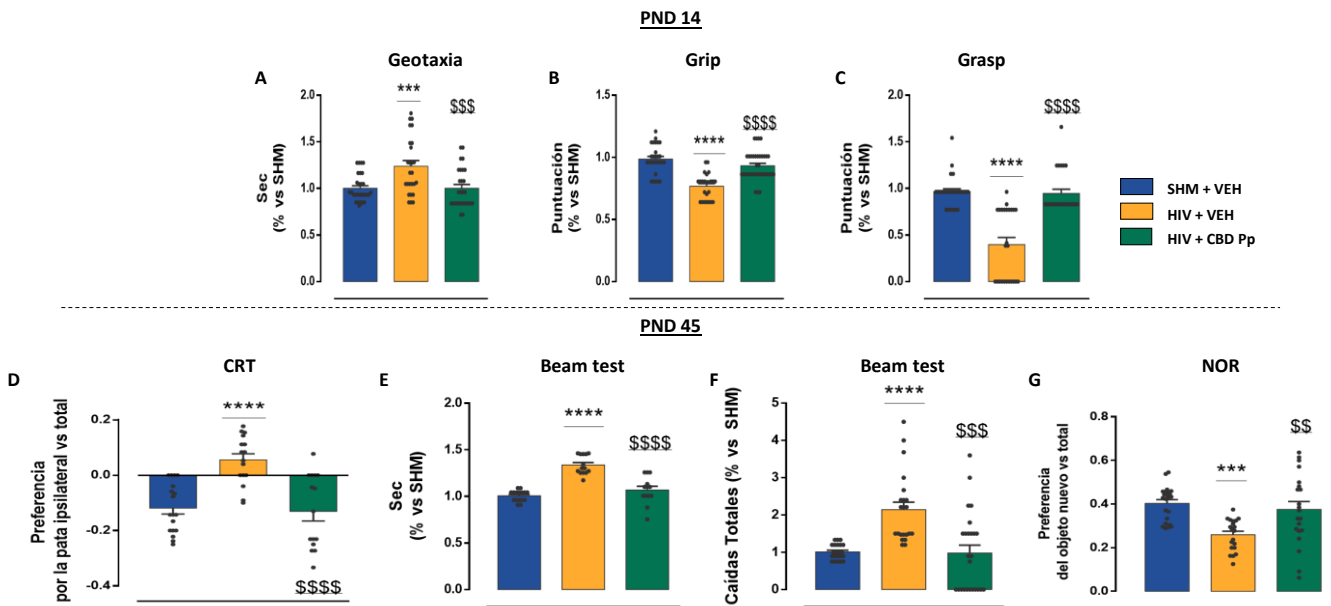
En cuanto al efecto sobre el volumen de daño, el grupo tratado presentó un tamaño de la lesión menor tanto a corto (**Fig. 76 A**) como a largo (**Fig. 76 B**) plazo en comparación con el grupo tratado con vehículo. A su vez, en los estudios correlacionales se observó que el daño no progresaba a lo largo del tiempo (**Fig. 76 C**), siendo esta progresión significativamente diferente a la del grupo HIV + VEH (**Fig. 76 D**). Por lo tanto, el tratamiento de CBD combinado no solo redujo el volumen de daño, sino que también evitó su progreso a lo largo del tiempo.



**Figura 76. Efecto del CBD administrado de forma combinada sobre el porcentaje de lesión.** El tratamiento con CBD administrado pre y postnatalmente reduce el porcentaje de lesión tanto a corto como a largo plazo (**A**) Porcentaje de lesión a PND 6 (**B**) Porcentaje de lesión a PND 45. (**C**) Correlación entre el porcentaje de lesión a corto y a largo plazo en el grupo HIV+CBD Pp. (**D**) Porcentaje de lesión a largo plazo respecto corto plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una t-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\$) respecto a los animales HIV + VEH). En la **Fig. C**, los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. (N=8-12).

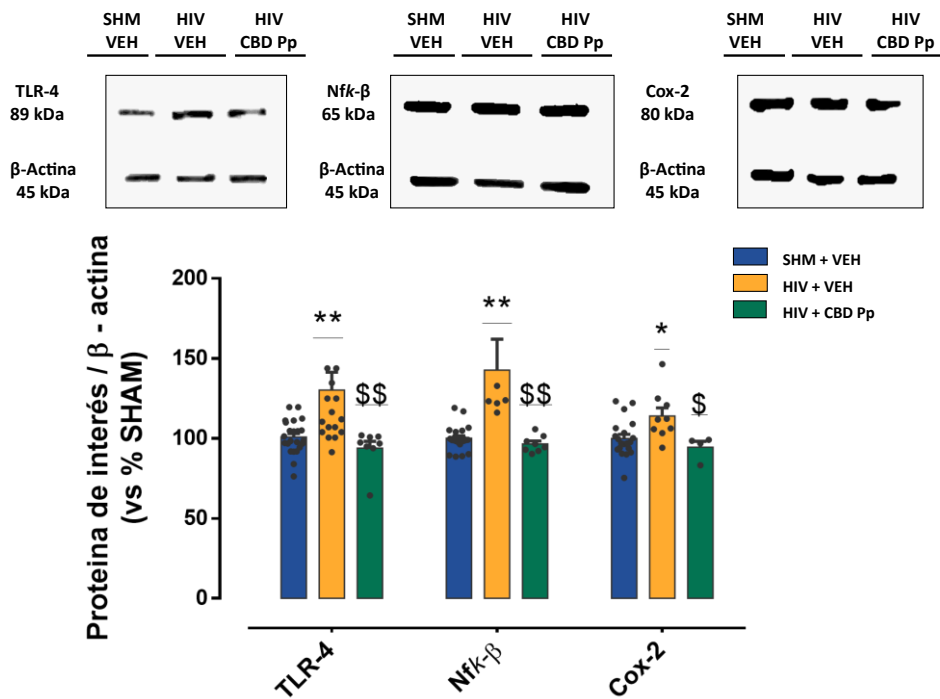
En los estudios neuroconductuales, la administración combinada de CBD ejerció un efecto neuroprotector tanto a medio como a largo plazo. Es decir, a PND 14 los animales tratados presentaron un tiempo similar a los controles y menor que el grupo HIV + VEH en la prueba de la **Geotaxia Negativa** (**Fig. 77 A**). Similares resultados se obtuvieron en la prueba de **Grip** (**Fig. 77 B**) y del **Grasp** (**Fig. 77 C**), donde la puntuación obtenida por los animales tratados con CBD era similar a la del grupo SHAM y mayor que el grupo lesionado tratado con vehículo. Del mismo modo, a PND 45 el grupo tratado presentó una mejora completa en la prueba del **CRT** (**Fig. 77 D**), así como en la prueba de **BW** (**Fig. 77 E y F**). De forma similar, el grupo tratado presentó una

preferencia por el objeto nuevo similar a la de los controles y superior a la del grupo HIV + VEH (Fig. 77 G). Por tanto, el tratamiento combinado con CBD antes y después del daño evitó de forma total el déficit producido por la HIV tanto a medio como a largo plazo.



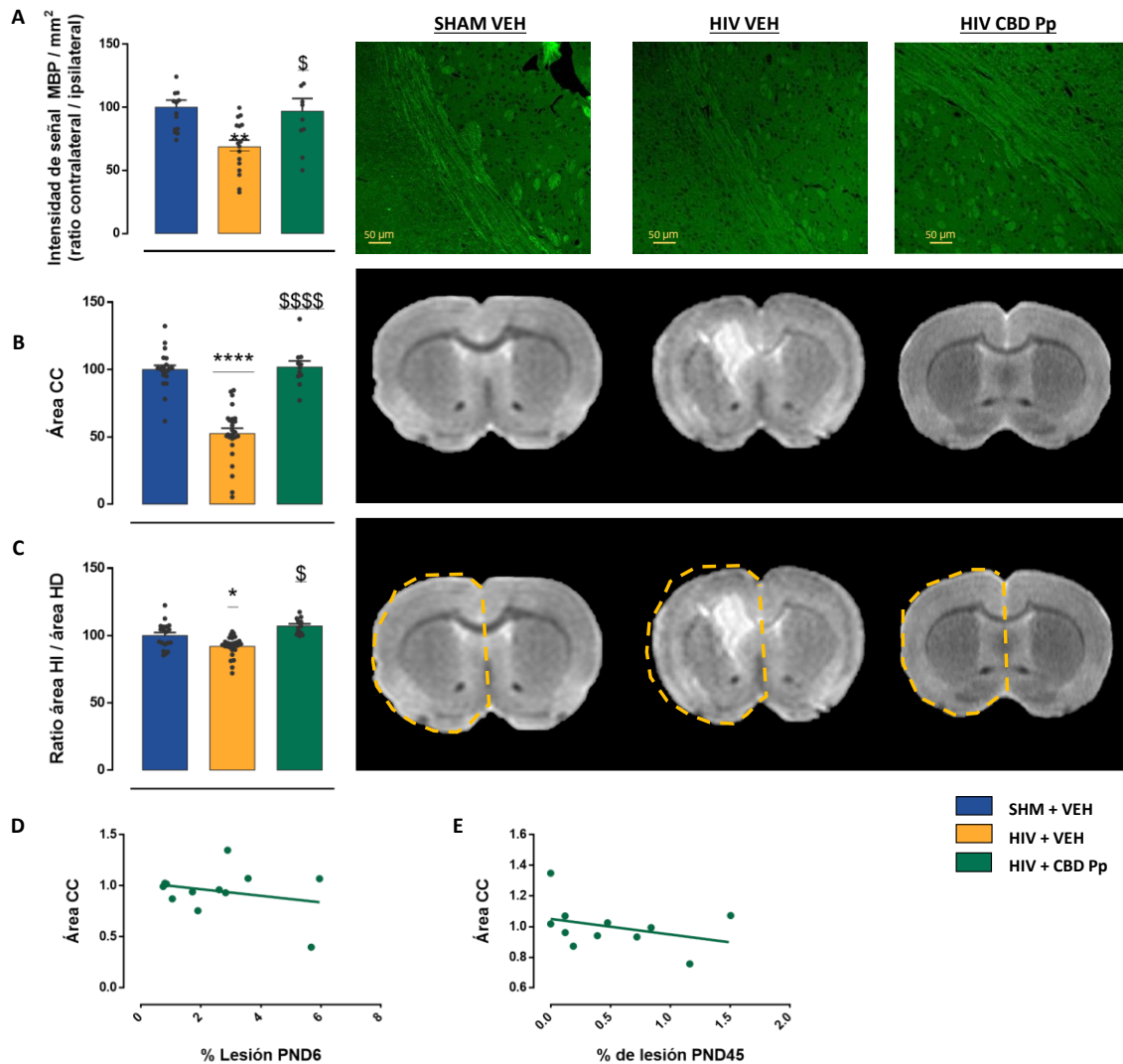
**Figura 77. Resultados de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).** El tratamiento combinado de CBD previene el déficit motor y cognitivo de forma total a medio y largo plazo. (A) Segundos necesarios para que el animal gire 180° en una pendiente inclinada de 45°. (B) Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. (C) Fuerza ejercida por las patas traseras del animal sobre una superficie plana. Todos los resultados son el tanto por 1 de los controles de la cada una de las camadas. (D) Preferencia por la pata ipsilateral. (E y F) Tiempo y porcentaje de caídas. Los resultados de la barra es el tanto por 1 respecto al grupo control. (G) Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=25)

Al igual que en puntos anteriores, se estudió el potencial antiinflamatorio del tratamiento combinado con CBD. El grupo tratado presentó a largo plazo unos niveles menores en comparación con el grupo lesionado tratado con VEH en los niveles de expresión de todos los integrantes analizados de la vía de TLR-4 (Fig. 78), demostrando que el tratamiento con CBD antes y después del daño consiguió un mayor potencial antiinflamatorio que en los casos anteriores.



**Figura 78. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.** El tratamiento con CBD administrado pre y postnatalmente previene la neuroinflamación a largo plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH). (N=8-12)

En cuanto al posible efecto neuroprotector sobre el daño en la SB, observamos como tanto en los niveles de intensidad de señal de la proteína MBP (**Fig. 79 A**), como en el área del CC (**Fig. 79 B**) y del HI (**Fig. 79 C**), el tratamiento combinado consiguió efectos beneficiosos. A su vez, el porcentaje de lesión a corto (**Fig. 79 D**) y largo (**Fig. 79 E**) plazo no se pudieron relacionar con el área del CC. Puede concluirse pues que el tratamiento con CBD antes y después del daño fue la única forma de evitar de forma total la alteración de la SB a largo plazo.



**Figura 79. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento con CBD combinado.** El tratamiento combinado de CBD previene completamente el daño en la SB a largo plazo. **(A)** Ratio de los niveles de intensidad de señal MBP en lado ipsilateral vs contralateral del CC. Escala: 50µm. **(B)** Área del CC. **(C)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. **(D)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 6. **(E)** Correlación entre el área del CC y el volumen de la lesión a PND 45. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson (N=10-12).

En conclusión, el tratamiento de la HIV con CBD antes y después del daño fue la única forma de administración capaz de evitar totalmente las secuelas presentes en nuestro modelo animal. No obstante, dado que en el **Objetivo 3** se trató de dilucidar en detalle los eventos fisiopatológicos por los que el CBD ejercía su efecto protector, se hizo una breve comparación de todos los grupos (postnatal, prenatal y combinada) en las pruebas que hemos ido describiendo a lo largo de este Diseño experimental. De esta forma, el que presentó mejor resultado fue escogido para evaluar en detalle su efecto sobre la fisiopatología de la HIV en ratas neonatas PND 1.

## ***Comparación entre las distintas formas de tratamiento de CBD en la PCOH***

Como se detalla en la **Tabla 9**, no se observó ninguna diferencia en el **peso inicial** entre ninguno de los grupos; a su vez, todos los grupos tratados presentaban una **ganancia de peso** superior a la del grupo HIV + VEH y similar a los controles. En cuanto al efecto que ejerce sobre el **volumen del daño**, a corto y largo plazo, todos los grupos CBD a excepción de los animales tratados prenatalmente presentaron un volumen de daño menor en comparación con el grupo tratado con vehículo. No obstante, si atendemos al efecto que presenta este fármaco en la evolución de la lesión, observamos como solo el grupo CBD tratado de forma combinada era distinto al grupo HIV + VEH.

En cuanto a las pruebas neuroconductuales realizadas a medio plazo (PND 14), observamos como el grupo CBD administrado pre y postlesionalmente fue el único que presentó un tiempo inferior en la prueba de la **Geotaxia invertida**. De la misma forma, a excepción del grupo tratado prenatalmente, todas las formas de tratamiento presentaron una puntuación mayor que los animales HIV + VEH en la prueba del **Grip y Grasp**. En cuanto a las pruebas neuroconductuales realizadas a largo plazo, todos los grupos CBD (a excepción de aquel que recibió una única dosis postlesionalmente) presentaron una preferencia por la pata contralateral mayor que el grupo VEH en la prueba del **CRT**. Del mismo modo, en la prueba de la **Barra** los grupos tratados con CBD prenatalmente (independientemente de si posteriormente fueron tratados de nuevo o no) fueron los únicos capaces de impedir la disfuncionalidad motora. En cuanto al déficit cognitivo evaluado en la prueba del **NOR**, observamos cómo los animales tratados con una única dosis postlesionalmente y los animales tratados de forma combinada presentan una preferencia por el objeto nuevo mayor (e igual a los controles) que el grupo HIV + VEH. En resumen, a pesar de que todas las formas de tratamiento mostraron una mejora parcial en la funcionalidad motora y cognitiva, el tratamiento con CBD combinado fue el único capaz de reducir de forma total esta alteración en todas las pruebas.

En cuanto al análisis del **potencial antiinflamatorio** del CBD, de nuevo únicamente el tratamiento combinado fue el único capaz de reducir los niveles de expresión de todos los marcadores proinflamatorios evaluados a largo plazo. Del mismo modo, este mismo grupo fue el único capaz de evitar totalmente el **daño de la SB y la hipomielinización**, ya que fue el único grupo capaz de evitar la disminución de los niveles de expresión de la proteína MBP así como la pérdida del área del CC presente en el modelo. A su vez, también impidió la reducción del volumen del HI, marcador de daño en la SB.

En resumen, la comparación entre todos los grupos demuestra que todas las formas de administración fueron capaces de reducir el volumen sangrado, ejercer un efecto antiinflamatorio, reducir el daño en la SB, y en última instancia, evitar el déficit neuroconductual tanto a medio como a largo plazo. Sin embargo, el grupo al que se le administró CBD de manera combinada fue el único capaz de evitar las consecuencias de la HIV y alcanzar niveles similares a los controles en todas las pruebas, por lo que fue el grupo seleccionado para estudiar las posibles vías de actuación del CBD sobre la prevención de la PCOH.

Prueba		Tratamiento			
		HIV CBD 1X	HIV CBD 3X	HIV CBD Pre	HIV CBD Pp
Peso	Peso inicial	-	-	-	-
	Ganancia de Peso	\$\$\$	\$\$\$	\$\$\$	\$\$\$ **
Volumen de lesión	Volumen lesión PND 6	\$\$	\$\$	-	\$\$
	Volúmen lesión PND 45	\$\$	\$\$	-	\$\$
	Mantenimiento de la lesión	-	-	-	\$\$
Pruebas neuroconductuales	Geotaxia	-	-	-	\$
	Grip	\$\$	\$	-	\$\$\$
	Grasp	-	\$\$	-	\$\$
	CRT	-	\$\$	\$	\$
	Tiempo BW	@	\$\$	\$\$\$	\$
	Porcentaje de caídas en BW	\$	-	\$\$	\$
	NOR	\$\$	-	-	\$
Marcadores proinflamatorios	Niveles TLR-4	-	-	-	\$
	Niveles NFκ-B	-	-	-	\$
	Niveles Cox-2	-	-	-	\$
Hipomielinización y daño en la SB	Niveles de expresión de MBP	-	-	-	\$
	Área del CC	*** @	*** \$	\$\$	## \$\$ &&
	Pérdida de HI	-	-	-	\$\$\$ ##

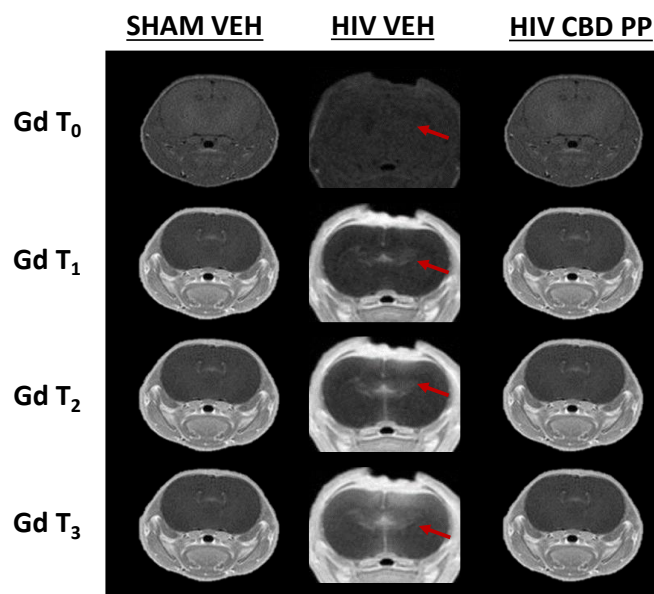
**Tabla 9. Resumen de la comparación entre los diferentes tratamientos en las pruebas descritas anteriormente.** Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM. Se utilizó no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH; & respecto a los animales HIV+CBD+3X; # respecto a los animales HIV+CBD1X; @ respecto a los animales HIV + CBD pre) (N=15).

# Posibles mecanismos de acción del CBD

A pesar de que hemos podido determinar el potente efecto antiinflamatorio del CBD a largo plazo, desconocemos cómo y cuándo este fármaco actúa en el resto de los eventos fisiopatológicos descrito en el modelo. En este sentido, en el **Diseño experimental 3** estudiamos las diversas formas de actuación en las que está implicado el CBD en nuestro modelo animal de PCOH, utilizando el modo de aplicación prenatal más postlesional en 3 dosis.

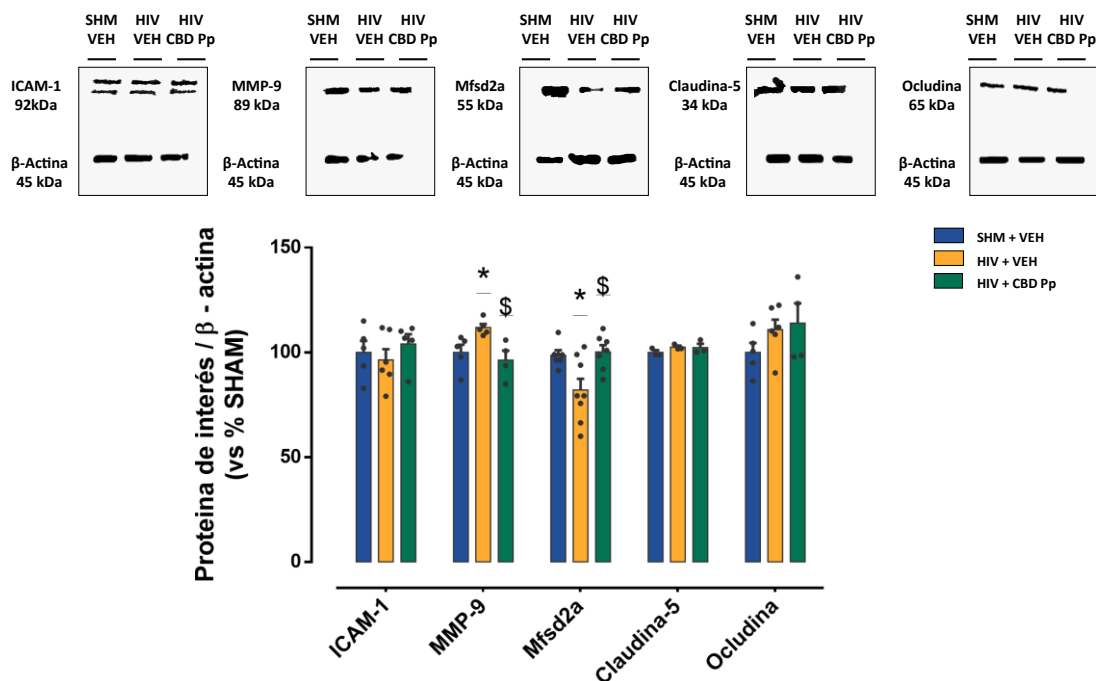
## *Efectos del CBD sobre la fisiopatología a corto plazo*

Anteriormente, se observó por RM como en nuestro modelo animal el sangrado inducido por la rotura de los vasos de la MG producía un aumento en la permeabilidad de la BHE, y que este se mantenía al menos hasta medio plazo. Como se indica en la **Fig. 80**, mientras que en el grupo sin tratamiento se observó un aumento de la concentración del agente de contraste Gd, los animales tratados con CBD, al igual que los controles, carecían de regiones hiperdensas que sugiriesen una posible alteración de la BHE a PND 6.



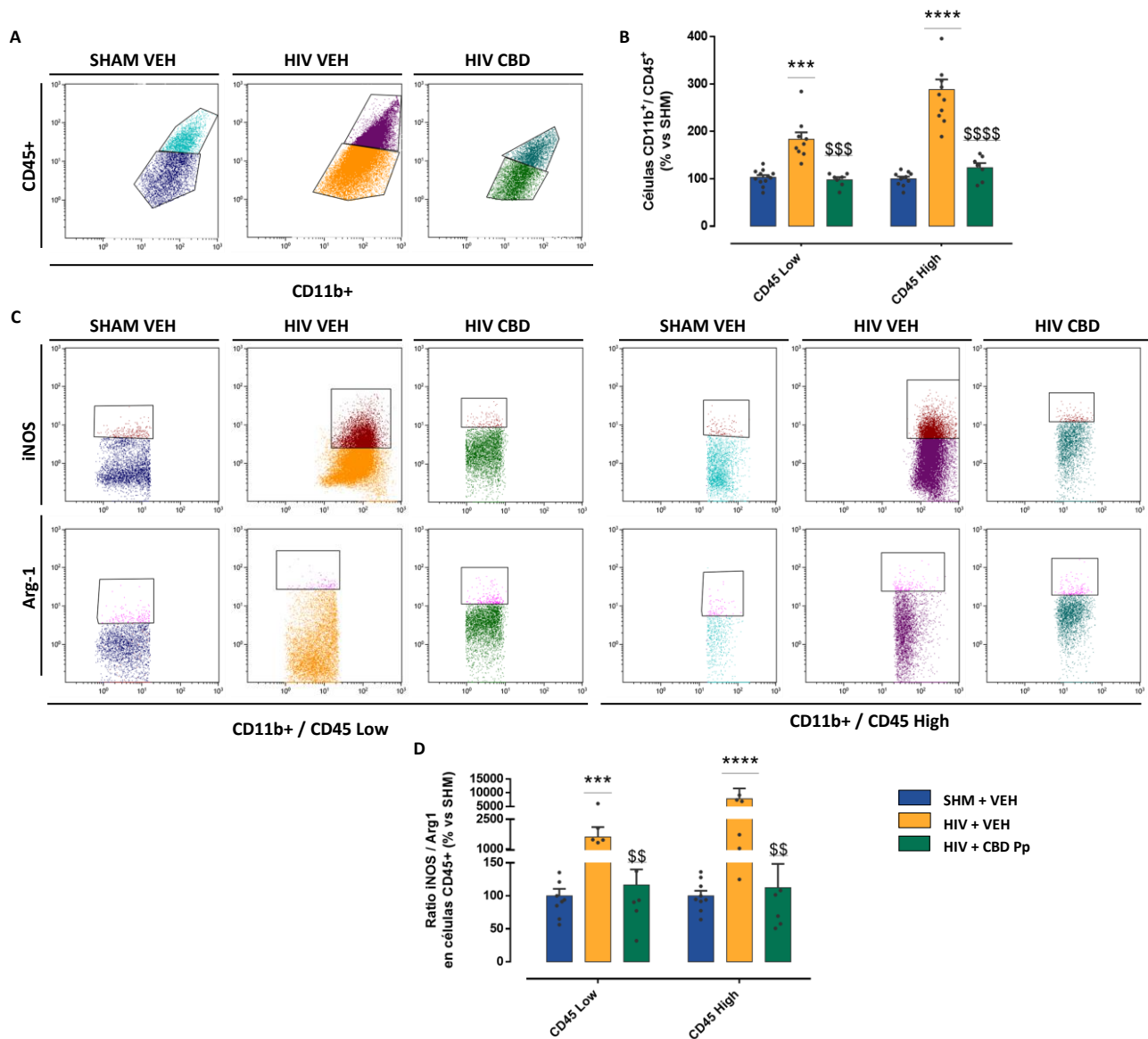
**Figura 80.** Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control, HIV + VEH y HIV + CBD llevado a cabo a PND 6. El CBD previene la extravasación de Gd. La flecha roja indica el área de acumulación de Gd. Gd T<sub>0</sub>: imagen pre-contraste; T<sub>1</sub>: imagen 5' post-contraste; T<sub>2</sub>: imagen a 30' post-contraste; T<sub>3</sub>: imagen a 60' post-contraste. (N=8-10)

De nuevo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de las UEs claudina-5 ni ocludina, ni tampoco de la proteína ICAM-1 entre ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, el tratamiento con CBD redujo los niveles de expresión de la metaloproteasa MMP-9 y aumentó los del receptor Mfsd2a (Fig. 81). Puede concluirse así que parte del efecto protector del CBD sobre la BHE podría deberse al descenso en la síntesis de MMP-9 y el aumento de expresión del receptor Mfsd2a.



**Figura 81. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE a PND 6.** El CBD previene el daño y la disfuncionalidad de la BHE a corto plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; § respecto a los animales HIV + VEH) (N=8-10)

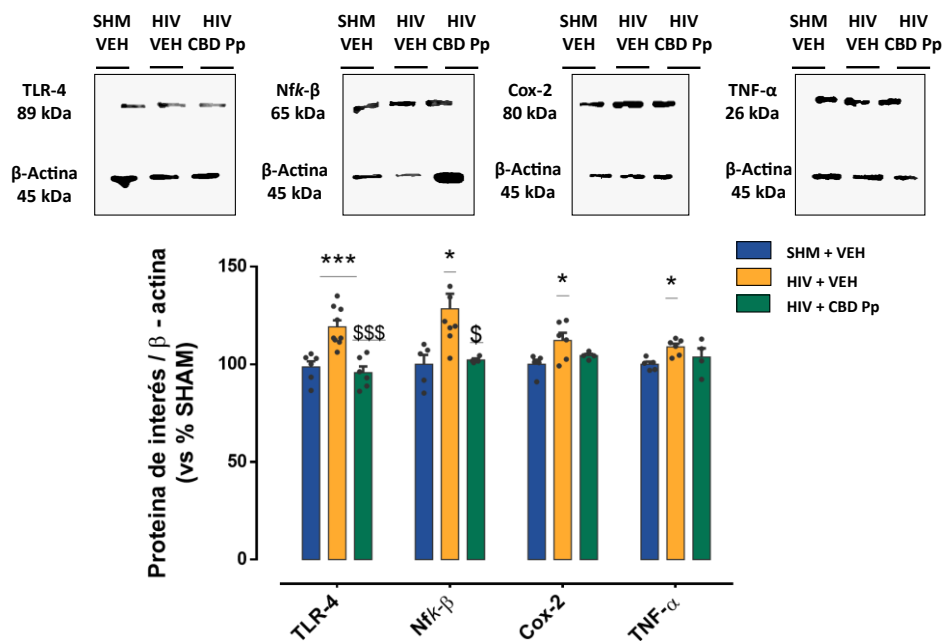
Del mismo modo, se observó una disminución en los niveles de las células CD11b<sup>+</sup> con marcaje CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> (Fig. 82 A y B), sugiriendo un menor reclutamiento de microglía y macrófagos respectivamente. De la misma forma, en ambas poblaciones se produjo un descenso de la ratio iNOS / Arg-1 cuando los animales HIV fueron tratados con CBD (Fig. 82 C y D), presentando un fenotipo similar al de los controles. Por lo tanto, a corto plazo el tratamiento con CBD redujo la activación y reclutamiento de infiltrados y células del sistema inmune que podrían estar asociados con el daño secundario a la HIV.



**Figura 82. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> a PND 6.** En nuestro modelo animal el tratamiento con CBD previene el aumento del número de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>. **(A)** Pictograma que representa el número de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> del grupo control y HIV **(B)** Niveles de expresión de células CD11b<sup>+</sup> con marcaje CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> entre ambos grupos **(C)** Pictograma representativo del número de células que presentan los marcadores iNOS y Arg-1 en la población CD45<sup>High & Low</sup> en ambos grupos experimentales **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> y marcaje CD45<sup>High & Low</sup>. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=6-12)

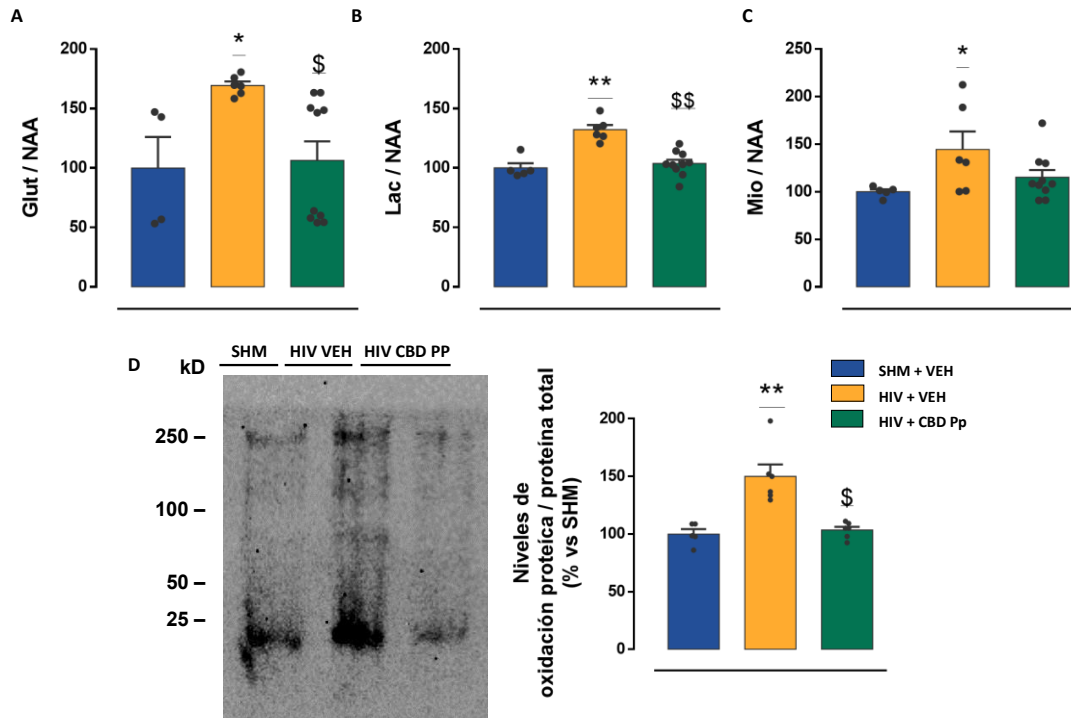
Anteriormente, se describió que los eventos fisiopatológicos producidos durante la HIV en parte se debieron al fenotipo M1 de las células del sistema inmune. Dado que el tratamiento con CBD cambió el fenotipo de estas, se estudió si este efecto implicó un descenso en la expresión de los componentes de la vía de TLR-4 a corto plazo. El tratamiento combinado con este fitocannabinoide redujo los niveles de expresión tanto de la proteína TLR-4 como del factor Nfk-

B. No obstante, sólo ejerció un efecto parcial sobre los niveles de la citoquina TNF- $\alpha$  y de la enzima Cox-2 (**Fig. 83**), ya que no se observaron diferencias con el grupo control pero tampoco con el HIV + VEH. Por lo tanto, aunque el tratamiento con CBD sólo redujo parcialmente la síntesis de enzimas asociadas con la inflamación, a corto plazo este fitocannabinoide disminuyó los niveles de TLR-4 y Nfk-B de manera completa, confirmándose así su potente efecto antiinflamatorio en estadios muy tempranos de la enfermedad.



**Figura 83. Análisis por WB de los niveles de expresión de marcadores proinflamatorios a PND 6.** El tratamiento con CBD previene la neuroinflamación a corto plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=8-10)

De forma similar, quisimos evaluar si el tratamiento con CBD era capaz de reducir los niveles de otros eventos fisiopatológicos implicados en la patogénesis de la HIV. Los animales tratados presentaron valores menores que los grupos HIV + VEH de Glutamato (**Fig. 84 A**), Lactato (**Fig. 84 B**) y de proteínas oxidadas (**Fig. 84 D**), indicando un descenso de la excitotoxicidad, daño tisular y estrés oxidativo respectivamente. A su vez, los efectos del tratamiento sobre los valores de Mioinositol fueron sólo parciales (**Fig. 84 C**). En conjunto, estos resultados indican que a corto plazo el CBD modula los principales mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño inducido por HIV.



**Figura 84. Niveles de Glutamato, Lactato, Mioinositol y oxidación proteica a PND 6.** El CBD previene el aumento de los niveles de los metabolitos analizados por H+MRS y de la oxidación proteica analizada por el kit Oxyblot. **(A)** Niveles de Glutamato (Ratio Glut / NAA) **(B)** Niveles de Lactato (Ratio Lac / NAA). **(C)** Niveles de Mioinositol (Ratio Mio / Cre). **(D)** Análisis de la oxidación proteica de muestras cerebrales respecto la proteína total. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; § respecto a los animales HIV + VEH) (N=8-10)

En conclusión, el tratamiento combinado de CBD ejerció a un efecto neuroprotector desde estadios muy tempranos de la enfermedad, ya que evitó la disfuncionalidad de la BHE así como el reclutamiento de infiltrados y células inmunológicas que están implicadas en el inicio de los eventos fisiopatológicos de la HIV. Este efecto resultó en la modulación a la baja de los principales mecanismos involucrados en el daño cerebral por HIV.

### ***Efectos del CBD sobre la fisiopatología a medio plazo***

En cuanto al efecto del CBD sobre la fisiopatología a medio plazo, los estudios de RM mostraron que el tratamiento con CBD evitó la aparición de focos hiperdensos (presentes en los animales HIV + VEH) de forma similar a los controles. Este efecto se observó tanto en los casos leves como en los más severos (**Fig. 85**). Así, los análisis de neuroimagen indicaron que el efecto del CBD

sobre la permeabilidad de la BHE se mantuvo al menos hasta 14 días después de la inducción hemorragia.

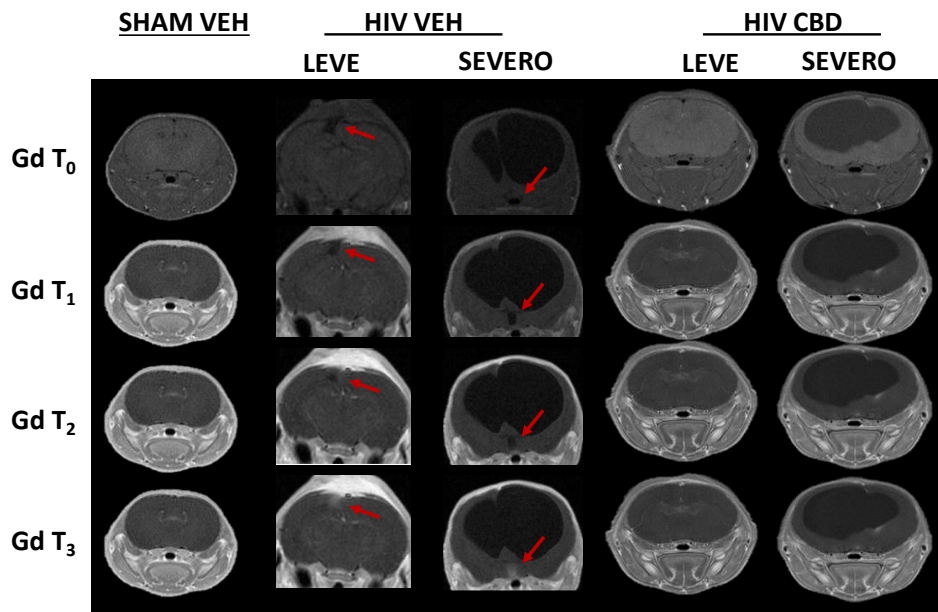
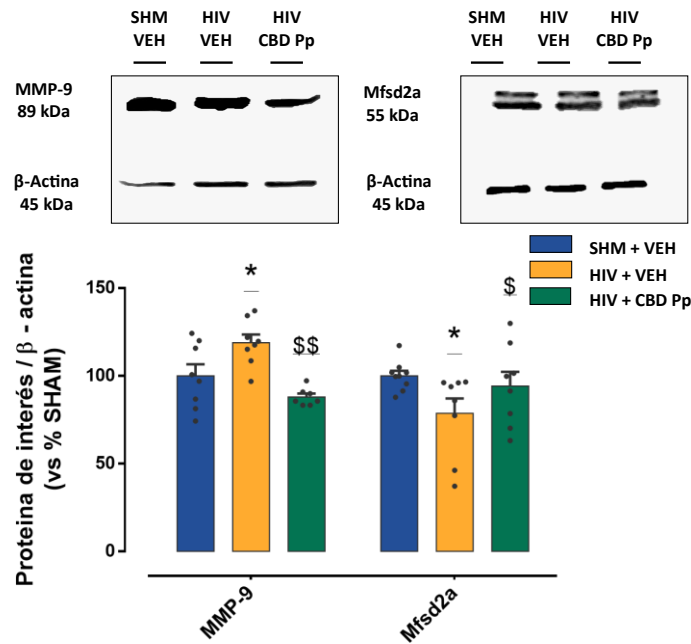


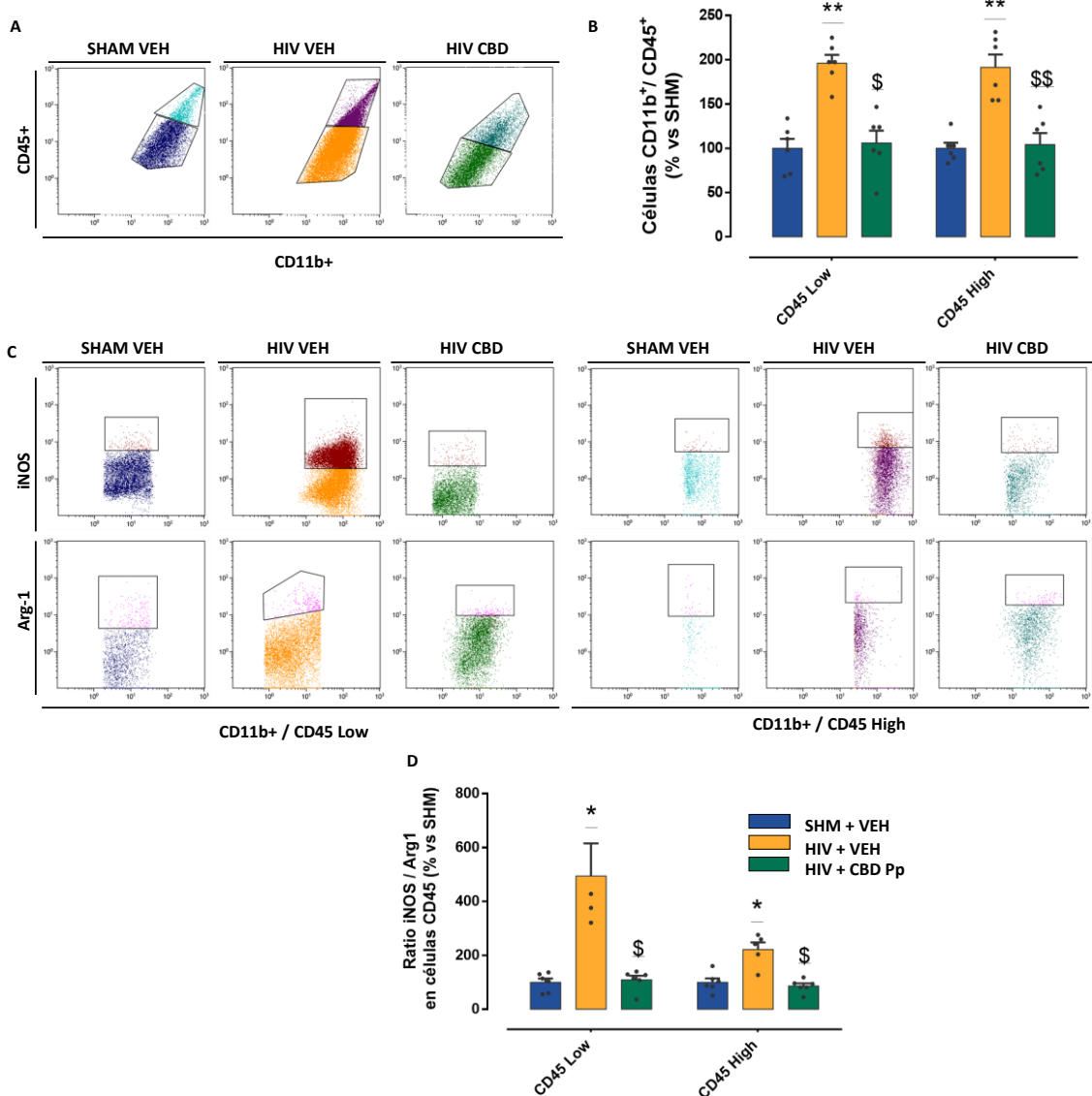
Figura 85. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV VEH y CBD producido a PND 14. A medio plazo, el tratamiento con CBD previno la extravasación de Gd en los casos leves y severos. Las flechas indican la localización exacta en la que se sigue produciendo a PND 14 la extravasación de Gd en el grupo HIV. Gd T<sub>0</sub>: imagen pre-contraste; T<sub>1</sub>: imagen 5' post-contraste; T<sub>2</sub>: imagen a 30' post-contraste; T<sub>3</sub>: imagen a 60' post-contraste. (N=5-12)

En los ensayos de WB, de nuevo se observó cómo los niveles de expresión de la metaloproteasa MMP-9 se mantuvieron reducidos en los grupos control y HIV + CBD en comparación con los animales HIV + VEH (**Fig. 86**). Del mismo modo, los animales tratados presentaron niveles de expresión del receptor Mfsd2a similares a la de los controles y superiores a la de los animales lesionados tratados con vehículo (**Fig. 86**). De esta forma, se confirma de nuevo que el efecto protector del CBD podría estar preservando la correcta funcionalidad de la BHE también a medio plazo.



**Figura 86. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE a PND 14.** En nuestro modelo animal, a medio plazo el CBD sigue manteniendo un efecto neuroprotector sobre la BHE. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=8-10)

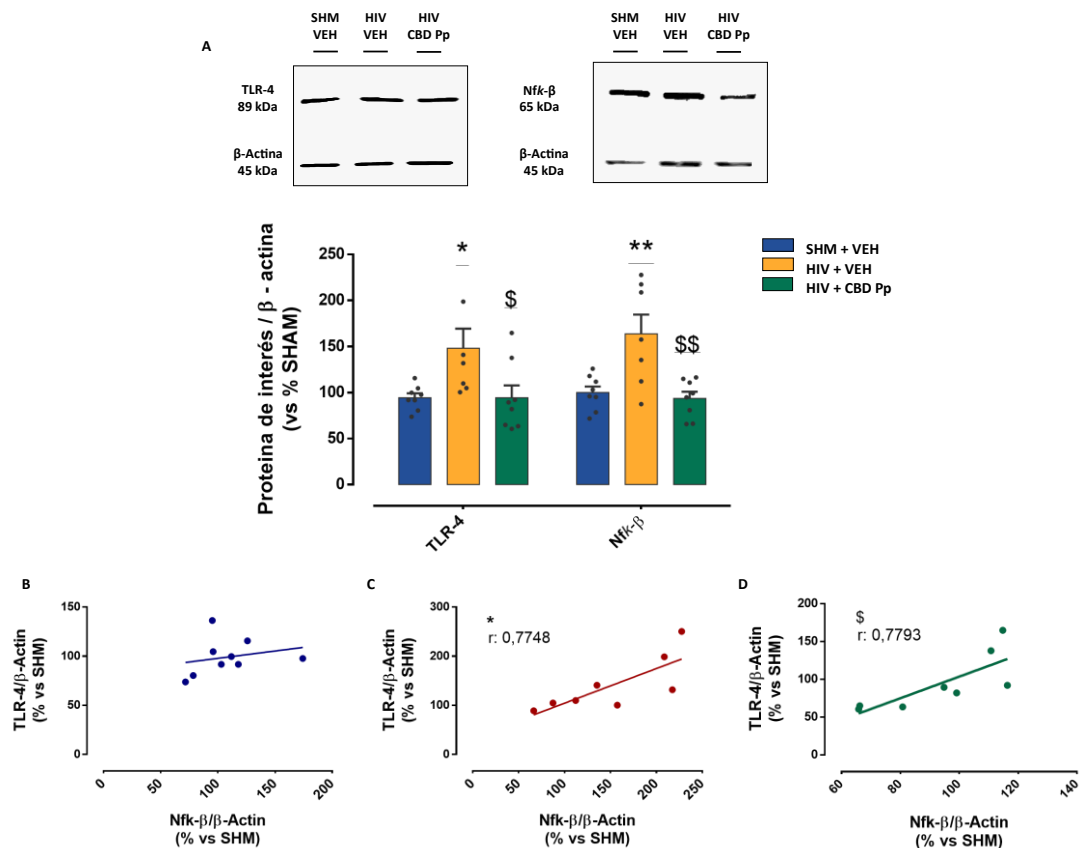
Al igual que a PND 6, el tratamiento con CBD evitó a medio plazo el aumento de las poblaciones  $CD11b^+ / CD45^{low \& high}$ , siendo estos niveles similares a los controles y menores que los observados en el grupo HIV + VEH (**Fig. 87 A y B**). A su vez, al igual que en estadios más tempranos, la ratio  $iNOS / Arg-1$  en los animales tratados siguió siendo menor que en el grupo HIV + VEH, y similar al grupo control (**Fig. 87 C y D**). Por tanto, en consonancia con los estudios de RM y WB, se observa que el tratamiento con CBD en este modelo de HIV preservó la integridad de la BHE también a medio plazo, reduciendo la microgliosis y la infiltración de macrófagos.



**Figura 87. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b+ / CD45+ a PND 14.** En nuestro modelo animal no existen diferencias significativas en el número de células con marcaje CD11b+ / CD45+ a medio plazo entre el grupo tratado con CBD y los controles. **(A)** Pictograma que representa el número de células CD11b+ / CD45+ del grupo control y HIV **(B)** Niveles de expresión de células con marcaje CD11b+ / CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> entre ambos grupos **(C)** Pictograma representativo del número de células que presentan el marcador iNOS o Arg-1 en la población CD45<sup>High & Low</sup> en ambos grupos **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b+ / CD45<sup>High & Low</sup>. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=4-12)

El descenso en el número de células inmunes con fenotipo M1 en el grupo tratado con CBD podría estar implicado en la reducción de los niveles de expresión tanto del receptor TLR-4 como de Nfk-B (**Fig. 88 A**) en comparación con los animales lesionados tratados con vehículo. A su vez, los estudios correlacionales llevados a cabo entre ambos elementos indicaron que, al igual que en los animales HIV + VEH (**Fig. 88 C**), en el grupo tratado existía una relación entre ambos

marcadores proinflamatorios (**Fig. 88 D**), sugiriendo que el descenso de uno podría implicar la reducción del otro y viceversa.



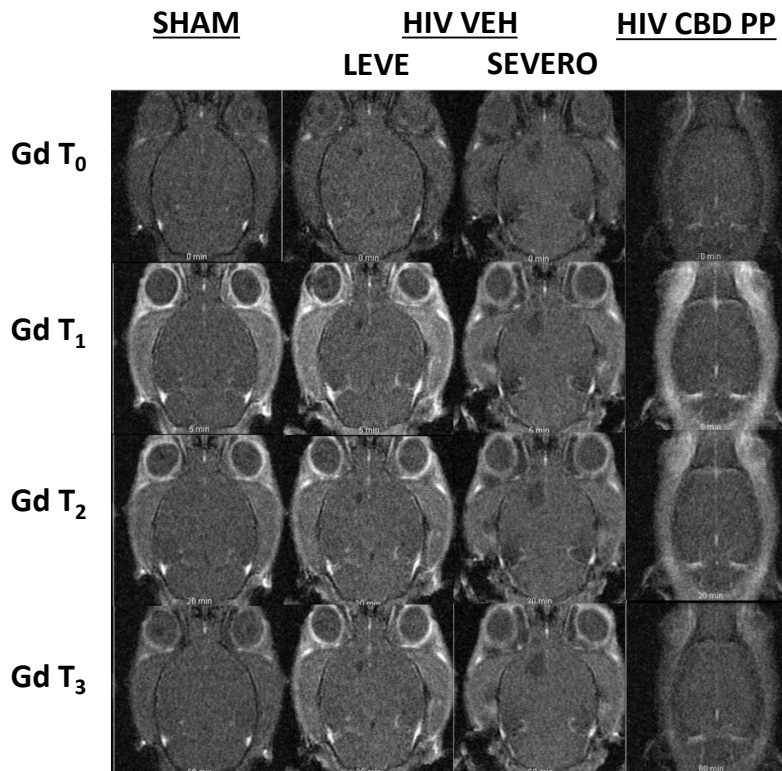
**Figura 88. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a PND 14.** En nuestro modelo animal a medio plazo el CBD promueve un ambiente antiinflamatorio. **(A)** Niveles de expresión de TLR-4 y Nfk-B respecto de la proteína control β-actina. **(B)** Correlación entre los niveles de expresión de TLR-4 y Nfk-B en el grupo control **(C)** Correlación entre los niveles de expresión de TLR-4 y Nfk-B en el grupo HIV + VEH. **(D)** Correlación entre los niveles de expresión de TLR-4 y Nfk-B en el grupo HIV + CBD. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH). En los estudios correlacionales los datos siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Pearson (Niveles TLR-4 vs Niveles Nfk-B) (N=8-10)

En conclusión, en consonancia con los resultados observados a corto plazo, el tratamiento con CBD evitó también a PND 14 la presencia de daño sobre la BHE, así como la inducción de otros eventos fisiopatológicos como la neuroinflamación (actuando concretamente sobre la vía de TLR-4). Por lo tanto, el CBD administrado antes y después del daño ejerció un efecto neuroprotector que se inicia desde estadios muy tempranos de la enfermedad y se mantiene a lo largo del tiempo.

### Efectos del CBD sobre la fisiopatología a largo plazo

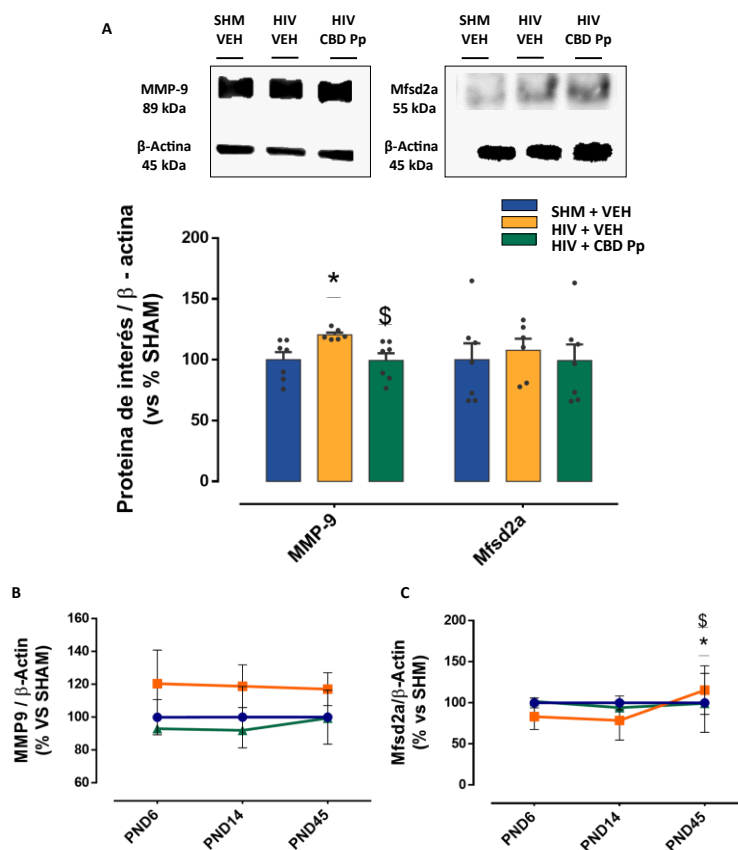
Ya que previamente observamos el potente efecto antiinflamatorio de esta forma de tratamiento también a largo plazo, se estudió si este efecto implicaba alguna modificación de la integridad y daño de la BHE en este punto temporal.

Dado que se desconoce el papel del CBD sobre la BHE a largo plazo, inicialmente evaluamos la integridad de esta estructura indirectamente mediante estudios de neuroimagen. Como se observa en la **Fig. 89**, no se aprecia ningún área hiperdensa que indique la acumulación o extravasación de Gd en ninguno de los grupos experimentales. Estos datos indicaron que, en este modelo de HIV, la BHE se encontraba intacta a nivel macroscópico a largo plazo, y que el tratamiento con CBD no ejerció ningún efecto sobre ella.



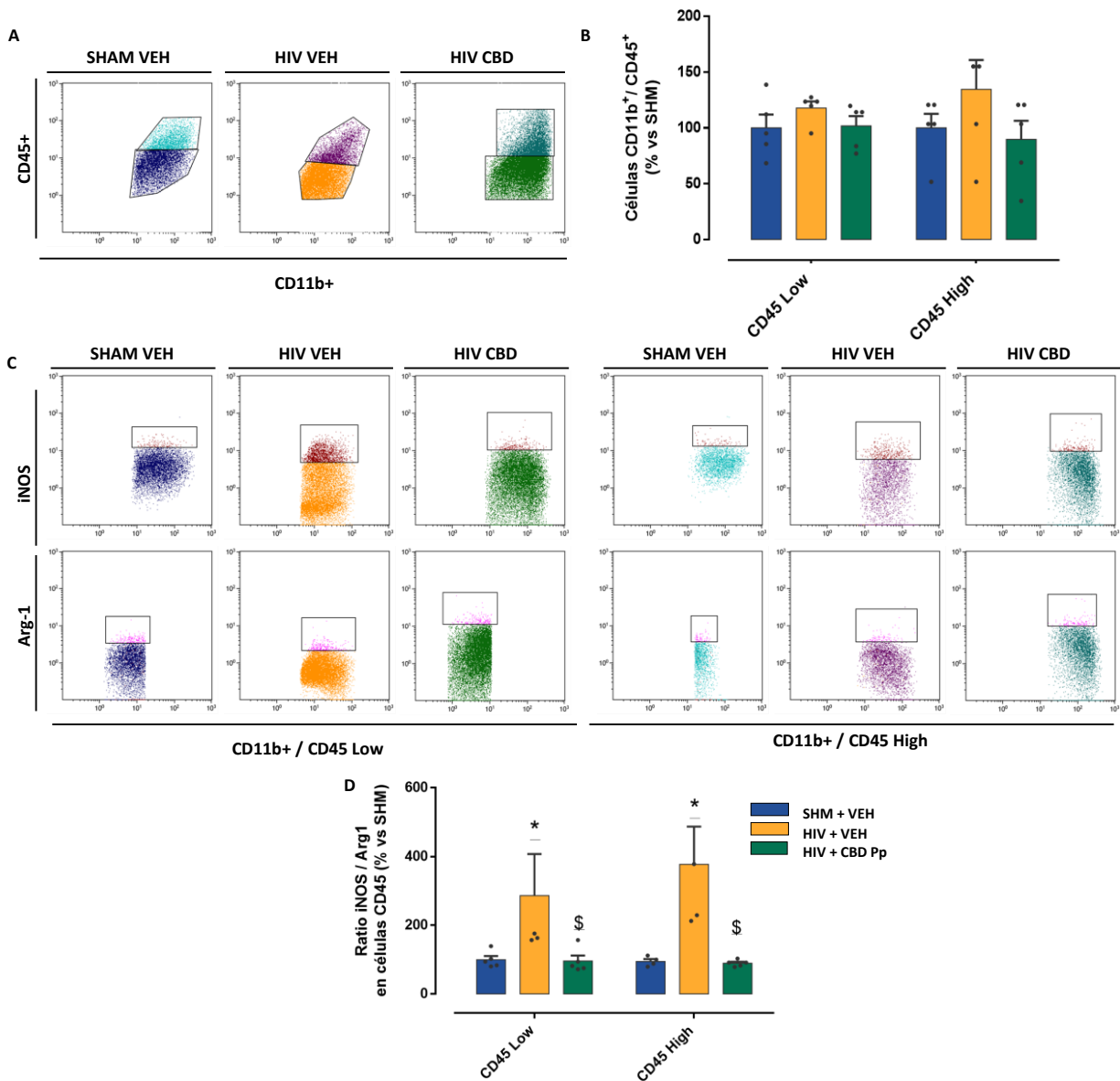
**Figura 89.** Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV VEH y CBD llevado a cabo a PND 45. A largo plazo ya no se produce una acumulación de Gd en ninguno de los grupos. Gd T<sub>0</sub>: imagen pre-contraste; T<sub>1</sub>: imagen 5' post-contraste; T<sub>2</sub>: imagen a 30' post-contraste; T<sub>3</sub>: imagen a 60' post-contraste. (N=5-10)

En cuanto a los estudios biomoleculares, observamos cómo los animales tratados con CBD presentaban niveles de expresión de la metaloproteasa MMP-9 similares a los controles y menores que el grupo HIV + VEH (**Fig. 90 A**); sin embargo, no se apreciaron diferencias en los niveles del receptor Mfsd2a entre ninguno de los grupos (**Fig. 90 A**). De manera adicional, evaluamos el efecto que podría ejercer el CBD en la evolución temporal de los niveles de expresión de estos marcadores. En consonancia con los resultados observados en el grupo tratado en otras etapas temporales, los niveles de expresión de ambos marcadores no variaron a lo largo del tiempo, mientras que los niveles de expresión del receptor Mfsd2a aumentaron a largo plazo solo en el grupo lesionado tratado con vehículo (**Fig. 90 B y C**).



**Figura 90. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE a PND 45.** En nuestro modelo animal a largo plazo el CBD sigue manteniendo un efecto neuroprotector sobre BHE. **(A)** Niveles de expresión de MMP-9 y Mfsd2a respecto de la proteína control  $\beta$ -actina. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el test Kruskal-Wallis. \*  $p < 0.05$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH). **(B)** Niveles de expresión de MMP9 respecto de la proteína control  $\beta$ -actina. **(C)** Niveles de expresión de Mfsd2a respecto de la proteína control. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías seguido de un post-test de Bonferroni entre los distintos puntos temporales de cada mismo grupo. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  (\* respecto a los animales HIV + VEH PND 6; \$ respecto a los animales HIV + VEH PND 14) (N=8-10)

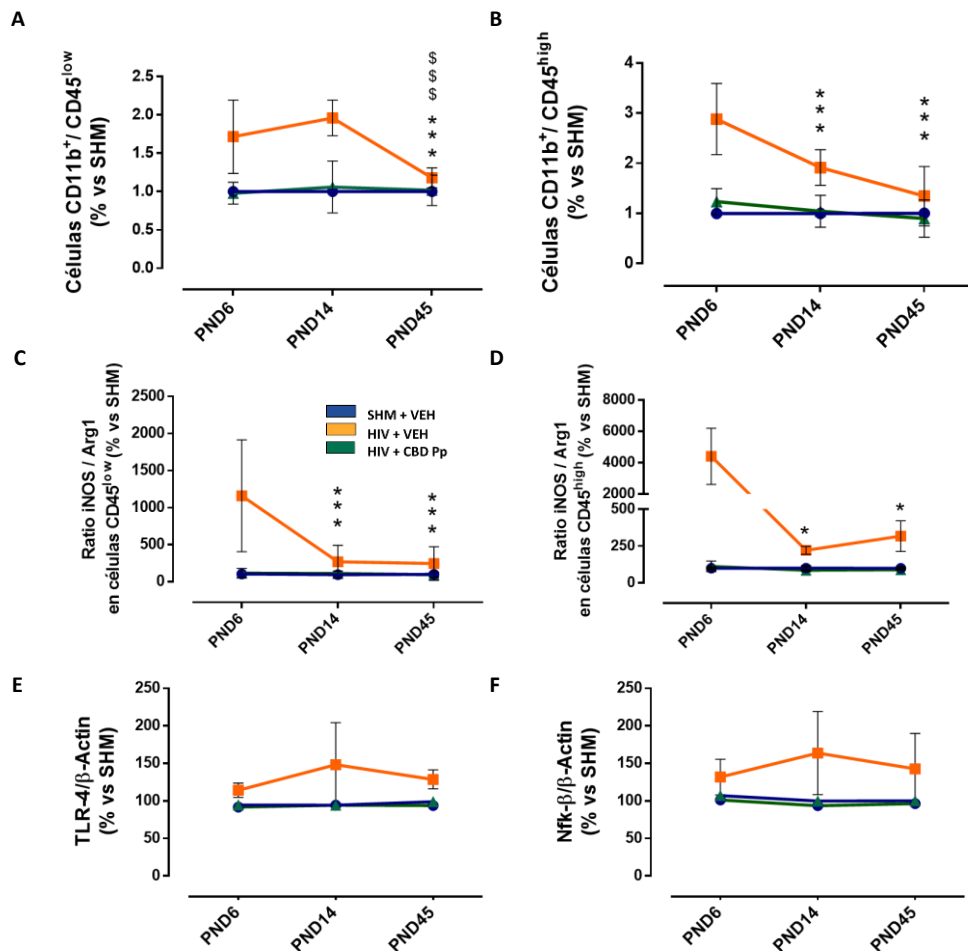
A pesar de no observarse ningún efecto deletéreo sobre permeabilidad de la BHE tras la administración combinada con CBD, quisimos realizar el análisis de los niveles de expresión de la población CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> y su fenotipo mediante CF. Al igual que en el Diseño Experimental 1, en el grupo tratado con CBD tampoco se observaron diferencias en comparación con los grupos control y HIV + VEH en los niveles de las poblaciones CD45<sup>low</sup> y CD45<sup>high</sup> (**Fig. 91 A y B**); esto confirmó que el tratamiento con este fitocannabinoide no ejerció ningún efecto sobre la



**Figura 91. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> a PND 45.** En nuestro modelo animal no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos en el número de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup>. **(A)** Pictograma que representa el número de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>+</sup> del grupo control y HIV **(B)** Niveles de expresión de células CD11b<sup>+</sup> con marcaje CD45<sup>low</sup> y Cd45<sup>high</sup> **(C)** Pictograma representativo del número de células que presentan el marcador iNOS o Arg-1 en la población CD45<sup>High</sup> & <sup>Low</sup> en ambos grupos **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>High</sup> & <sup>Low</sup>. Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=5)

permeabilidad de la BHE a largo plazo. No obstante, si atendemos al fenotipo presente en estas poblaciones celulares, si se observó como el tratamiento con este fármaco redujo la ratio iNOS / Arg-1 a niveles similares a los controles (**Fig. 91 C y D**). Por lo tanto, aunque a largo plazo el CBD no ejerció ningún efecto sobre las poblaciones de macrófagos y microglía, si preservó el fenotipo reparador presente en puntos anteriores.

Dado que en los animales lesionados los niveles de expresión de macrófagos y microglía, así como su fenotipo, variaron a lo largo del tiempo, decidimos investigar su tendencia y relación con los marcadores proinflamatorios estudiados también a lo largo del tiempo. Así, a largo plazo los animales del grupo tratado con CBD presentaron unos niveles estables en la proporción de la población CD45<sup>low & high</sup> (**Fig. 92 A y B**) y de la ratio iNOS / Arg-1 (**Fig. 92 C y D**). Esto confirma



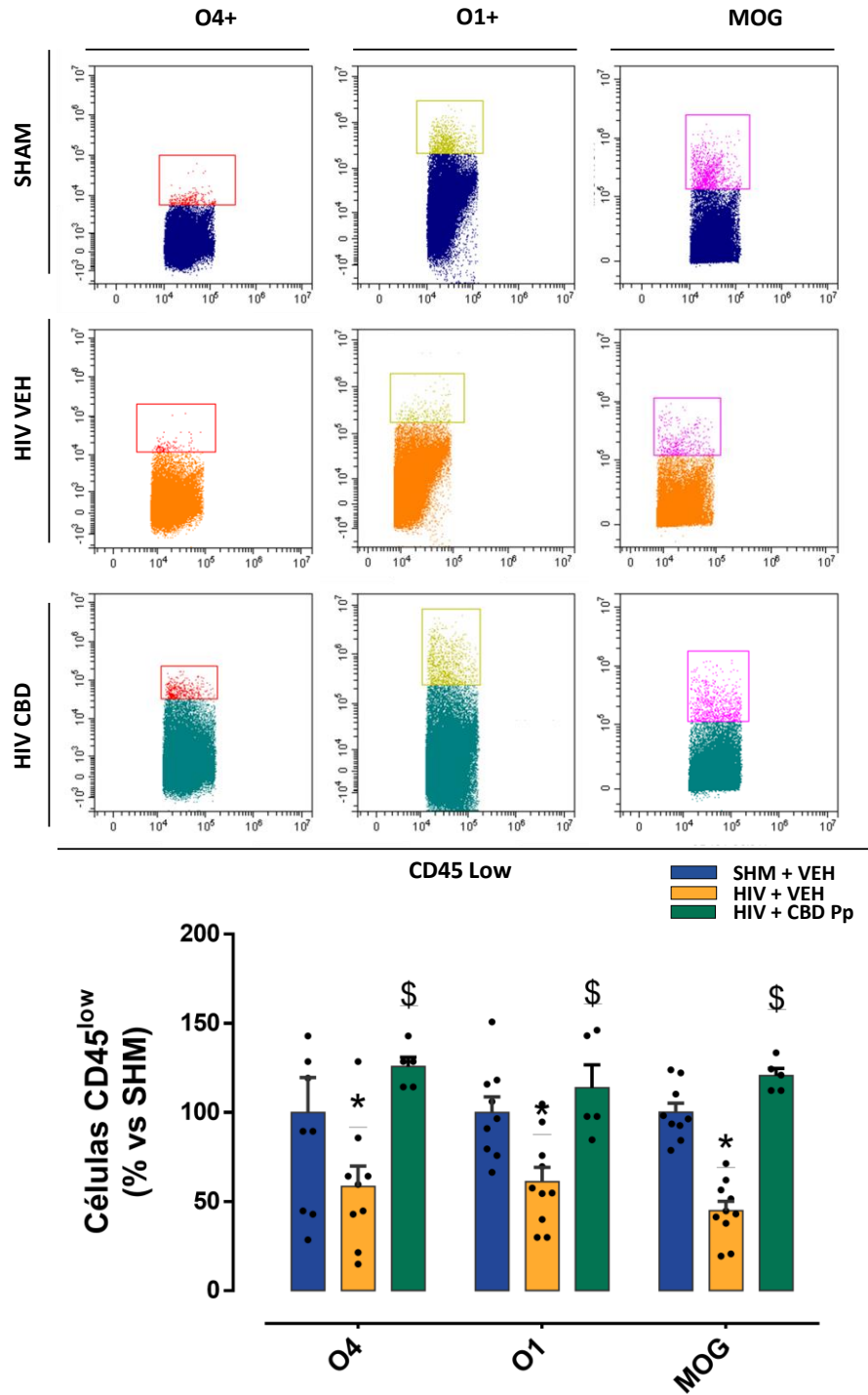
**Figura 92. Cambio en los niveles de expresión de marcadores inflamatorios a lo largo del tiempo.** Los animales tratados con CBD no muestran alteraciones en los niveles de expresión de ninguno de los marcadores analizados a lo largo del tiempo. **(A)** Niveles de expresión de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>low</sup>. **(B)** Niveles de expresión de células con marcaje CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>high</sup> entre ambos grupos **(C)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>Low</sup> **(D)** Ratio iNOS / Arg-1 de células CD11b<sup>+</sup> / CD45<sup>High</sup>. **(E)** Niveles de expresión de TLR-4 respecto de la proteína control β-actina. **(F)** Niveles de expresión de Nfk-B respecto de la proteína control Los datos representados son la media de cada grupo ± SEM con respecto a los controles. Se llevó a cabo un ANOVA de 2 vías seguido de un post-test de Bonferroni entre los distintos puntos temporales de cada mismo grupo. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (\* respecto a los animales HIV + VEH PND 6; § respecto a los animales HIV + VEH PND 14) (N=5-10)

que, como se ha comentado a lo largo de este punto, el CBD impidió el reclutamiento exacerbado de las células microgliales y preservó su fenotipo más reparador (M2) desde estadios muy tempranos de la enfermedad. Como consecuencia, los niveles de activación de los marcadores TLR-4 y Nfk-B siguieron la misma tendencia a lo largo de los puntos temporales (**Fig. 92 E y F**), es decir, se mantuvieron constantemente reducidos a lo largo de todo el desarrollo de la HIV.

Por lo tanto, podemos concluir que al menos parte del efecto neuroprotector del tratamiento con CBD de forma combinada se debió a su efecto temprano y mantenido sobre los principales mecanismos fisiopatológicos de la HIV.

### ***Efectos del CBD sobre el linaje oligodendroglial***

El último experimento que llevamos a cabo en este diseño experimental fue analizar el efecto del CBD administrado antes y después del daño sobre el linaje oligodendroglial. Previamente, habíamos establecido que en nuestro modelo animal, el daño en la SB observado a largo plazo se debía a un descenso en el número de precursores oligodendrogliales. Además, describimos cómo el tratamiento con CBD de forma combinada fue la única forma de tratamiento capaz de evitar la hipomielinización y daño en la SB presente en el modelo a largo plazo. En este sentido, estudiamos si este efecto terapéutico implicaba la preservación de los integrantes del linaje oligodendroglial desde estadios tempranos del neurodesarrollo. Como se indica en la **Fig. 93**, la densidad de células con marcaje O4, O1 y MOG (marcadores de pre-OI, oligodendrocito inmaduro y maduro, respectivamente) fue mayor que la observada en los animales lesionados tratados con vehículos y similar a la de los animales control. De esta forma, confirmamos que el efecto protector del CBD sobre el daño en la SB abarcaba las células en estadios muy tempranos del desarrollo.



**Figura 93. Análisis de la afectación del linaje oligodendroglial a medio plazo por CF.** El tratamiento con CBD previene la disminución de los integrantes del linaje oligodendroglial observada en los animales HIV tratados con VEH. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM con respecto a los controles. Se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=8-10)

En conclusión, el CBD es un fármaco con propiedades pleiotrópicas que presenta un efecto neuroprotector sobre la PCOH, aunque la forma y momento en el que se administra son esenciales a la hora de optimizar su efecto terapéutico. Así, la administración postlesional o prenatal de este fitocannabinoide de manera independiente no resultó completamente eficaz, siendo necesario combinar ambas formas de tratamiento con el objetivo de alcanzar el mayor potencial terapéutico del CBD y así prevenir las secuelas típicas de la HIV. De este modo, **el tratamiento con CBD de forma combinada tuvo un efecto neuroprotector sobre la PCOH** preservando la funcionalidad motora y el daño en la SB tanto a medio como a largo plazo. Este efecto se asoció a la modulación sobre el desarrollo de la lesión y los eventos fisiopatológicos desencadenados desde estadios muy tempranos.



The background features abstract, overlapping geometric shapes in various shades of blue, creating a dynamic and modern aesthetic. The shapes are primarily triangles and polygons, some solid and some semi-transparent, arranged in a way that suggests movement and depth. The colors range from a deep, rich blue to a lighter, almost white-blue, providing a sense of contrast and visual interest.

# **DISCUSIÓN**



La PCI es la discapacidad más grave y frecuente presente durante la niñez <sup>247</sup>. Uno de los principales problemas que impiden abordar de manera eficaz esta patología son los numerosos factores implicados <sup>248,249</sup>, entre los que destacan la **prematuridad y el BPN** <sup>35,248</sup>, ambos relacionados con la inmadurez del SNC <sup>250,251</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, tanto los PE como los EBPN son el grupo más vulnerable a sufrir ACVs como consecuencia de las condiciones extrauterinas <sup>2,104,252,253</sup>. En este sentido, la HIV es la principal causa de daño en la SB, y por tanto de desarrollar PC en este tipo de pacientes <sup>84,102</sup>. Desafortunadamente, los modelos experimentales publicados a día de hoy presentan innumerables limitaciones que impiden el correcto estudio de la fisiopatología en esta enfermedad <sup>174,254</sup>, e impiden la búsqueda de estrategias terapéuticas eficaces <sup>100,101,255</sup>. En este sentido, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un modelo animal más completo y fiable que ha permitido proponer al CBD como posible candidato a la hora de prevenir la PCOH en el PE. Por ello, en primer lugar, se discutirán los resultados obtenidos en el **Diseño experimental 1**, cuyo objetivo principal era reproducir de manera eficaz la fisiopatología de la HIV en el PE en un modelo animal.

### ***Desarrollo de un modelo animal de HIV***

La gravedad y las complicaciones asociadas a la HIV han impulsado el desarrollo de numerosos modelos animales, con el objetivo de comprender mejor las características neuropatológicas de la enfermedad y explorar nuevas opciones terapéuticas que permitan prevenir la PCOH en el PE <sup>98,241</sup>. Diferentes especies como conejos <sup>241,256</sup>, perros <sup>241,257</sup>, corderos <sup>241,258</sup>, ovejas <sup>241,259</sup> o cerdos <sup>241,260</sup> han sido utilizados con frecuencia para estudiar la PCOH, aunque, al igual que en la mayoría de las enfermedades, los roedores han resultado ser los animales más utilizados <sup>172,246</sup>. Las principales razones por las que se usan estos animales son que tanto su desarrollo cerebral <sup>238,241</sup>, su neuroanatomía <sup>241,261,262</sup>, así como los procesos de proliferación, diferenciación <sup>241,263-266</sup> o sinaptogénesis <sup>241,267-269</sup> han sido estudiados en profundidad, permitiendo establecer comparaciones muy fiables entre su SNC y el del ser humano. Además, las alteraciones en la MG <sup>241,265,266,270</sup> así como las consecuencias motoras y cognitivas observadas <sup>241,271-273</sup> han apoyado su validez como modelos para reproducir la HIV en el prematuro <sup>241,254,274</sup>. Desafortunadamente, estos modelos animales no están exentos de limitaciones y desventajas <sup>241</sup>, ya que tanto los modelos genéticos <sup>241,275</sup> como los inducidos mediante la administración intraventricular de glicerol <sup>241,276-278</sup> o de sangre autóloga <sup>79,279</sup> no logran reproducir eficazmente los efectos producidos por la rotura espontánea de los vasos que conforman la MG <sup>113,241</sup>. Por otro lado, se

han llevado a cabo ensayos mediante la inyección de la enzima *Colagenasa de Clostridium* en roedores de edad PND 7. En este caso, a pesar de producir la rotura espontánea de los vasos de la MG <sup>74,172,241,255</sup>, el estado evolutivo del SNC (y en particular de la SB) en estos animales no es el equivalente al de un PE <sup>241,280</sup>.

En este sentido, tomando como referencia el trabajo desarrollado por los grupos de Lekic <sup>74,172</sup> y Balasubramaniam <sup>281</sup>, decidimos inyectar paraventricularmente *Colagenasa de Clostridium* en ratas Wistar a la edad PND 1, cuyo estado madurativo de la SB era el equivalente al de un PE <sup>238</sup>. Al igual que en el modelo en el que se fundamenta nuestro trabajo, la inyección se realizó mediante la aguja Hamilton con el objetivo de minimizar los posibles efectos adversos producidos por el trauma <sup>74,172</sup>. Aun así, esto fue confirmado más adelante, ya que el grupo SHAM y el grupo NEEDLE (grupo al que se le administró paraventricularmente PBS 1X) no presentaron diferencias en ninguno de los parámetros estudiados.

Previamente al estudio de las consecuencias de la HIV producidas en nuestro modelo, realizamos una valoración general sobre el impacto que la lesión ejercía en la salud de los animales. Al igual que ocurre en pacientes <sup>282-284</sup>, la HIV aumentó la tasa de mortalidad principalmente durante la primera semana después del daño; sin embargo, al contrario de lo observado en pacientes <sup>285</sup>, los animales lesionados presentaban una menor ganancia de peso. Parte de esta situación puede deberse a que la ganancia de peso es un claro marcador de bienestar animal <sup>286</sup>, por lo que la HIV puede estar afectando a la salud del animal. Además, se ha demostrado como la DVPH, una de las principales complicaciones de la HIV <sup>254,287</sup>, altera el eje hipotálamo hipofisario y por tanto la liberación de hormonas relacionadas con el desarrollo y el crecimiento <sup>74</sup>. En este sentido, puede que la pérdida de peso sea consecuencia de las alteraciones producidas durante el desarrollo y no en el apetito o ingesta de alimentos <sup>288-290</sup>.

En cuanto al estudio de la hemorragia, dado que clásicamente se ha considerado la extensión de la lesión como un marcador fiable a la hora de pronosticar la gravedad de las secuelas <sup>90,291-293</sup>, decidimos categorizar a los animales en tres grupos: leve, moderado y grave. En contra de lo que ocurre en la clínica, no pudimos establecer el sistema de clasificación establecido por Papile, ya que los estudios de neuroimagen se realizaron por RM y no por ecografía craneal <sup>100,294,295</sup>. No obstante, observamos como la administración de 0,2U de *Colagenasa de Clostridium* producía un volumen de lesión variable similar a la distribución presente en el ser humano <sup>93,296</sup>, y que se mantenía a lo largo del tiempo. La persistencia de la hemorragia es algo que también sucede en humanos, probablemente debido a la alta tasa angiogénica que presenta la MG y a la vasculogénesis aberrante que se produce <sup>98,241,297</sup>. Tal es el punto, que un porcentaje muy

elevado de pacientes requieren de intervenciones y seguimientos a lo largo del tiempo con el objetivo de reducir los síntomas y complicaciones derivados de la lesión <sup>102,298,299</sup>. Por lo tanto, dado que la administración de esta enzima producía un volumen de sangrado variable, decidimos evaluar si en última instancia, se producía una afectación similar a la PCOH, y si esta dependía de la gravedad del daño.

Como pudimos observar, la puntuación obtenida en las pruebas de funcionalidad motora <sup>198,234</sup> indicaron que los animales lesionados presentaron una alteración en la coordinación similar a la descrita en pacientes <sup>91,300</sup>. Esta afección ya se había descrito anteriormente en otros modelos de HIV producidos por la inyección de sangre autóloga, en ratas PND 1 <sup>281</sup> y PND 7 <sup>254</sup>, pero nunca a esta edad al inyectar *Colagenasa de Clostridium* <sup>172</sup>. Además, a diferencia de otros modelos animales descritos <sup>254,281</sup>, la prueba del CRT nos indicó que nuestros animales también presentaron cierto grado hemiparesia, signo que también se ha observado en pacientes <sup>91,300</sup>.

A pesar de que la PCI es un trastorno de tipo motor, existen numerosas secuelas asociadas entre las que destaca el déficit cognitivo <sup>3,49,301-304</sup>. Por este motivo, adicionalmente realizamos un estudio más exhaustivo a este nivel. La prueba del NOR nos indicó que además de presentar un trastorno motor, los animales lesionados mostraron un deterioro de la memoria episódica <sup>199,200</sup>, secuela típica de pacientes con PCI <sup>305-307</sup>, y descrito en otros modelos desarrollados a PND 7, pero nunca a PND 1 <sup>237,254,281</sup>. Se piensa que este tipo de afección es resultado del desequilibrio en la función excitadora-inhibidora del hipocampo y otros procesos celulares <sup>304,308-310</sup>. En este sentido, al igual que se ha observado en pacientes y otros modelos animales <sup>92,172,241</sup>, la rotura de los vasos de la MG en ratas PND 1 indujo un trastorno motor y cognitivo permanente en el individuo. Sin embargo, descubrimos que en contra de lo sugerido en diversas investigaciones publicadas <sup>311,312</sup>, estas alteraciones fueron independientes del volumen de la HIV (**Fig. S8**). Este hecho va en consonancia con los estudios recientes llevados a cabo en pacientes, donde se afirma que la simple presencia de sangrado es factor suficiente para producir alteraciones motoras y cognitivas típicas del espectro de la PCI en el individuo <sup>89,296,313,314</sup>. Por lo tanto, parte de la validez de nuestro modelo animal reside en la capacidad para reproducir los resultados obtenidos en los recientes estudios clínicos, recalcando la necesidad de seguir y tratar a todos los PE que sufren HIV, con independencia del volumen de sangrado.

Parte de este seguimiento en los pacientes consiste en identificar las consecuencias neuroanatómicas producidas a largo plazo. En el caso de los pacientes con PCOH, la SB es la estructura más afectada <sup>102,315,316</sup> debido a la vulnerabilidad a este tipo de daño que presenta su precursor inmediato, el oligodendrocito <sup>241,317-319</sup>. A pesar de la validez de los diferentes modelos

a la hora de explicar el daño en la SB, no se ha detallado desde qué estadio madurativo comienza la alteración en el linaje oligodendroglial <sup>279,320–324</sup>. Por ello, pese a los avances en investigación y el desarrollo de nuevas técnicas de estudio <sup>325</sup>, en este trabajo se llevaron a cabo ensayos de CF e IHQ, ya que han demostrado ser una herramienta muy fiable para determinar la afectación del linaje oligodendroglial <sup>199,326</sup>. El descenso en la expresión de los marcadores O4, O1, MOG y en última instancia, MBP (marcadores de preoligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros, oligodendrocitos maduros y mielina, respectivamente <sup>2,327</sup>) en los animales lesionados indicaron que la afectación de la SB implicaba células pertenecientes a los estadios madurativos del desarrollo oligodendroglial <sup>2,327</sup>. De manera adicional, observamos como al igual que ocurre en pacientes y otros modelos preclínicos <sup>60,317,319,328</sup>, estos mismos sujetos presentaron un menor volumen hemisférico y del CC (ambos marcadores de daño de la SB <sup>329,330</sup>), que podían estar repercutiendo en la capacidad motora y cognitiva de los animales <sup>74,329,331,332</sup>. Aunque se han usado diferentes técnicas para estudiar la posible afección de la SB <sup>74,254,281</sup>, la utilizada en este estudio es sencilla, asequible y eficaz para detectar este daño a largo plazo. En cualquier modo, dado que la afectación de la SB tiene su origen en estadios muy tempranos del neurodesarrollo, era necesario identificar cuáles son los mecanismos implicados y si, al igual que ocurre en los resultados neuroconductuales, estos estuvieran influidos por el volumen del sangrado.

Como se ha explicado en la introducción, existen tres factores determinantes a la hora de explicar el origen de la HIV: la alteración del flujo sanguíneo cerebral; la fragilidad inherente de la MG; y la presencia de trastornos plaquetarios y de la coagulación <sup>74,80,333</sup>. Sin embargo, en este trabajo hemos podido demostrar cómo la **fragilidad de la MG es un factor suficiente para inducir la PCOH**. Parte de la debilidad de esta estructura se debe a la inmadurez de los integrantes que conforman la UNV y la BHE, estructura que representa la relación multicelular, estructural y funcional entre el cerebro y los vasos sanguíneos <sup>334,76,78,80,97,98,335,336</sup>. En este sentido, y basándonos en el efecto mostrado por la inyección de *Colagenasa de Chlostridium* sobre la lámina basal de la MG en otros modelos experimentales <sup>337</sup>, investigamos si la afectación de la BHE a corto plazo desencadenaba los diferentes mecanismos fisiopatológicos descritos en pacientes y otros modelos <sup>241,330,333,337–339</sup>.

Habitualmente, el estudio de la integridad y funcionalidad de la BHE se centra en la cuantificación de los niveles de expresión de sus componentes <sup>77,241,340–342</sup>, o en el estudio de la extravasación de colorantes orgánicos <sup>241,342,343</sup>. A pesar de su bajo coste y fácil manejo, estas técnicas presentan numerosas desventajas, ya que no permiten realizar un seguimiento de esta afectación a lo largo del tiempo, no aportan una resolución espacial y, en muchos casos, los

resultados pueden no ser del todo específicos<sup>342,344,345</sup>. En este sentido, de manera similar a otros estudios preclínicos<sup>77,241,340-342</sup>, evaluamos y localizamos espacialmente la alteración de la BHE a lo largo del desarrollo de la enfermedad. Esto se realizó mediante el agente de contraste Gd, compuesto con un alto perfil de seguridad utilizado durante décadas para el diagnóstico de diferentes trastornos neurovasculares<sup>346-348</sup>. Aunque se detectó un aumento del contraste en todo el cerebro, el Gd se acumuló especialmente en la corteza motora primaria, sensitiva o cingulada<sup>349</sup>, estructuras encargadas de la funcionalidad motora y cognitiva<sup>350-354</sup> y que *a priori* presentaban una menor fragilidad que la MG<sup>76,80</sup>. Estos datos indican que más allá del daño en la SB<sup>76,80,325</sup>, las secuelas observadas en nuestro modelo podían ser en parte secundarias a la afectación cortical, como se ha descrito en humanos y en otros modelos animales<sup>74,93,274,318,355</sup>.

Dado que el estudio de la BHE en los modelos preclínicos actuales es muy limitado<sup>342,344,345</sup>, decidimos evaluar si esto era debido a alteraciones estructurales o funcionales, determinando los niveles de expresión del receptor Mfsd2a y las UEs claudina-5 y ocludina<sup>97,340-342,356-360</sup>. La reducción de los niveles de Mfsd2a confirmó que parte de las secuelas<sup>361-364</sup> y de la hiperpermeabilidad observada en los estudios de neuroimagen era debido a una deficiencia en la formación y funcionamiento de la vía transcelular<sup>356,359,365,366</sup>. Por otro lado, los animales lesionados no presentaron niveles de expresión en las UEs similares a los publicados en otros modelos<sup>342,365</sup>. Esta discrepancia también existe en los estudios en pacientes<sup>80</sup>. Este fenómeno también fue descrito previamente en el grupo de la Dra. Vexler, donde se observó que la ocludina y la claudina-5 eran más resistentes al daño cerebral en la etapa neonatal que en la adulta<sup>341</sup>. No obstante, ya que es clara la estrecha relación existente entre el receptor Mfsd2a y las UEs<sup>359,363</sup>, no se puede descartar que el haber estudiado estos marcadores estructurales en etapas tan avanzadas de la enfermedad en nuestro modelo haya impedido identificar su posible alteración al inicio de la enfermedad<sup>342</sup>. De la misma forma, dado que estas proteínas presentan especialmente una función mecánica<sup>342,365,367</sup>, es posible que su cuantificación por WB no fuera lo suficientemente sensible para identificar el tipo de alteración que se produce<sup>363,368</sup>. En cualquier caso, se resalta el importante papel que tiene la vía transcelular sobre la permeabilidad de la BHE<sup>365,366</sup>, así como el importante rol del receptor Mfd2a.

A pesar de haber descrito la disfuncionalidad de la BHE a consecuencia de la inyección de *Colagenasa de Chlostridium*, no es fácil describir los mecanismos implicados<sup>172,244,342,369</sup>. Estudios en pacientes y en otros modelos animales han sugerido el importante papel del sistema inmune, ya que tanto la microglía como los macrófagos infiltrados se encuentran sobreexpresados durante el desarrollo de esta enfermedad<sup>330,337,370-372</sup>. Sin embargo, esto sólo se ha observado

en los casos graves en los que la hemorragia producía la dilatación de los ventrículos<sup>241,373,374</sup>. Curiosamente, en nuestro modelo no sólo observamos una elevada expresión de estas poblaciones en los animales con HIV graves<sup>375-378</sup>, sino que en contra de las investigaciones publicadas hasta el momento<sup>241,314,321,367,373,374</sup>, los casos más leves de HIV presentaron niveles de expresión similares a la de los animales que desarrollaron DVPH. Estos resultados están en consonancia con otros ya descritos en esta Tesis Doctoral, poniendo de manifiesto la importancia de los componentes de la sangre (incluso en los casos más leves) en la fisiopatología de la HIV, y concretamente en el daño en BHE y la activación del sistema inmune<sup>241,314</sup>.

A pesar de que los modelos preclínicos publicados hasta el momento han descrito elevados niveles de neuroinflamación, teniendo en cuenta la dualidad del sistema inmune decidimos estudiar si este ambiente era consecuencia de un estado proinflamatorio (M1) adoptado por las subpoblaciones de macrófagos y microglía<sup>241,379-386</sup>. En consonancia con los resultados de otros grupos de investigación, en nuestro modelo, la liberación de sangre induce un aumento en el ratio iNOS / Arg-1 de las células microgliales/macrofágicas, lo que corresponde a un fenotipo M1<sup>387-390</sup>. A su vez, los estudios bioquímicos sugirieron que una de las posibles vías por las que la sangre induce este cambio de fenotipo es mediante la sobreexpresión del receptor TLR-4<sup>241,391,392</sup>, receptor también presente en otras células gliales<sup>340,393</sup>. La relevancia de este receptor en la patología de la HIV ya ha sido descrito anteriormente en pacientes y otros modelos<sup>241,393-395</sup>, sin embargo nunca se había estudiado en aquellos basados en la inyección de *Colagenasa de Clostridium*<sup>172,241,396</sup>. Generalmente, en condiciones patológicas<sup>126,396-398</sup> la activación de la vía TLR-4 produce de manera inmediata la sobreexpresión y translocación al núcleo del factor NFκB<sup>340,399</sup>, cuya maquinaria induce la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios. Esto, a su vez promoverá la activación del propio receptor y por tanto el mantenimiento del fenotipo M1<sup>241,400-404</sup>. En nuestros animales lesionados, la activación de este factor indujo, al igual que en otros modelos<sup>241,398,405</sup>, un aumento mantenido de la enzima Cox-2, proteína responsable, entre otros, de la inflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad<sup>340,406,407</sup>. Del mismo modo, al igual que en otros modelos animales, la activación de TLR-4 también produjo a corto plazo la liberación de la CK proinflamatoria TNF-α<sup>255,340,395,396</sup>, molécula capaz de mantener la activación de esta vía proinflamatoria y por tanto del fenotipo M1 en las células del sistema inmune<sup>156,396,401,408,409</sup>. De manera adicional, observamos de forma inédita cómo, a pesar de ser también independiente del volumen de hemorragia, la inflamación presente en nuestro modelo correlacionaba con el desarrollo de las secuelas de la PCOH<sup>171,241,393</sup>, algo que ya se ha descrito en otras enfermedades pero nunca en un modelo de PCOH<sup>410,411</sup>. Del mismo modo, descubrimos que al igual que en otras patologías<sup>412,413</sup>, la liberación de TNF-α promovía de forma directa el

daño y disfuncionalidad de la BHE <sup>414,415</sup>, al promover el aumento de MMP-9 <sup>412,416</sup> y la pérdida en los niveles del receptor Mfsd2a <sup>413,417</sup>. Por otro lado, quisimos determinar el papel del astrocito, estirpe celular más numerosa del SNC que se encarga de la homeostasis y mantenimiento de la BHE <sup>79,149</sup>. El aumento de los niveles del metabolito Mioinositol en la corteza somatosensorial de los animales lesionados confirmó que, al igual que en otros modelos animales <sup>241,246</sup>, durante la HIV se produce una afectación de la función y/o actividad astrocítica <sup>199,418</sup>, que podría estar involucrada en la infiltración leucocitaria <sup>419</sup>, la inducción de los eventos fisiopatológicos <sup>106,330</sup>, y la hipomielinización y el daño en la SB <sup>243,420</sup> presentes en la PCOH.

Desafortunadamente, a excepción investigaciones muy reducidas <sup>421,422</sup>, la mayor parte de los modelos animales de HIV se han centrado en el papel deletéreo de la inflamación sobre la SB <sup>74,241,255</sup>, obviando la relevancia de otros procesos fisiopatológicos como el estrés oxidativo, evento de gran magnitud en el PE debido a la inmadurez de sus defensas antioxidantes <sup>96,423,424</sup>. Al igual que en estos trabajos donde se inyectó hemoglobina intraventricularmente, nuestros animales lesionados presentaron unos niveles de proteínas oxidadas significativamente mayores que los controles. Este resultado nos indica que, independientemente de si se produce directamente por la liberación de los productos de la lisis eritrocitaria <sup>346,394,419,421,422,425</sup> o por la inflamación y aumento de infiltrados <sup>426</sup>, se ha demostrado por vez primera cómo en un modelo animal de HIV basado en la inyección de *Colagenasa de Chlostridium* el estrés oxidativo también está implicado en el daño neurológico, y viceversa <sup>154,424,426</sup>. Del mismo modo, la activación glutamatérgica del oligodendrocito <sup>67,256</sup> inducida por la gliosis, la liberación de componentes sanguíneos y los episodios hipóxicos inducidos por el sangrado <sup>172,427,428</sup> provocan un aumento de la excitotoxicidad, de la misma forma que en otros modelos de daño cerebral neonatal desarrollados en nuestro laboratorio <sup>199,228,229</sup>. La acumulación exacerbada de este metabolito podría estar contribuyendo al daño de la SB promoviendo la formación de hierro libre <sup>2,429</sup>, y aumentando la inmunorreactividad microglial y el daño en la BHE al aumentar la liberación de CKs <sup>430</sup> y alterar los niveles de las UEs <sup>431</sup> respectivamente. Finalmente, se confirmó el daño producido a corto plazo midiendo los niveles de Lac / NAA, marcador previamente utilizado en pacientes con esta <sup>432</sup> y otras patologías infantiles similares por su validez a la hora de pronosticar la gravedad de las secuelas <sup>200,204,433,434</sup>. Los niveles bajos de NAA está relacionado con una menor densidad y viabilidad axonal, posiblemente a consecuencia de la alteración en la maduración oligodendroglial <sup>435-438</sup>. A su vez, el aumento de Lactato observado es atribuible a un deterioro mitocondrial y del metabolismo oxidativo <sup>434,435,439</sup>, o a una elevación en la tasa glucolítica consecuencia de la microgliosis producida <sup>435,440</sup>. En este sentido, por primera vez el aumento en los niveles de Lac / NAA a corto plazo es validado como marcador de daño en un

modelo animal de PCOH en el PE <sup>241,367</sup>. De este modo, nuestro modelo animal describe por primera vez la posible interacción a corto plazo de los principales mecanismos fisiopatológicos presentes en la PCOH en humanos <sup>74,171,241,255</sup>. Este resultado pone en evidencia de nuevo el importante papel del sangrado en el inicio de estos mecanismos, ya que como se ha descrito en las últimas investigaciones realizadas en pacientes, incluso los casos más leves son susceptibles de sufrir un daño neurológico capaz de producir PC <sup>89,296,313,314</sup>.

A continuación, dado que el estudio de los eventos fisiopatológicos en los distintos modelos se focaliza en los primeros estadios de la enfermedad <sup>96,441,442</sup>, decidimos evaluar si estos se mantenían a lo largo del tiempo. A medio plazo, los ensayos de RM demostraron que la hiperpermeabilidad de la BHE se reducía, limitándose concretamente a la zona talámica, posiblemente como consecuencia de la atrofia producida en el 3º y 4º ventrículo <sup>260,320,443</sup>. Parte de este fenómeno, ampliamente descrito en pacientes y otros modelos <sup>154,338,444,445</sup>, se produce como consecuencia de la sobreproducción y alteración del LCR en estas cavidades a causa de la inflamación <sup>61,241,274,333,445,446</sup>. A su vez, como se ha descrito anteriormente, la importante función que presenta la región hipotalámica en el sistema neuroendocrino apoya la idea de que parte de la pérdida de peso observada en nuestros animales lesionados se debiera a la liberación aberrante de hormonas relacionadas con el desarrollo <sup>74</sup>.

La recuperación total de la integridad de la BHE a lo largo del tiempo se confirmó al observarse un menor porcentaje de infiltrados y un aumento en la expresión del receptor Mfsd2a, siendo ambos marcadores de funcionalidad en esta estructura a largo plazo <sup>341,357,358,441</sup>. A pesar de que diversos modelos experimentales de HIV han descrito un descenso en la microgliosis <sup>99,241,447</sup> y una recuperación espontánea de la BHE <sup>448,449</sup>, la persistencia del fenotipo M1 en los macrófagos y microglía en nuestros resultados precisó de un análisis adicional de la expresión de los mediadores proinflamatorios durante el resto de los puntos temporales. El descenso en la liberación de TNF- $\alpha$  observada cuestionó el papel de esta CK en la fisiopatología de la HIV. Previamente, otros modelos de HIV han demostrado que a partir de las 72 h el efecto agudo de la sangre comienza a desaparecer, produciéndose entre otras cosas la reabsorción de la misma <sup>444</sup> y por tanto un decremento en la liberación de CKs proinflamatorias como TNF- $\alpha$  <sup>375,396</sup>. A su vez, el descenso de este mediador ha demostrado estar involucrado en la reducción de la microgliosis <sup>396,403,408</sup>, en el cambio de fenotipo hacia el M2 <sup>375,402,403,450</sup>, y en la recuperación de la BHE al aumentar entre otros elementos la expresión del receptor Mfsd2a <sup>357,360,417</sup>. En este sentido, la ausencia de TNF- $\alpha$  promueve la recuperación de la BHE mediante la liberación de factores tróficos como IL-10 o TFG- $\beta$ 1 por parte de las células inmunológicas, que cambian su

fenotipo de activación hacia uno reparador <sup>419</sup>, mediante la expresión de proteínas como el receptor Mfsd2a, encargado del correcto funcionamiento de la vía transcelular y de la formación y mantenimiento de la BHE a través de la interacción de los integrantes de la UNV <sup>366,368,409</sup>.

Sin embargo, en contra de lo esperado, a pesar de observarse una reducción en la microgliosis y recuperación de la BHE, no observamos un descenso del marcador de daño MMP-9 <sup>341,389,412,416</sup> a largo plazo. Adicionalmente a la estrecha relación existente entre TNF- $\alpha$  y MMP-9 en este y otros modelos <sup>341,389,412,416</sup>, se ha demostrado cómo la activación de TLR-4 y NFK-B aumentan la liberación de esta metaloproteasa <sup>404,451-454</sup>. Existen múltiples razones por las que, a pesar de observarse una mejora en la funcionalidad de la BHE, la expresión de esta proteína podría encontrarse elevada. En primer lugar, a pesar de asociarse la vía TLR-4 como uno de los principales responsables del aumento de la neuroinflamación, se ha descrito que después de un daño isquémico, microglía y macrófagos promueven la neurogénesis y la recuperación del daño mediante la liberación de factores tróficos como BDNF o la regulación de vías de señalización implicadas en el desarrollo de la UNV como Notch o Wnt /  $\beta$ -catenina <sup>455-462</sup>. Por otro lado, se ha demostrado como la proteína MMP-9 no siempre tiene una funcionalidad lesiva sobre la BHE, sino que en ocasiones es capaz de proteger a la célula del daño del ADN producido entre otros eventos por el estrés oxidativo, y de regular la correcta proliferación de células endoteliales <sup>463,464</sup>. En este sentido, es atractiva la hipótesis de que la activación mantenida de la vía de TLR-4 pudiera implicar una actividad neuroreparadora en la que se incluya entre otros la liberación de esta metaloproteasa. Sin embargo, habría que confirmarlo con pruebas adicionales.

Por último, probablemente como consecuencia de la reducción en la microgliosis, a largo plazo se observa un descenso en los niveles de GFAP <sup>79,92,465</sup>. El descenso en la inmunorreactividad astrocitaria confirma no solo la atenuación en el daño producido a largo plazo, si no el importante papel que puede estar teniendo esta célula sobre la fisiopatología de la HIV <sup>96,244,395,465</sup>. De manera general, los tratamientos y los estudios de esta enfermedad se han focalizado en el efecto de la microglía y neutrófilos <sup>237,241,441</sup>, obviando el importante papel que presenta esta célula en otras patologías similares <sup>198,200,233,243</sup>. En este sentido, la estabilidad de los niveles astrocitarios no solo puede estar favoreciendo la recuperación de la BHE indirectamente actuando sobre la inflamación <sup>92,465</sup>, de estrés oxidativo <sup>65,243</sup> y excitotoxicidad <sup>198,466</sup>, sino que también pueden mantener la estabilidad de esta mediante la liberación de factores tróficos <sup>420</sup> o promoviendo la interacción de los integrantes de la UNV <sup>96,244,420</sup>.

En conclusión, los resultados obtenidos en el **Diseño Experimental 1** nos ha permitido confirmar la utilidad de un modelo animal que, por primera vez, **reproduce de manera eficaz gran parte**

de los mecanismos fisiopatológicos presentes en la HIV en el PE. Así, la inyección paraventricular de *Colagenasa de Clostridium* en ratas PND 1 produjo un daño neurológico en el que la glía intervino activamente en la aparición de una serie de consecuencias anatómicas y secuelas similares a la observada en los pacientes. De manera novedosa y acorde con estudios clínicos recientes, hemos descrito que el daño cerebral, así como el déficit funcional no son dependientes del volumen de la hemorragia, ya que los casos más leves también desarrollaron una alteración neurológica. A su vez, se ha descrito cómo el daño principal sucede durante los primeros estadios de la enfermedad, a partir de la cual se inician los mecanismos de neuroprotección endógenos. Por todo ello, se ha validado la eficacia de este modelo a la hora de estudiar la PCOH así como la necesidad de iniciar los tratamientos durante las primeras horas de daño.

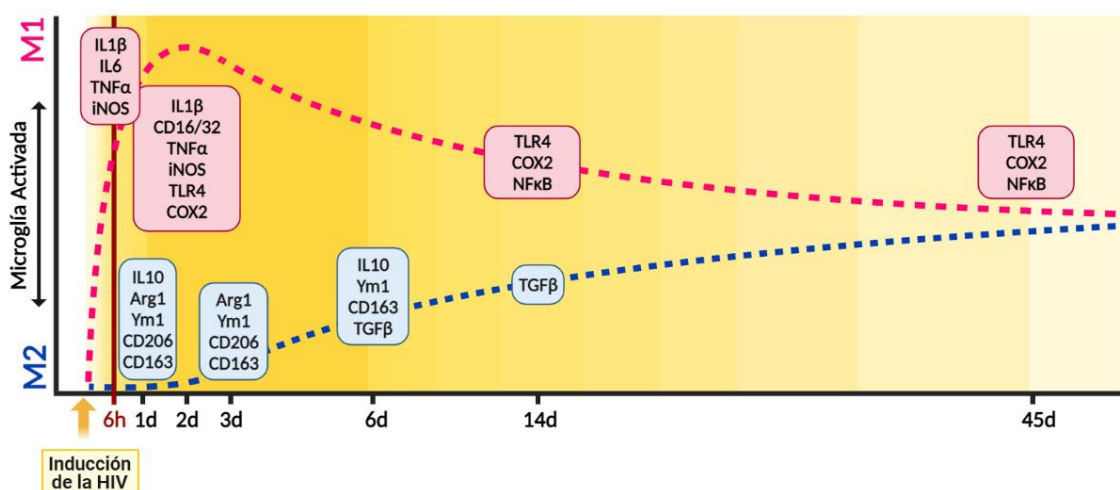


Figura 94. Esquema representativo del desarrollo del daño inflamatorio en la HIV. Adaptado de Lan. et al 2017

### Efecto terapéutico del CBD

Como se ha explicado a lo largo de este trabajo, la ausencia de un modelo y de un tratamiento efectivo es un hándicap a la hora de prevenir la PCOH en el PE <sup>80,102,442</sup>. Diversos fármacos como la indometacina, el ibuprofeno o los esteroides han sido utilizados con el objetivo de prevenir las secuelas relacionadas con el sangrado <sup>87,100,467</sup>; sin embargo, esto no sólo ha resultado insuficiente, sino que en muchos casos los efectos secundarios producidos han empeorado el pronóstico del paciente <sup>87,100,467</sup>. Del mismo modo, de entre todas las complicaciones producidas, la que mayor atención ha suscitado es la DVPH <sup>315,468,469</sup>. Los intentos por reducir la sobreproducción de LCR <sup>315,468,469</sup>, como las terapias basadas en el drenaje han conseguido

reducir el volumen de la HC, pero no las secuelas y el daño producidos<sup>315,468,469</sup>. Además, gracias a los resultados obtenidos en investigaciones preclínicas, se han propuesto nuevas terapias como la inyección de hialuronidasa<sup>324</sup> o células mesenquimales<sup>279</sup>; sin embargo estos tratamientos no sólo han demostrado tener un potencial limitado, sino que no se ha utilizado en un modelo animal de inyección de *Colagenasa de Clostridium* ni en animales cuyo daño se produjo a PND 1<sup>279,324</sup>. En estos estudios, en consonancia con lo demostrado en este trabajo, los casos más leves presentaban un daño neurológico similar a la de los grados más severos. A su vez, estos resultados recalcan la necesidad de actuar antes, durante y después del daño, con el objetivo de aumentar la resistencia de la MG y prevenir o reducir los procesos fisiopatológicos que se desencadenan a consecuencia del sangrado<sup>87,100,315,467-469</sup>.

El CBD se ha postulado como un posible candidato terapéutico a la hora de prevenir la PCOH. Como se ha descrito anteriormente, el CBD es uno de los principales componentes de la *Cannabis sativa* y ha sido utilizado como opción terapéutica en patologías de diversa índole<sup>175,179,470,471</sup>. En el caso de las enfermedades cerebrales neonatales, los hallazgos de nuestro grupo de investigación han demostrado el importante papel de este fármaco en otros modelos animales de hipoxia-isquemia cerebral difusa<sup>199,228,233,472-474</sup> y *stroke*<sup>198</sup>, enfermedades cuya fisiopatología resulta similar a la descrita en nuestro modelo<sup>198,233,473</sup>. En este sentido, los resultados han sido tan prometedores que, actualmente este fármaco se encuentra en fase de ensayos clínicos (GWEP1560; EudraCT: 2016-000936-17). Por otro lado, la implicación del receptor CB<sub>2</sub><sup>245</sup> por parte de este fitocannabinoide reduce el daño en otros modelos de HIV en ratas PND 7<sup>475</sup>. Además, en modelos adultos de HIC el CBD reduce su gravedad mediante la desactivación del factor Nfκ-B y la modulación del receptor 5HT-1A, receptor también implicado en los sistemas de protección endógenos en modelos EHI<sup>476,477</sup>. Por todo ello, este fitocannabinoide se postuló como una estrategia muy prometedora para evitar el desarrollo de la PCOH.

Al igual que en el apartado anterior, utilizamos los datos de la mortalidad y la ganancia de peso para determinar el posible papel del CBD sobre la calidad de vida de los animales lesionados<sup>286</sup>. Estos resultados confirmaron el alto perfil de seguridad del CBD, así como la ausencia de efectos secundarios en el hábito alimenticio o el tránsito gastrointestinal<sup>478-483</sup>. Dado que la diferencia de peso empieza a ser evidente a partir de las primeras 72 h de vida, el efecto del CBD sobre el peso del individuo podría ser debido a un efecto protector sobre los procesos fisiopatológicos desarrollados durante esa etapa<sup>154,396,444,484</sup>. Es interesante suponer que las propiedades antiinflamatorias del CBD que se describirán más adelante, estuvieran evitando la sobreproducción de LCR en el 3º ventrículo y por tanto el desarrollo de DVPH, complicación que

puede producir alteraciones en el crecimiento y a nivel neuroendocrino <sup>154,396,444,484</sup>. En este sentido, como se ha descrito en otros modelos de PCI, administrar CBD durante las primeras etapas del daño sería muy positivo para prevenir las alteraciones en el desarrollo <sup>198,199,228,474</sup>.

El tratamiento postlesional con CBD redujo las secuelas motoras y cognitivas de la hemorragia a medio y largo plazo. El CBD ejerce un efecto beneficioso similar en otros modelos de daño cerebral con un importante componente inflamatorio <sup>199,228,233,235,471,473</sup>, lo que sugiere que el efecto antiinflamatorio observado en nuestro modelo de HIV pueda ser la base del efecto beneficioso del CBD. Este resultado refuerza la estrecha relación entre la inflamación y las secuelas producidas por la HIV que observamos en el Diseño Experimental 1, donde se demostró que una mejor puntuación en las pruebas del NOR y CRT correlacionaba con menores niveles de TLR-4, Cox-2 y Nfk-B. Los mecanismos de inhibición de la vía de TLR-4 por parte del CBD son múltiples <sup>478,485-488</sup>, destacando su acción sobre los receptores PPAR <sup>489-491</sup> y Nfr2 <sup>492-494</sup>. Entre otros mecanismos, la actividad de estos elementos impide la translocación al núcleo del factor Nfk-B y por tanto la activación de la maquinaria de síntesis de mediadores citotóxicos <sup>340,495-498</sup>. A su vez, cuanto mayor es la duración del tratamiento con CBD, más estable es su actividad antiinflamatoria y su efecto beneficioso sobre el pronóstico de la enfermedad <sup>471,499-501</sup>. A este respecto, nuestros resultados sugieren que la mejora en los resultados por parte de los animales que fueron tratados durante 3 días en comparación con aquellos que recibieron una única dosis se debía, al menos en parte, al mantenimiento de su efecto antiinflamatorio durante un mayor tiempo <sup>470,501</sup>. Por otra parte, procesos fisiopatológicos como la inflamación o el estrés oxidativo inducen la activación del factor VGEF <sup>502-505</sup>, factor determinante durante la angiogénesis <sup>335,503,505,506</sup>. Por tanto, a pesar de que se desconocen los mecanismos exactos por los que el CBD ejerce su función angiogénica en otras patologías <sup>190,221,507-509</sup>, los efectos antiinflamatorios y antioxidantes observados tras el tratamiento con CBD podría haber tenido un efecto modulante de la expresión de VGEF, controlando así la angiogénesis desordenada y por tanto la formación de vasos frágiles que perpetuarían la rotura de vasos en la MG y con ello la hemorragia <sup>229,510</sup>. Sin embargo, habría que confirmarlo con estudios adicionales. De este modo, la reducción del volumen de la hemorragia a corto y largo plazo observada tras el tratamiento con CBD podría deberse al menos en parte a su efecto sobre la angiogénesis <sup>190,221,507-509</sup>.

Por otro lado, en el caso del CBD administrado postlesionalmente, la ausencia de una reducción en el daño de la SB según se refleja tanto por el volumen hemisférico como del CC, abre el interrogante sobre cómo explicar que el CBD mejora la funcionalidad, pero no preservara la integridad de la SB, ya que existe una estrecha relación entre esta estructura y las secuelas producidas por la lesión <sup>199,241,511,512</sup>. Nuestro grupo ha descrito que parte del efecto protector

del CBD sobre las secuelas del daño cerebral hipóxico-isquémico neonatal se debe a la preservación de la maduración oligodendroglial más que la de su supervivencia <sup>198,199</sup>. Este efecto es importante, ya que es conocido que los pacientes con PCOH no sólo tienen un menor volumen de mielina en el cerebro, sino también un mayor porcentaje de células oligodendrogliales inmaduras a largo plazo <sup>274,328,335,512</sup>; es decir, presentan un menor número de células de este linaje y más inmaduras que la población sana <sup>274,328,335,512</sup>. Así, al igual que en otros modelos de hipoxia-isquemia en los que el CBD se administra después del daño, aunque el CBD fuera capaz de evitar la mortalidad de los precursores oligodendrogliales, sus propiedades neuroprotectoras le permitieron preservar la maduración oligodendroglial <sup>199,228,510</sup>, de forma que a largo plazo los animales presentaron un menor porcentaje de mielina, pero con un grado de madurez y funcionalidad intacto.

No obstante, los resultados fueron diferentes cuando el CBD se administró prenatalmente. Generalmente, el estudio del efecto del *Cannabis* durante el embarazo ha obviado las propiedades neuroprotectoras del CBD <sup>510</sup>, focalizándose principalmente en el efecto deletéreo del THC sobre el feto <sup>513,514</sup>. En este sentido, aunque se ha demostrado el efecto terapéutico de este fitocannabinoide administrado durante el periodo gestacional en patologías neuroendocrinas <sup>515</sup> o gastrointestinales <sup>513</sup>, no se ha cuantificado la concentración que alcanza el CBD en el organismo de las crías. En primer lugar, nuestros resultados confirmaron que, al igual que otros cannabinoides, el CBD era capaz de atravesar la barrera placentaria <sup>516</sup>. Aunque la dosis administrada en nuestro estudio, 10 mg/kg, fuera tres veces menor que la utilizada en los estudios previos, 30 mg/kg <sup>513,515</sup>, la concentración de CBD en el cerebro fetal alcanzó niveles considerados como neuroprotectores en otros modelos de daño cerebral neonatal <sup>228,233,473</sup>. Los mecanismos por los que el CBD es capaz de atravesar la barrera placentaria son aún desconocidos <sup>516</sup>; sin embargo, los ensayos *in vitro* realizados en el grupo la Dra. Fehinsein han demostrado que parte de este efecto era debido a la alteración de la Proteína de resistencia al cáncer de mama y la Glicoproteína P <sup>516-518</sup>. Ambos marcadores han demostrado tener un importante papel en el correcto desarrollo del embrión, ya que no solo regulan el correcto flujo de sustancias entre la madre y el feto, sino que también han probado presentar una potente función antiapoptótica <sup>516-518</sup>. Estos resultados podrían sugerir que, en contra de lo deseado, el CBD pudiera ejercer un efecto nocivo sobre el feto <sup>516-518</sup>. Sin embargo, no es el caso, ya que además de que a concentraciones reducidas los efectos adversos del CBD son inapreciables <sup>516-518</sup>, el riesgo disminuye a medida que aumenta la etapa del embarazo, de forma que cuando su administración ocurre durante el último trimestre de gestación el peligro sería nulo <sup>516-518</sup>. Este hecho se confirmó al comparar los resultados obtenidos entre los controles tratados

prenatalmente con CBD o con VEH (**Fig. S7**), así como el peso inicial y la ganancia de este por parte de los animales lesionados, donde observamos que el tratamiento con CBD en ratas a E21 no alteró el desarrollo normal del feto.

El hallazgo de que la administración prenatal de CBD tenga un efecto protector sobre la afectación de la SB, aunque las alteraciones neuroconductuales fueran similares a las observadas postlesionalmente, sugiere un proceso temporal en los efectos del CBD interesante. En roedores, al igual que en humanos la maduración oligodendroglial durante las primeras horas de vida se produce a alta velocidad, de forma que en cuestión de 5 días los progenitores oligodendrogliales alcanzan el estadio de OL<sup>327,519-523</sup>. Por ello, un efecto protector en fases muy precoces tras la hemorragia sería crucial para preservar la correcta maduración y supervivencia del oligodendrocito<sup>199,328,510</sup>. El CBD dura alrededor de 40 h en el organismo<sup>199,328,510</sup>, lo que explica que siga siendo detectable en el cerebro inmaduro hasta 37 h después de su administración tras un episodio hipóxico-isquémico<sup>474,510</sup>. De este modo, el CBD administrado prenatalmente en el último día de gestación estaría presente en el cerebro de las crías de rata durante la aparición de los primeros procesos fisiopatológico tras la inducción de la HIV, que se realizó en las primeras 24 h de vida. De este modo, el tratamiento estaría protegiendo así la supervivencia de las células más vulnerables, los oligodendrocitos inmaduros<sup>67,240,524,525</sup>, y por tanto reduciendo la lesión de la SB. Se ha descrito y demostrado en este y otros modelos la importancia de los procesos desencadenados por los componentes de la sangre extravasada en la fisiopatología de la HIV<sup>99,241,328</sup>, por lo que reducir el desarrollo del sangrado es fundamental para prevenir las complicaciones y secuelas de esta enfermedad<sup>62,102,355</sup>. Estos procesos se desarrollan de forma más tardía tras la HIV, momento en el que el CBD administrado prenatalmente ya no se encontraría en concentración suficiente en el cerebro. Esto explicaría por qué la administración combinada de CBD prenatal y postlesional mostró unos resultados óptimos en cuanto a rendimiento funcional y reducción del daño de SB a medio y largo plazo. En esta combinación, el CBD iniciaría su efecto en los primeros momentos tras el sangrado protegiendo así a los precursores oligodendrogliales, para posteriormente modular la progresión del sangrado y de los procesos fisiopatológicos subsecuentes.

### ***Posibles mecanismos de acción del CBD***

Así pues, el estudio de los mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores del CBD se realizó en animales que recibieron el CBD prenatal y postlesionalmente, ya que fue la forma de

administración con mejor resultado. El tratamiento con CBD invirtió los eventos fisiopatológicos descritos en el **Diseño experimental 1**, reduciendo la expresión glial y promoviendo el cambio de su fenotipo hacia M2<sup>526-528</sup>. El CBD es un conocido agonista del receptor PPAR- $\gamma$ , cuya activación inhibe la vía de TLR-4 / Nfk-B<sup>340,497</sup> e impulsa la liberación de factores antiinflamatorios como las ILs- 13, 10 y 4, promoviendo finalmente un fenotipo M2 en la microglía<sup>529,530</sup>. Recientemente, se ha descrito que el fenotipo M2 puede variar según la función que realiza<sup>529,530</sup>. El marcador de Arg-1 generalmente se ha asociado a un fenotipo M2a o antiinflamatorio<sup>529,530</sup> el cual induce la liberación masiva de CKs y mediadores antiinflamatorios con el objetivo de combatir el daño producido<sup>529,530</sup>. Los resultados de los estudios de CF confirmaron que el CBD estimuló la derivación de microglía/macrófagos hacia este fenotipo celular. Por otra parte, los fenotipos M2b y M2c han demostrado tener una función antioxidante y remodeladora, respectivamente<sup>529,530</sup>. Ya que la función del CBD es protectora y no reparadora<sup>433,510,531,532</sup>, es poco probable que el CBD promoviera la transformación hacia M2c; sin embargo, dado que observamos un descenso en los niveles de proteínas oxidadas a corto plazo, es más probable que sí se activara la transformación de las células del sistema inmune hacia el fenotipo el M2b<sup>529,530</sup>. De este modo, el tratamiento combinado con CBD favoreció la persistencia de un ambiente antiinflamatorio durante un tiempo suficiente como para evitar el daño en la BHE y en la SB<sup>199,474,510</sup>, de forma similar a lo descrito en otros modelos de daño cerebral neonatal agudo de tipo isquémico<sup>199,474,510</sup>.

Del mismo modo, anteriormente afirmamos que uno de los factores más importantes a la hora de explicar la HIV y su desarrollo era la fragilidad de la MG<sup>241,317,323,330</sup>. El hecho de que la administración prenatal y postlesional condujera a mejores resultados sobre la reducción de la HIV que la sola administración postlesional sugiere un efecto protector del CBD sobre la MG desde el momento en el que se administra *Colagenasa de Chlostridium*. Así, el tratamiento con CBD preservó la supervivencia y expresión de factores de especial relevancia como el receptor Mfsd2a, lo que puede atribuirse a sus efectos antiinflamatorios o la activación de otros receptores diana como GPR55<sup>417,533,534</sup>. Igualmente, el CBD redujo los niveles de mediadores de daño de BHE como la metaloproteasa MMP-9, lo que también puede atribuirse a los efectos del CBD sobre la liberación de TNF- $\alpha$ <sup>416,452</sup> a consecuencia de la promoción del fenotipo microglial neuroprotector<sup>199,510</sup>. El efecto protector sobre la MG y la integridad de la BHE se confirmó mediante los análisis de neuroimagen, donde el CBD redujo la extravasación de Gd, reflejo de un efecto modulador en la hiperpermeabilidad de la BHE descrita en la HIV<sup>202,535,536</sup>.

Las dianas por las que el CBD protege y mantiene la BHE en presencia de un daño cerebral son múltiples. Por ejemplo, en un modelo de Esclerosis Múltiple se ha demostrado que el

tratamiento con CBD reduce el daño en la BHE al reducir los niveles de las quemoquinas CCL-2 y CCL-5 o los niveles de los mediadores de daño IL-1 $\beta$  y V-CAM asociado al descenso en la microgliosis a través de la activación del receptor de Adenosina 2 <sup>536,537</sup>. Del mismo modo, ensayos *in vitro* han demostrado cómo el CBD aumenta el “efecto barrera” en la BHE al inducir la proliferación y migración microtubular y aumentar la resistencia transendotelial mediante la modulación de los receptores PPAR- $\gamma$  y 5-HT1A <sup>536,538,539</sup>. Asimismo, los ensayos de microscopía intravital han demostrado cómo el CBD era capaz de inhibir la dilatación de los vasos y la infiltración leucocitaria en presencia de un estímulo inflamatorio al reducir los niveles TNF- $\alpha$ , Cox-2 e iNOS <sup>231,536</sup>. Por otro lado, el CBD modula la expresión y liberación proteica del mediador antiinflamatorio TGF- $\beta$ 1 de manera dosis dependiente mediante la liberación de IL-10 o la activación de los linfocitos T <sup>540-543</sup>. En este sentido, a pesar de considerarse una CK antiinflamatoria, se ha descubierto que una sobreproducción de IL-10 no solo impide el correcto funcionamiento de la BHE <sup>544-547</sup>, sino que su liberación de diversas estirpes celulares como los precursores oligodendrogiales o macrófagos promueve la acumulación de LCR y el desarrollo de DVPH mediante la sobreproducción de fibroblastos <sup>80,93,160,548,549</sup>. Es atractivo hipotetizar que el tratamiento combinado antes y después del daño conduciría a unas concentraciones cerebrales de CBD suficientemente elevadas como para reducir la liberación de este factor y por tanto el volumen de sangrado, la DVPH y el volumen de daño a largo plazo, mientras que las otras modalidades de tratamiento resultarían en concentraciones cerebrales más reducidas que no evitarían el proceso tan eficazmente <sup>540-543</sup>. En resumen, la liberación de factores antiinflamatorios por parte del CBD mediante la activación de sistemas de defensa endógenos (como el receptor PPAR o de Adenosina -2 <sup>111,396</sup>) que se encuentran activados en la HIV, junto con el descenso de los niveles de producción de elementos dañinos <sup>540-543</sup>, serían mecanismos plausibles por los que el CBD evitaría el daño en la BHE y el volumen de sangrado.

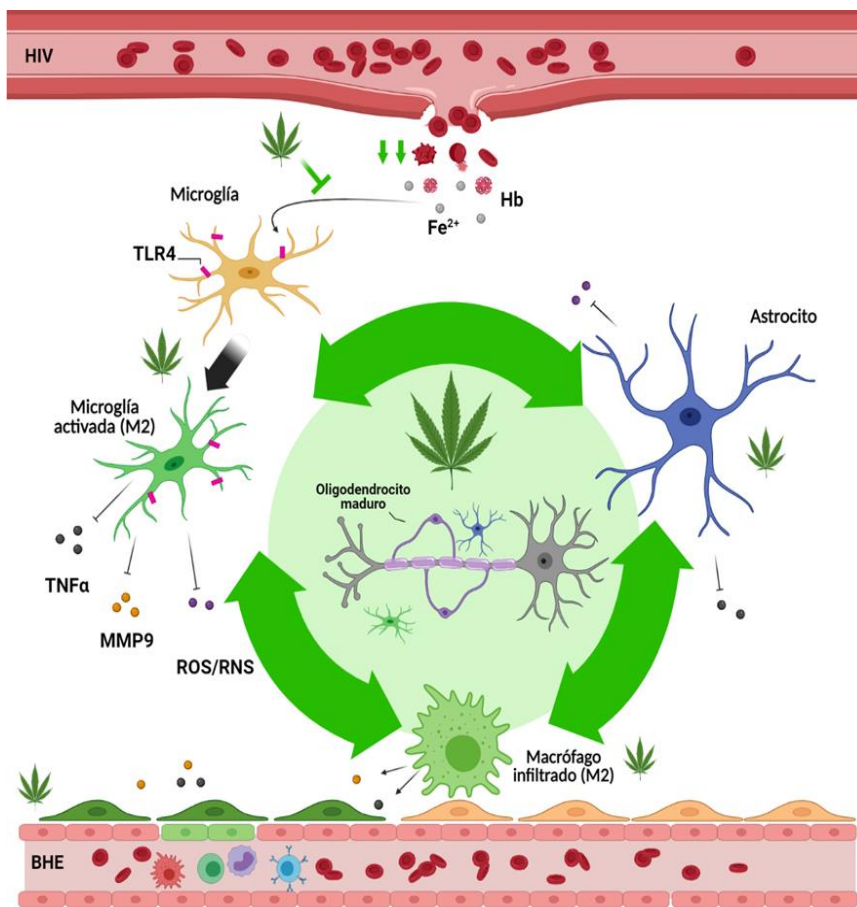
Como hemos observado, parte de este efecto neuroprotector del CBD también se debe a sus efectos antioxidantes <sup>199,510,550</sup>. En estos efectos están implicados su estructura química, la activación del factor Nfr2, la quelación de iones libres como el hierro o el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes como SOD o agentes reductores como el glutatión <sup>510,551-553</sup>. Del mismo modo, en el Diseño experimental 1 explicábamos como la inflamación y el estrés oxidativo se encuentran íntimamente relacionados <sup>422,426,535</sup>, de forma que la inhibición de la vía proinflamatoria TLR-4 y la ausencia de liberación y síntesis de CKs como TNF- $\alpha$  o enzimas como la Cox-2 por parte de este fármaco potenciaba su efecto antioxidante <sup>199,239,510</sup>. Recientemente se ha descrito que los oligodendrocitos son especialmente sensibles a alteraciones en la homeostasis del Retículo endoplasmático <sup>554</sup>. En este sentido, es interesante que los efectos

antioxidantes del CBD también se deben a su capacidad de reducir la fosforilación del Factor traslacional  $2\alpha$ <sup>554</sup>. Finalmente, dado el importante papel del hierro liberado tras la lisis eritrocitaria en el daño oligodendroglial, el efecto modulador del CBD sobre la reacción de Fenton<sup>510,551-553</sup> podría jugar un importante papel en la protección de la SB tras la HIV<sup>66,111</sup>.

Al igual que se ha descrito en otros modelos de daño cerebral neonatal desarrollados en nuestro grupo<sup>199,239,510</sup>, el tratamiento con CBD redujo los niveles de excitotoxicidad. La reducción de los niveles de oxidación, infiltración leucocitaria e inflamación por el CBD son factores que pueden contribuir a este efecto antiexcitatorio<sup>200,442,510</sup>. Adicionalmente, diversos estudios han sugerido que la reducción por el CBD de los niveles de Glutamato están mediados, al menos parcialmente, por el receptor  $CB_2$ <sup>200,510</sup>. Numerosos estudios han sugerido la escasa afinidad de este fitocannabinoides con los receptores  $CB_1$  y  $CB_2$ <sup>198,199,510</sup>. Sin embargo, el bloqueo del receptor  $CB_2$  anula los efectos neuroprotectores de CBD en modelos de daño cerebral neonatal isquémico<sup>198,199,510</sup>. La explicación de la participación de  $CB_2$  en los efectos de CBD estriba en la formación de heterodímeros entre este receptor y el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, demostrada en el cerebro inmaduro en condiciones basales y aumentada tras procesos de hipoxia-isquemia<sup>200,510</sup>. La activación de estos receptores por el CBD inhibe la entrada de calcio intracelular y por tanto la salida de Glutamato mediante la activación de los canales dependientes de Calcio<sup>510</sup>. En condiciones patológicas como la HIV<sup>549</sup>, se ha encontrado una sobreexpresión del receptor  $CB_2$  (posiblemente como mecanismo endógeno de defensa) especialmente en células gliales, lo que interviene en la reducción de los niveles inflamatorios<sup>555-558</sup>. A su vez, la modulación de este receptor promueve el correcto funcionamiento e integridad de la BHE mediante la regulación de la proteína Rac1, proteína intracelular que promueve la proliferación y diferenciación de las CE<sub>s</sub><sup>559-561</sup>. Además, la activación del receptor de Adenosina 2<sup>227,510</sup> y la liberación del NT GABBA mediante la modulación del receptor serotoninérgico<sup>473,510,550</sup> también participan en la reducción de los niveles de Glutamato por el CBD, lo que tendría efectos beneficiosos sobre la protección de los progenitores oligodendrogliales en estadios muy tempranos de la enfermedad<sup>199</sup>.

Estos datos, junto con el aumento en los niveles de expresión de los endocannabinoides AEA, 2-AG, PEA y OEA observado en nuestro modelo (**Fig. S4**), sugiere que de manera indirecta el CBD también podría estar ejerciendo su efecto neuroprotector en la HIV mediante la modulación del SEC; sin embargo, sería necesario llevar a cabo estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

El descenso en los niveles de Mioinositol nos demostró que, acorde con otros estudios similares <sup>198,199,510</sup>, el CBD también redujo la disfunción astrocítica presente a corto plazo. Este efecto protector del CBD en nuestro modelo sobre los astrocitos es de gran relevancia <sup>92,338,395</sup>. Debido al papel regulador de estas poblaciones celulares sobre el crecimiento neuronal, el “pruning sináptico”, la sinapsis, el mantenimiento de la BHE o el flujo de metabolitos <sup>65,79,336,562</sup>, la disfunción astrocítica favorece el mantenimiento del daño cerebral y la alteración de la SB <sup>241,256,330</sup>. Así, la protección del astrocito en esta y otras enfermedades cerebrales ha suscitado especial interés <sup>96,149,244,274</sup>. A pesar de que las investigaciones sobre la relación entre el CBD y el astrocito son muy limitadas <sup>563</sup>, se ha demostrado que el descenso de los niveles de inflamación, estrés oxidativo y excitotoxicidad reducen también de manera indirecta la disfunción astrocítica <sup>198,564</sup>. A su vez, se ha evidenciado como la liberación de factores tróficos como el BDNF o las neurotrofinas son capaces de modular y reducir la astrogliosis y favorecer la reparación y supervivencia del SNC <sup>198,564</sup>. Finalmente, la promoción de fenotipo M2 de los macrófagos y microglía, efecto observado en nuestro modelo tras el tratamiento con CBD, favorece a la disminución de la gliosis <sup>375,419,474,510,562</sup>.



**Figura 95. Efecto del CBD en la fisiopatología de la HIV.** El CBD es capaz de reducir el volumen de sangrado, la gliosis y la permeabilidad de la BHE debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiexcitatorias.

## ***Resumen final***

Esta Tesis Doctoral evidencia que, independientemente del grado de lesión, es de vital importancia abordar el daño secundario de la HIV lo más tempranamente posible, y mantener el tratamiento de manera continuada durante el mayor tiempo posible. Queda además probada la relevancia de la BHE a la hora de explicar los eventos fisiopatológicos que conducen finalmente al daño de la SB y la PC.

El tratamiento con CBD antes y después del daño redujo la inflamación, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y el daño en BHE reduciendo la gliosis y promoviendo un estado neuroprotector mediante el cambio del fenotipo de microglía y macrófagos hacia uno M2. No está claro cuáles son las dianas por las que el CBD puede estar ejerciendo este efecto, pero una explicación plausible sería la activación de los factores PPAR y Nfr2, ya que este efecto es de gran eficacia neuroprotectora<sup>111,396</sup>. Quedaría por dilucidar el posible papel de la activación del SEC, y en concreto del receptor CB<sub>2</sub>. La administración prenatal de CBD permite que, una vez se produzca la inyección de *Colagenasa de Chlostridium*, se inicien los mecanismos de protección y reparación de la BHE. Además, manteniéndose durante al menos 5 días más gracias a la posterior administración tras el daño, el CBD sería capaz de evitar la progresión del sangrado y el desarrollo de los eventos fisiopatológicos. Como consecuencia, se produce una menor liberación de productos derivados de la lisis eritrocitaria y a un menor reclutamiento de microglía y macrófagos a causa de la preservación de la integridad de la BHE. Todo ello conducirá a la protección del correcto desarrollo de las células más afectadas, los oligodendrocitos, produciendo finalmente la prevención de las secuelas. Estos efectos, junto con el alto perfil de seguridad de este fitocannabinoide, la ausencia de efectos secundarios y sus excelentes resultados en el daño cerebral neonatal de origen isquémico, hace que la propuesta del CBD como posible candidato en la prevención de la HIV sea muy prometedora.



The background features abstract, overlapping geometric shapes in various shades of green, creating a modern and dynamic visual effect. The shapes are primarily triangles and polygons, some solid and some semi-transparent, arranged in a way that suggests movement and depth. The colors range from a deep forest green to a light, almost white-green.

# **CONCLUSIONES**



Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. La inyección paraventricular de *Colagenasa de Chlostridium* en ratas PND 1 induce la aparición de una hemorragia intraventricular con una extensión y unas secuelas que reproducen las observadas en el PE y el EPBN, así como algunas de sus características fisiopatológicas:
  - Se produce un daño en la SB a consecuencia de la alteración de la supervivencia y maduración oligodendroglial desde sus estadios más inmaduros.
  - Se produce una alteración de la BHE, que se mantiene al menos durante los primeros quince días tras el daño.
  - Como consecuencia de la hiperpermeabilidad de la BHE, se produce un aumento de la infiltración de macrófagos y reclutamiento microglial, ambos con fenotipo proinflamatorio o M1.
  - Por ello, se produce un incremento de la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad, con el consiguiente daño tisular a corto y largo plazo.
  
2. El tratamiento con el fitocannabinoide CBD tiene efectos beneficiosos sobre las consecuencias de la HIV en este modelo dependiendo del modo de administración:
  - La administración de CBD tras la inducción de la hemorragia, especialmente administrado en dosis múltiples, previene parcialmente el daño tisular y las secuelas secundarias a la misma, aunque no evita la lesión de la SB.
  - La administración prenatal un día antes del parto permite alcanzar concentraciones neuroprotectoras en el cerebro del feto, evitando el daño de la SB en las crías lesionadas, aunque induce beneficios neuroconductuales sólo parciales.
  - La administración combinada de CBD antes del nacimiento y después de la inducción de la hemorragia es la forma más eficaz de tratamiento, reduciendo el volumen de daño cerebral a corto y largo plazo y el daño de la SB, y como consecuencia evitando el desarrollo de secuelas neuroconductuales.

3. EL CBD consigue estos efectos neuroprotectores modulando diferentes procesos fisiopatológicos inducidos por la hemorragia:
- Tiene un efecto antiinflamatorio, promoviendo el cambio del fenotipo de las células inmunológicas hacia uno de tipo M2, resultando en la disminución de la producción de CKs proinflamatorias.
  - Tiene un efecto antiexcitotóxico, reduciendo la concentración cerebral de Glutamato tras la inducción de la hemorragia.
  - Tiene un efecto antioxidante, reduciendo la oxidación proteica cerebral tras la inducción de la hemorragia.
  - Como consecuencia, preserva la integridad funcional de la BHE, limitando la hiperpermeabilidad inducida por la hemorragia y reduciendo la fragilidad vascular en la MG, lo que a su vez limita la progresión de la hemorragia, así como la infiltración de células proinflamatorias, con el consiguiente beneficio sobre la reducción de la respuesta inflamatoria.
4. Por todo lo anterior, el CBD puede postularse como un tratamiento prometedor para la prevención de la Páralisis Cerebral hemorrágica en PE.



# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Bax, M. *et al.* Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev. Med. Child Neurol.* **47**, 571–576 (2005).
2. Volpe, J. J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology* vol. 8 110–124 (2009).
3. Koman, L. A., Smith, B. P. & Shilt, J. S. Cerebral palsy. in *Lancet* vol. 363 1619–1631 (2004).
4. Jones, M. W., Morgan, E., Shelton, J. E. & Thorogood, C. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). *J. Pediatr. Heal. Care* **21**, 146–152 (2007).
5. Chukwukere Ogoke, C. Clinical Classification of Cerebral Palsy. in *Cerebral Palsy - Clinical and Therapeutic Aspects* (IntechOpen, 2018). doi:10.5772/intechopen.79246.
6. MINEAR, W. L. A classification of cerebral palsy. *Pediatrics* **18**, 841–852 (1956).
7. Wood, E. & Rosenbaum, P. The gross motor function classification system for cerebral palsy: A study of reliability and stability over time. *Dev. Med. Child Neurol.* **42**, 292–296 (2000).
8. Rosenbaum, P. & Stewart, D. The World Health Organization International Classification of Functioning, Disability, and Health: A Model to Guide Clinical Thinking, Practice and Research in the Field of Cerebral Palsy. *Seminars in Pediatric Neurology* vol. 11 5–10 (2004).
9. Ozkan, Y. Child's quality of life and mother's burden in spastic cerebral palsy: a topographical classification perspective. *J. Int. Med. Res.* **46**, 3131–3137 (2018).
10. Pakula, A. T., Van Naarden Braun, K. & Yeargin-Allsopp, M. Cerebral Palsy: Classification and Epidemiology. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* vol. 20 425–452 (2009).
11. Shapiro, B. K. Cerebral palsy: A reconceptualization of the spectrum. *J. Pediatr.* **145**, S3-7 (2004).
12. Rosenbaum, P., Paneth, N., Leviton, A., Goldstein, M. & Bax, M. A report: The definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Developmental Medicine and Child Neurology* vol. 49 8–14 (2007).
13. Palisano, R. *et al.* Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **39**, 214–223 (2008).
14. WHO. *International Classification of Functioning, Disability and Health World Health Organization Geneva ICF ii WHO Library Cataloguing-in-Publication Data International classification of functioning, disability and health : ICF.* (2001).
15. Eliasson, A. C., Ullenhag, A., Wahlström, U. & Krumlind-Sundholm, L. Mini-MACS: development of the Manual Ability Classification System for children younger than 4 years of age with signs of cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **59**, 72–78 (2017).
16. Eliasson, A.-C. *et al.* The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability. *Dev. Med. Child Neurol.* **48**, 549–554 (2007).
17. Hidecker, M. J. C. *et al.* Developing and validating the Communication Function Classification System for individuals with cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **53**, 704–710 (2011).
18. Sellers, D., Mandy, A., Pennington, L., Hankins, M. & Morris, C. Development and reliability of a system to classify the eating and drinking ability of people with cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **56**, 245–251 (2014).
19. Sukhov, A., Wu, Y., Xing, G., Smith, L. H. & Gilbert, W. M. Risk factors associated with cerebral palsy in preterm infants. in *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* vol. 25 53–57 (2012).
20. APGAR, V., GIRDANY, B. R., McINTOSH, R. & TAYLOR, H. C. Neonatal anoxia. I. A study of the relation of oxygenation at birth to intellectual development. *Pediatrics* **15**, 653–62 (1955).
21. Ness, J. K., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., Wood, T. L. & Levison, S. W. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. in *Developmental Neuroscience* vol. 23 203–208 (Dev Neurosci, 2001).
22. Keohane, C. Perinatal and Postnatal Infections. in *Developmental Neuropathology* 511–529 (John Wiley & Sons, Ltd, 2018). doi:10.1002/9781119013112.ch42.
23. Smilga, A. S. *et al.* Neonatal Infection in Children With Cerebral Palsy: A

- Registry-Based Cohort Study. *Pediatr. Neurol.* **80**, 77–83 (2018).
24. Bear, J. J. & Wu, Y. W. Maternal infections during pregnancy and cerebral palsy in the child. *Pediatr. Neurol.* **57**, 74–79 (2016).
25. Lee, J. *et al.* Maternal and infant characteristics associated with perinatal arterial stroke in the infant. *J. Am. Med. Assoc.* **293**, 723–729 (2005).
26. Wu, Y. W., Lynch, J. K. & Nelson, K. B. Perinatal arterial stroke: Understanding mechanisms and outcomes. *Seminars in Neurology* vol. 25 424–434 (2005).
27. Gelfand, A. A., Croen, L. A., Torres, A. R. & Wu, Y. W. Genetic risk factors for perinatal arterial ischemic stroke. *Pediatr. Neurol.* **48**, 36–41 (2013).
28. Schieve, L. A. *et al.* Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstetrics and Gynecology* vol. 103 1154–1163 (2004).
29. Lu, Y. H., Wang, N. & Jin, F. Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. *Journal of Zhejiang University: Science B* vol. 14 359–371 (2013).
30. Hediger, M. L., Bell, E. M., Druschel, C. M. & Buck Louis, G. M. Assisted reproductive technologies and children's neurodevelopmental outcomes. *Fertility and Sterility* vol. 99 311–317 (2013).
31. Zegers-Hochschild, F. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009\*. *Fertil. Steril.* **92**, 1520–1524 (2009).
32. Jacobsson, B. & Hagberg, G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* vol. 18 425–436 (2004).
33. Blencowe, H. *et al.* National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *Lancet* **379**, 2162–2172 (2012).
34. Mazaki-Tovi, S. *et al.* Recurrent Preterm Birth. *Seminars in Perinatology* vol. 31 142–158 (2007).
35. Valero De Bernabé, J. *et al.* Risk factors for low birth weight: A review. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* vol. 116 3–15 (2004).
36. Ramakrishnan, U. Nutrition and low birth weight: From research to practice. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 17–21 (2004).
37. McCormick, M. C., Litt, J. S., Smith, V. C. & Zupancic, J. A. F. Prematurity: An Overview and Public Health Implications. *Annu. Rev. Public Health* **32**, 367–379 (2011).
38. Quinn, J. A. *et al.* Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* **34**, 6047–6056 (2016).
39. Cutland, C. L. *et al.* Low birth weight: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data. *Vaccine* vol. 35 6492–6500 (2017).
40. Vogel, J. P. *et al.* The global epidemiology of preterm birth. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* vol. 52 3–12 (2018).
41. Gebregzabihher, Y., Haftu, A., Weldemariam, S. & Gebrehiwet, H. The Prevalence and Risk Factors for Low Birth Weight among Term Newborns in Adwa General Hospital, Northern Ethiopia. (2014) doi:10.1155/2017/2149156.
42. Kramer, M. S. The epidemiology of low birthweight. in *Nestle Nutrition Institute Workshop Series* vol. 74 1–10 (S. Karger AG, 2013).
43. Chawanpaiboon, S. *et al.* Articles Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. (2018) doi:10.1016/S2214-109X(18)30451-0.
44. Ellenberg, J. H. & Nelson, K. B. Birth Weight and Gestational Age in Children With Cerebral Palsy or Seizure Disorders. *Am. J. Dis. Child.* **133**, 1044–1048 (1979).
45. Kramer, M. S. Determinants of low birth weight: Methodological assessment and meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization* vol. 65 663–737 (1987).
46. Barfield, W. D. Public Health Implications of Very Preterm Birth. *Clinics in Perinatology* vol. 45 565–577 (2018).
47. Pascal, A. *et al.* Neurodevelopmental outcome in very preterm and very-low-birthweight infants

- born over the past decade: a meta-analytic review. *Developmental Medicine and Child Neurology* vol. 60 342–355 (2018).
48. Glass, H. C. *et al.* Outcomes for extremely premature infants. *Anesth. Analg.* **120**, 1337–1351 (2015).
49. Hafström, M. *et al.* Cerebral palsy in extremely preterm infants. *Pediatrics* **141**, (2018).
50. Himpens, E., Van Den Broeck, C., Oostra, A., Calders, P. & Vanhaesebrouck, P. Prevalence, type, distribution, and severity of cerebral palsy in relation to gestational age: A meta-analytic review. *Developmental Medicine and Child Neurology* vol. 50 334–340 (2008).
51. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. & Gage, F. H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* **140**, 918–934 (2010).
52. Eichenwald, E. C. & Stark, A. R. Management and outcomes of very low birth weight. *New England Journal of Medicine* vol. 358 1700 (2008).
53. Platt, M. J. *et al.* Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study. *Lancet* **369**, 43–50 (2007).
54. Afjeh, S. A., Sabzehei, M. K., Fallahi, M. & Esmaili, F. Outcome of very low birth weight infants over 3 years report from an iranian center. *Iran. J. Pediatr.* **23**, 579–585 (2013).
55. Spinillo, A. *et al.* Rates of neonatal death and cerebral palsy associated with fetal growth restriction among very low birthweight infants. A temporal analysis. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **113**, 775–780 (2006).
56. Colvin, M., McGuire, W. & Fowlie, P. W. Neurodevelopmental outcomes after preterm birth. *BMJ* **329**, 1390–3 (2004).
57. Nelson, K. B. Can we prevent cerebral palsy? *N. Engl. J. Med.* **349**, 1765–9 (2003).
58. Rodríguez Valdés, R. *et al.* *Influencia de la prematuridad sobre el sistema nervioso en la niñez y en la adultez.* *RCNN, ISSN-e 2225-4676, Vol. 5, Nº. 1, 2015, págs. 40-48* vol. 5 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4790478&info=resumen&idoma=ENG> (2015).
59. Andersen, S. L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 27 3–18 (Elsevier Ltd, 2003).
60. Johnston, M. V. Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. *Brain Dev.* **17**, 301–306 (1995).
61. Allin, M. *et al.* Effects of very low birthweight on brain structure in adulthood. *Dev. Med. Child Neurol.* **47**, 46–53 (2004).
62. Volpe, J. J. *Volpe's neurology of the newborn.* (2008).
63. Ghosh, A., Antonini, A., McConnell, S. K. & Shatz, C. J. Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* **347**, 179–181 (1990).
64. Billiards, S. S. *et al.* Development of microglia in the cerebral white matter of the human fetus and infant. *J. Comp. Neurol.* **497**, 199–208 (2006).
65. RL, H. *et al.* Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, (2003).
66. Khwaja, O. & Volpe, J. J. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* vol. 93 (2008).
67. Volpe, J. J., Kinney, H. C., Jensen, F. E., Rosenberg, P. A. & Rosenberg, P. A. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int. J. Dev. Neurosci.* **29**, 423–40 (2011).
68. Haynes, R. L. *et al.* Axonal development in the cerebral white matter of the human fetus and infant. *J. Comp. Neurol.* **484**, 156–167 (2005).
69. Bystron, I., Blakemore, C. & Rakic, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9 110–122 (2008).
70. Letinic, K., Zoncu, R. & Rakic, P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* **417**, 645–649 (2002).
71. Drobyshevsky, A. *et al.* Developmental changes in diffusion anisotropy coincide with immature oligodendrocyte progression and maturation of compound action potential. *J. Neurosci.* **25**, 5988–5997 (2005).
72. Patel, J. P. & Frey, B. N. Disruption in

- the Blood-Brain Barrier: The Missing Link between Brain and Body Inflammation in Bipolar Disorder? (2015) doi:10.1155/2015/708306.
73. Daneman, R. & Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
74. Lekic, T. *et al.* Neonatal Brain Hemorrhage (NBH) of Prematurity: Translational Mechanisms of the Vascular-Neural Network. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1214–1238 (2015).
75. Keep, R. F. *et al.* Blood-brain barrier function in intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 105 73–77 (2008).
76. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants. *Pediatr. Res.* **56**, 117–124 (2004).
77. Keep, R. F. *et al.* Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids Barriers CNS* **11**, 18 (2014).
78. Xu, H. *et al.* Maturational changes in laminin, fibronectin, collagen IV, and perlecan in germinal matrix, cortex, and white matter and effect of betamethasone. *J. Neurosci. Res.* **86**, 1482–1500 (2008).
79. Zuchero, J. B. & Barres, B. A. Glia in mammalian development and disease. *Dev.* **142**, 3805–3809 (2015).
80. Ballabh, P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: Mechanism of disease. *Pediatric Research* vol. 67 1–8 (2010).
81. Zhao, H., Garton, T., Keep, R. F., Hua, Y. & Xi, G. Microglia/Macrophage Polarization After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* **6**, 407–9 (2015).
82. Arnold, T. & Betsholtz, C. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vascular Cell* vol. 5 (2013).
83. Kanazawa, M., Ninomiya, I., Hatakeyama, M., Takahashi, T. & Shimohata, T. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 (2017).
84. Sajjadian, N., Fakhrai, H. & Jahadi, R. ORIGINAL REPORT \*Corresponding Author: Incidence of Intraventricular Hemorrhage and Post Hemorrhagic Hydrocephalus in Preterm Infants. *Acta Medica Iranica* vol. 48 <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/4043> (2010).
85. Cabañas, F. & Pellicer, A. *Lesión cerebral en el niño prematuro.* [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/).
86. Raets, M. M. A., Dudink, J. & Govaert, P. Neonatal disorders of germinal matrix. *J. Matern. Neonatal Med.* **28**, 2286–2290 (2015).
87. Leijser, L. M. & de Vries, L. S. Preterm brain injury: Germinal matrix-intraventricular hemorrhage and post-hemorrhagic ventricular dilatation. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 162 173–199 (Elsevier B.V., 2019).
88. Goyenechea Gutierrez, F. HEMORRAGIA INTRAVENTRICULAR DEL RECIEN NACIDO.
89. Bolisetty, S. *et al.* Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants. *Pediatrics* **133**, 55–62 (2014).
90. O’Shea, T. M. *et al.* Intraventricular hemorrhage and developmental outcomes at 24 months of age in extremely preterm infants. *J. Child Neurol.* **27**, 22–29 (2012).
91. Eisenhut, M. & Choudhury, S. In premature newborns intraventricular hemorrhage causes cerebral vasospasm and associated neurodisability via heme-induced inflammasome-mediated interleukin-1 production and nitric oxide depletion. *Front. Neurol.* **8**, (2017).
92. Romantsik, O., Bruschetti, M. & Ley, D. Intraventricular hemorrhage and white matter injury in preclinical and clinical studies. *Neoreviews* **20**, e636–e652 (2019).
93. Cherian, S., Whitelaw, A., Thoresen, M. & Love, S. The pathogenesis of neonatal post-hemorrhagic hydrocephalus. *Brain Pathol.* **14**, 305–11 (2004).
94. Adler, I. *et al.* Mechanisms of injury to white matter adjacent to a large intraventricular hemorrhage in the preterm brain. *J. Clin. Ultrasound* **38**, NA-NA (2010).
95. Flores, J. J., Klebe, D., Tang, J. & Zhang, J. H. A comprehensive review of therapeutic targets that induce microglia/macrophage-mediated hematoma resolution after germinal matrix hemorrhage. *J. Neurosci. Res.* **98**,

- 121–128 (2020).
96. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* vol. 16 1–13 (2004).
97. Ballabh, P., Hu, F., Kumarasiri, M., Braun, A. & Nedergaard, M. Development of tight junction molecules in blood vessels of germinal matrix, cerebral cortex, and white matter. *Pediatr. Res.* **58**, 791–798 (2005).
98. Ballabh, P. *et al.* Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage. *Nat. Med.* **13**, 477–485 (2007).
99. Garton, T., Hua, Y., Xiang, J., Xi, G. & Keep, R. F. Challenges for intraventricular hemorrhage research and emerging therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* vol. 21 1111–1122 (2017).
100. McCrea, H. J. & Ment, L. R. The Diagnosis, Management, and Postnatal Prevention of Intraventricular Hemorrhage in the Preterm Neonate. *Clinics in Perinatology* vol. 35 777–792 (2008).
101. Wei, J. C., Catalano, R., Profit, J., Gould, J. B. & Lee, H. C. Impact of antenatal steroids on intraventricular hemorrhage in very-low-birth weight infants. *J. Perinatol.* **36**, 352–356 (2016).
102. Robinson, S. Neonatal posthemorrhagic hydrocephalus from prematurity: Pathophysiology and current treatment concepts: A review. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* vol. 9 242–258 (2012).
103. Almeida, B. A. *et al.* Antenatal corticosteroid treatment for the prevention of peri-intraventricular haemorrhage in preterm newborns: a retrospective cohort study using transfontanelle ultrasonography. *J. Ultrason.* **17**, 91–95 (2017).
104. Hirtz, D. G. *et al.* Antenatal Magnesium and Cerebral Palsy in Preterm Infants. *J. Pediatr.* **167**, 834–839.e3.
105. Mendoza, A. M. A., Kalil, L. F. C., Moog, J. C., Hernández, A. G. & Ochoa, J. W. C. Hemorragia intraventricular en el neonato prematuro. *Iatreia* **18**, pág. 71–77 (2005).
106. Xi, G., Reiser, G. & Keep, R. F. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? *Journal of Neurochemistry* vol. 84 3–9 (2003).
107. Guo, F., Hua, Y., Wang, J., Keep, R. F. & Xi, G. Inhibition of Carbonic Anhydrase Reduces Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* **3**, 130–137 (2012).
108. Meng, H. *et al.* Deferoxamine alleviates chronic hydrocephalus after intraventricular hemorrhage through iron chelation and Wnt1/Wnt3a inhibition. *Brain Res.* **1602**, 44–52 (2015).
109. Wu, J. *et al.* Iron and Iron-Handling Proteins in the Brain after Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* **34**, 2964–2969 (2003).
110. Todorich, B., Pasquini, J. M., Garcia, C. I., Paez, P. M. & Connor, J. R. Oligodendrocytes and myelination: The role of iron. *GLIA* vol. 57 467–478 (2009).
111. Righy, C., T. Bozza, M., F. Oliveira, M. & A. Bozza, F. Molecular, Cellular and Clinical Aspects of Intracerebral Hemorrhage: Are the Enemies Within? *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 392–402 (2015).
112. Orozco-Ibarra, M. & Pedraza-Chaverrí, J. *Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central.* *Archivos de Neurociencias* vol. 15 (2010).
113. Strahle, J. M. *et al.* Role of hemoglobin and iron in hydrocephalus after neonatal intraventricular hemorrhage. *Neurosurgery* **75**, 696–705; discussion 706 (2014).
114. Back, S. A. Perinatal white matter injury: The changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* vol. 12 129–140 (2006).
115. Back, S. A., Gan, X., Li, Y., Rosenberg, P. A. & Volpe, J. J. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J. Neurosci.* **18**, 6241–6253 (1998).
116. Shen, H. Y., Huang, N., Reemmer, J. & Xiao, L. Adenosine actions on oligodendroglia and myelination in autism spectrum disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 12 482 (2018).
117. Fredholm, B. B., Chen, J.-F., Masino, S. A. & Vaugeois, J.-M. ACTIONS OF ADENOSINE AT ITS RECEPTORS IN THE CNS: Insights from Knockouts and Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 385–412 (2005).

118. Latini, S. & Pedata, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* **79**, 463–484 (2008).
119. Baldwin, S. A. *et al.* The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* vol. 447 735–743 (2004).
120. Gray, J. H., Owen, R. P. & Giacomini, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* vol. 447 728–734 (2004).
121. Boison, D. & Shen, H. Y. Adenosine Kinase is a new therapeutic target to prevent ischemic neuronal death. *Open Drug Discovery Journal* vol. 2 108–118 (2010).
122. Broch, O. J. & Ueland, P. M. Regional and Subcellular Distribution of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase in the Adult Rat Brain. *J. Neurochem.* **35**, 484–488 (1980).
123. Vesoulis, Z. A. & Mathur, A. M. Cerebral autoregulation, brain injury, and the transitioning premature infant. *Frontiers in Pediatrics* vol. 5 1 (2017).
124. Szpecht, D., Wiak, K., Braszak, A., Szymankiewicz, M. & Gadzinowski, J. Role of selected cytokines in the etiopathogenesis of intraventricular hemorrhage in preterm newborns. *Child's Nervous System* vol. 32 2097–2103 (2016).
125. Schepanski, S., Buss, C., Hanganu-Opatz, I. L. & Arck, P. C. Prenatal Immune and Endocrine Modulators of Offspring's Brain Development and Cognitive Functions Later in Life. *Frontiers in immunology* vol. 9 2186 (2018).
126. Ja, W. K. & Duman, R. S. IL-1 $\beta$  is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 751–756 (2008).
127. Crampton, S. J., Collins, L. M., Toulouse, A., Nolan, Y. M. & O'Keeffe, G. W. Exposure of foetal neural progenitor cells to IL-1 $\beta$  impairs their proliferation and alters their differentiation - a role for maternal inflammation? *J. Neurochem.* **120**, no-no (2012).
128. Wang, X. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* **36**, 343–354 (2007).
129. Monje, M. L., Toda, H. & Palmer, T. D. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science (80-. )*. **302**, 1760–1765 (2003).
130. Galea, J. & Brough, D. The role of inflammation and interleukin-1 in acute cerebrovascular disease. *Journal of Inflammation Research* vol. 6 121–128 (2013).
131. Viviani, B. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* **23**, 8692–8700 (2003).
132. Halle, A. *et al.* The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . *Nat. Immunol.* **9**, 857–865 (2008).
133. Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R. M., Allan, S. M. & Rothwell, N. J. Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J. Neurochem.* **98**, 258–266 (2006).
134. Denes, A. *et al.* Central and haematopoietic interleukin-1 both contribute to ischaemic brain injury in mice. *DMM Dis. Model. Mech.* **6**, 1043–1048 (2013).
135. McColl, B. W., Rothwell, N. J. & Allan, S. M. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J. Neurosci.* **28**, 9451–9462 (2008).
136. Heep, A. *et al.* Increased serum levels of interleukin 6 are associated with severe intraventricular haemorrhage in extremely premature infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **88**, F501–F504 (2003).
137. Chucair-Elliott, A. J. *et al.* Microglia-induced IL-6 protects against neuronal loss following HSV-1 infection of neural progenitor cells. *Glia* **62**, 1418–1434 (2014).
138. Yang, P., Wen, H., Ou, S., Cui, J. & Fan, D. IL-6 promotes regeneration and functional recovery after cortical spinal tract injury by reactivating intrinsic growth program of neurons and enhancing synapse formation. *Exp. Neurol.* **236**, 19–27 (2012).
139. Oh, J. *et al.* Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **88**, n/a-n/a (2010).

140. Poralla, C. *et al.* Elevated interleukin-6 concentration and alterations of the coagulation system are associated with the development of intraventricular hemorrhage in extremely preterm infants. *Neonatology* **102**, 270–275 (2012).
141. El Ayadi, A., Herndon, D. N. & Finnerty, C. C. Biomarkers in burn patient care. in *Total Burn Care: Fifth Edition* 232–235.e2 (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-323-47661-4.00021-6.
142. Sharma, R., Lall, N. & Kishore, N. Role of Protein Interleukin 8 (IL-8) in Human Life. in 89–100 (Springer, New Delhi, 2015). doi:10.1007/978-81-322-2491-4\_7.
143. Carlo, W. A. *et al.* Cytokines and neurodevelopmental outcomes in extremely low birth weight infants. *J. Pediatr.* **159**, (2011).
144. Guan, Y., Jiang, Z., Ciric, B., pathology, A. R.-... and molecular & 2008, undefined. Upregulation of chemokine receptor expression by IL-10/IL-4 in adult neural stem cells. *Elsevier*.
145. Yang, J. *et al.* Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *J. Clin. Invest.* **119**, 3678–3691 (2009).
146. Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A. & Guaza, C. LPS/IFN- $\gamma$  cytotoxicity in oligodendroglial cells: Role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 493–502 (2001).
147. Garcia, J. M. *et al.* Role of interleukin-10 in acute brain injuries. *Frontiers in Neurology* vol. 8 244 (2017).
148. Miller, B. A., Turan, N., Chau, M. & Pradilla, G. Inflammation, vasospasm, and brain injury after subarachnoid hemorrhage. *BioMed Research International* vol. 2014 (2014).
149. Del Zoppo, G. J. & Hallenbeck, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* **98**, 73–81 (2000).
150. Sandoval, K. E. & Witt, K. A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease* vol. 32 200–219 (2008).
151. Alves, J. L. Blood-brain barrier and traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research* vol. 92 141–147 (2014).
152. Dinarello, C. A. Interleukin-18. *Methods A Companion to Methods Enzymol.* **19**, 121–132 (1999).
153. Sánchez-Ramón, S., López-Longo, F. J. & Carreño, L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatol. Clin.* **6**, 20–24 (2010).
154. Ambalavanan, N. *et al.* Cytokines and posthemorrhagic ventricular dilation in premature infants. *Am. J. Perinatol.* **29**, 731–740 (2012).
155. Iosif, R. E. *et al.* Development/Plasticity/Repair Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Is a Negative Regulator of Progenitor Proliferation in Adult Hippocampal Neurogenesis. *Soc Neurosci.* (2006) doi:10.1523/JNEUROSCI.2723-06.2006.
156. Bruce, A. J. *et al.* Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* **2**, 788–794 (1996).
157. Szpecht, D., Szymankiewicz, M., Seremak-Mrozikiewicz, A. & Gadzinowski, J. The role of genetic factors in the pathogenesis of neonatal intraventricular hemorrhage. *Folia Neuropathologica* vol. 53 1–7 (2015).
158. Buckwalter, M. S. *et al.* Chronically increased transforming growth factor- $\beta$ 1 strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice. *Am. J. Pathol.* **169**, 154–164 (2006).
159. Taylor, R. A. *et al.* TGF- $\beta$ 1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. *J. Clin. Invest.* **127**, 280–292 (2017).
160. Whitelaw, A., Christie, S. & Pople, I. Transforming growth factor- $\beta$ 1: A possible signal molecule for posthemorrhagic hydrocephalus? *Pediatr. Res.* **46**, 576–580 (1999).
161. Butovsky, O. *et al.* Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* **17**, 131–143 (2014).
162. Abutbul, S. *et al.* TGF- $\beta$  signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment. *Glia* **60**, 1160–1171 (2012).
163. Gong, D. *et al.* TGF $\beta$  signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol.* **13**, (2012).
164. Norden, D. M., Fenn, A. M., Dugan,

- A. & Godbout, J. P. TGF $\beta$  produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia* **62**, 881–895 (2014).
165. Butovsky, O. *et al.* Microglia activated by IL-4 or IFN- $\gamma$  differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 149–160 (2006).
166. Hansen-Pupp, I. *et al.* Circulating interferon-gamma and white matter brain damage in preterm infants. *Pediatr. Res.* **58**, 946–952 (2005).
167. Baerwald, K. D. & Popko, B. Developing and mature oligodendrocytes respond differently to the immune cytokine interferon-gamma. *J. Neurosci. Res.* **52**, 230–239 (1998).
168. Yan, E., Castillo-Meléndez, M., Nicholls, T., Hirst, J. & Walker, D. Cerebrovascular Responses in the Fetal Sheep Brain to Low-Dose Endotoxin. *Pediatr. Res.* **55**, 855–863 (2004).
169. Banks, W. A., Kastin, A. J. & Durham, D. A. Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.* **23**, 433–437 (1989).
170. Folkerth, R. D. *et al.* Interferon- $\gamma$  Expression in Periventricular Leukomalacia in the Human Brain. *Brain Pathol.* **14**, 265–274 (2006).
171. Balasubramaniam, J. & Del Bigio, M. R. Animal models of germinal matrix hemorrhage. *J. Child Neurol.* **21**, 365–371 (2006).
172. Lekic, T. *et al.* Rodent neonatal germinal matrix hemorrhage mimics the human brain injury, neurological consequences, and post-hemorrhagic hydrocephalus. *Exp. Neurol.* **236**, 69 (2012).
173. Choi, E.-K. *et al.* Animal models of periventricular leukomalacia. *Lab. Anim. Res.* **27**, 77–84 (2011).
174. Alles, Y. C. J. *et al.* A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Res.* **1356**, 130–138 (2010).
175. Kaur, R., R. Ambwani, S. & Singh, S. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Curr. Clin. Pharmacol.* **11**, 110–117 (2016).
176. Bellocchio, L., Cervino, C., Pasquali, R. & Pagotto, U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *Journal of Neuroendocrinology* vol. 20 850–857 (2008).
177. Di Marzo, V. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacological Research* vol. 60 77–84 (2009).
178. Tramèr, M. R. *et al.* Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: Quantitative systematic review. *Br. Med. J.* **323**, 16–21 (2001).
179. Fraguas-Sánchez, A. I. & Torres-Suárez, A. I. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs* vol. 78 1665–1703 (2018).
180. Costa, B. On the pharmacological properties of  $\Delta$  9-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem. Biodivers.* **4**, 1664–1677 (2007).
181. Pertwee, R. G. *handbook of cannabis. Handbook of Cannabis* (Oxford University Press, 2014).
182. Comelli, F. *et al.* Rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, attenuates mechanical allodynia and counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **637**, 62–69 (2010).
183. Gunduz-Cinar, O. *et al.* Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Mol. Psychiatry* **18**, 813–823 (2013).
184. Blasco-Benito, S. *et al.* Appraising the “entourage effect”: Antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **157**, 285–293 (2018).
185. Guzmán, M. Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* vol. 3 745–755 (2003).
186. Orellana-Serradell, O. *et al.* Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 1599–1608 (2015).
187. Takeda, S. *et al.* Cannabidiolic acid-mediated selective down-regulation of c-fos in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. *J. Nat. Med.* **71**, 286–291 (2017).
188. Takeda, S. *et al.* Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis,

- is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol Lett* **214**, 314–319 (2012).
189. Park, K. R. *et al.*  $\beta$ -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Lett.* **312**, 178–188 (2011).
190. Ligresti, A. *et al.* Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 1375–1387 (2006).
191. Stopponi, S. *et al.* Chronic THC during adolescence increases the vulnerability to stress-induced relapse to heroin seeking in adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **24**, 1037–1045 (2014).
192. Fattore, L. *et al.* Cannabinoid CB1 antagonist SR 141716A attenuates reinstatement of heroin self-administration in heroin-abstinent rats. *Neuropharmacology* **48**, 1097–1104 (2005).
193. Soyka, M. *et al.* Cannabinoid receptor 1 blocker rimonabant (SR 141716) for treatment of alcohol dependence: Results from a placebo-controlled, double-blind trial. *J. Clin. Psychopharmacol.* **28**, 317–324 (2008).
194. Maccarrone, M. *et al.* *Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. Trends in Pharmacological Sciences* vol. 36 277–296 (Elsevier Ltd, 2015).
195. Katchan, V., David, P. & Shoenfeld, Y. Cannabinoids and autoimmune diseases: A systematic review. *Autoimmunity Reviews* vol. 15 513–528 (2016).
196. Andersson, K. E. Current and future drugs for treatment of MS-associated bladder dysfunction. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **57**, 321–328 (2014).
197. Turcotte, C., Blanchet, M. R., Laviolette, M. & Flamand, N. Impact of cannabis, cannabinoids, and endocannabinoids in the lungs. *Frontiers in Pharmacology* vol. 7 317 (2016).
198. Ceprián, M. *et al.* Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. *Neuropharmacology* **116**, 151–159 (2017).
199. Ceprián, M. *et al.* Cannabidiol administration prevents hypoxia-ischemia-induced hypomyelination in newborn rats. *Front. Pharmacol.* **10**, (2019).
200. Pazos, M. R. *et al.* Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: Role of 5HT1A and CB2 receptors. *Neuropharmacology* **71**, 282–291 (2013).
201. Benito, C. *et al.* Cannabinoid CB2 Receptors and Fatty Acid Amide Hydrolase Are Selectively Overexpressed in Neuritic Plaque-Associated Glia in Alzheimer's Disease Brains. *J. Neurosci.* **23**, 11136–11141 (2003).
202. Hind, W. H., England, T. J. & O'Sullivan, S. E. Cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR $\gamma$  and 5-HT1A receptors. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 815–825 (2016).
203. Fernández-López, D. *et al.* The cannabinoid WIN55212-2 promotes neural repair after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* **41**, 2956–2964 (2010).
204. Fernández-López, D. *et al.* Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr. Res.* **60**, 169–173 (2006).
205. Gilbert, G. L., Kim, H. J., Waataja, J. J. & Thayer, S. A.  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. *Brain Res.* **1128**, 61–69 (2007).
206. Hampson, A. J. & Grimaldi, M. Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1529–1536 (2001).
207. Zoppi, S. *et al.* Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* **36**, 805–818 (2011).
208. Van Der Stelt, M. & Di Marzo, V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *NeuroMolecular Medicine* vol. 7 37–50 (2005).
209. Zhuang, S.-Y. *et al.* Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.01.005.
210. Mestre, L. *et al.* [Cannabinoid system and neuroinflammation:therapeutic

- perspectives in multiple sclerosis]. *Rev. Neurol.* **43**, 541–8 (2006).
211. Correa, F. *et al.* The Role of Cannabinoid System on Immune Modulation: Therapeutic Implications on CNS Inflammation. *Mini-Reviews Med. Chem.* **5**, 671–675 (2005).
212. Klein, T. W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature Reviews Immunology* vol. 5 400–411 (2005).
213. Fernández-Ruiz, J. *et al.* Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *British Journal of Pharmacology* vol. 163 1365–1378 (2011).
214. Fernández-Ruiz, J. *et al.* Cannabidiol for neurodegenerative disorders: Important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 323–333 (2013).
215. Maccarrone, M., Lorenzon, T., Bari, M., Melino, G. & Finazzi-Agro, A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 31938–31945 (2000).
216. Salazar, M. *et al.* Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* **119**, 1359–1372 (2009).
217. Venkatachalam, K. & Montell, C. TRP Channels TRP: Transient Receptor Potential. *Annu Rev Biochem.* **76**, 387–417 (2007).
218. Begg, M. *et al.* Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.* **106**, 133–145 (2005).
219. Compagnucci, C. *et al.* Type-1 (CB1) Cannabinoid Receptor Promotes Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Stem Cells. *PLoS One* **8**, (2013).
220. McHugh, D., Page, J., Dunn, E. & Bradshaw, H. B.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2414–2424 (2012).
221. De Petrocellis, L. *et al.* Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1479–1494 (2011).
222. Pertwee, R. G. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. 32–83 (2004).
223. Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E. & Hanuš, L. O. Cannabidiol - Recent advances. *Chemistry and Biodiversity* vol. 4 1678–1692 (2007).
224. Pertwee, R. G. Pharmacological and therapeutic targets for  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Euphytica* **140**, 73–82 (2004).
225. Pertwee, R. G. Cannabidiol as a potential medicine. in *Cannabinoids as Therapeutics* 47–65 (Birkhäuser-Verlag, 2005). doi:10.1007/3-7643-7358-X\_3.
226. McPartland, J. M., Duncan, M., Di Marzo, V. & Pertwee, R. G. Are cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 737–753 (2015).
227. Castillo, A., Tolón, M. R., Fernández-Ruiz, J., Romero, J. & Martínez-Orgado, J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors. *Neurobiol. Dis.* **37**, 434–440 (2010).
228. Barata, L. *et al.* Neuroprotection by cannabidiol and hypothermia in a piglet model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **146**, 1–11 (2019).
229. Pazos, M. R. *et al.* Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology* **63**, 776–783 (2012).
230. Ren, Y., Whittard, J., Higuera-Matas, A., Morris, C. V. & Hurd, Y. L. Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J. Neurosci.* **29**, 14764–14769 (2009).
231. Ruiz-Valdepeñas, L. *et al.* Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: An intravital microscopy study. *J. Neuroinflammation* **8**, (2011).
232. Alvarez, F. J. *et al.* Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr. Res.* **64**, 653–658 (2008).
233. Lafuente, H. *et al.* Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr. Res.* **70**,

- 272–277 (2011).
234. Mohammed, N., Ceprian, M., Jimenez, L., Pazos, M. & Martínez-Orgado, J. Neuroprotective Effects of Cannabidiol in Hypoxic Ischemic Insult. The Therapeutic Window in Newborn Mice. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **16**, 102–108 (2016).
235. Garberg, H. T. *et al.* Short-term effects of cannabidiol after global hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Pediatr. Res.* **80**, 710–718 (2016).
236. Maione, S. *et al.* Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 584–596 (2011).
237. Lekic, T. *et al.* Rodent neonatal germinal matrix hemorrhage mimics the human brain injury, neurological consequences, and post-hemorrhagic hydrocephalus. *Exp. Neurol.* **236**, 69–78 (2012).
238. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haesslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* vols 106–107 1–16 (2013).
239. Pazos, M. R. *et al.* Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology* **63**, 776–783 (2012).
240. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haesslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* vols 106–107 1–16 (2013).
241. Atienza-navarro, I., Alves-martinez, P., Lubian-lopez, S. & Garcia-alloza, M. Germinal matrix-intraventricular hemorrhage of the preterm newborn and preclinical models: Inflammatory considerations. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–24 (2020).
242. Paxinos, G. & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* (1997).
243. Magami, S. *et al.* The Effects of Astrocyte and Oligodendrocyte Lineage Cell Interaction on White Matter Injury under Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Neuroscience* **406**, 167–175 (2019).
244. Liu, D.-Z. *et al.* Blood-brain barrier breakdown and repair by Src after thrombin-induced injury. *Ann. Neurol.* **67**, 526–533 (2010).
245. Tang, J. *et al.* Minocycline Attenuates Neonatal Germinal-Matrix-Hemorrhage-Induced Neuroinflammation and Brain Edema by Activating Cannabinoid Receptor 2. *Mol. Neurobiol.* **53**, 1935–1948 (2016).
246. Segado-Arenas, A. *et al.* Cognitive Impairment and Brain and Peripheral Alterations in a Murine Model of Intraventricular Hemorrhage in the Preterm Newborn. *Mol. Neurobiol.* **55**, 4896–4910 (2018).
247. Hallman-Cooper, J. L. & Rocha Cabrero, F. *Cerebral Palsy.* StatPearls (StatPearls Publishing, 2020).
248. Sukhov, A., Wu, Y., Xing, G., Smith, L. H. & Gilbert, W. M. Risk factors associated with cerebral palsy in preterm infants. in *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* vol. 25 53–57 (J Matern Fetal Neonatal Med, 2012).
249. Kułak, W., Okurowska-Zawada, B., Sienkiewicz, D., Paszko-Patej, G. & Krajewska-Kułak, E. Risk factors for cerebral palsy in term birth infants. *Adv. Med. Sci.* **55**, 216–221 (2010).
250. Powell, T. G., Pharoah, P. O. D., Cooke, R. W. I. & Rosenbloom, L. CEREBRAL PALSY IN LOW-BIRTHWEIGHT INFANTS. II, SPASTIC DIPLEGIA: ASSOCIATIONS WITH FETAL IMMATUREITY. *Dev. Med. Child Neurol.* **30**, 19–25 (1988).
251. Lie, K. K., Grøholt, E. K. & Eskild, A. Association of cerebral palsy with Apgar score in low and normal birthweight infants: Population based cohort study. *BMJ* **341**, 817 (2010).
252. Radic, J. A. E., Vincer, M. & McNeely, P. D. Outcomes of intraventricular hemorrhage and posthemorrhagic hydrocephalus in a population-based cohort of very preterm infants born to residents of Nova Scotia from 1993 to 2010. *J. Neurosurg. Pediatr.* **15**, 580–8 (2015).
253. Howson, C. P., Kinney, M. V., McDougall, L. & Lawn, J. E. Born Too Soon: Preterm birth matters. *Reproductive Health* vol. 10 S1 (2013).
254. Aquilina, K., Chakkarapani, E., Love, S. & Thoresen, M. Neonatal rat model of intraventricular haemorrhage and post-haemorrhagic ventricular dilatation with long-term survival into adulthood. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37**, 156–

- 165 (2011).
255. Lekic, T. *et al.* Aligning Animal Models of Clinical Germinal Matrix Hemorrhage, From Basic Correlation to Therapeutic Approach. *Curr. Drug Targets* **18**, (2016).
256. Dohare, P. *et al.* AMPA-kainate receptor inhibition promotes neurologic recovery in premature rabbits with intraventricular hemorrhage. *J. Neurosci.* **36**, 3363–3377 (2016).
257. Goddard, J., Lewis, R. M., Alcalá, H. & Zeller, R. S. Intraventricular hemorrhage – an animal model. *Neonatology* **37**, 39–52 (1980).
258. Wheeler, A. S. *et al.* Intracranial hemorrhage following intravenous administration of sodium bicarbonate or saline solution in the newborn lamb asphyxiated in utero. *Anesthesiology* **51**, 517–521 (1979).
259. Reynolds, M. L. *et al.* Intracranial haemorrhage in the preterm sheep fetus. *Early Hum. Dev.* **3**, 163–185 (1979).
260. Mayfrank, L. *et al.* Ventricular dilatation in experimental intraventricular hemorrhage in pigs: Characterization of cerebrospinal fluid dynamics and the effects of fibrinolytic treatment. *Stroke* **28**, 141–148 (1997).
261. Lodygensky, G. A., Vasung, L., Sizonenko, S. V. & Hüppi, P. S. Neuroimaging of cortical development and brain connectivity in human newborns and animal models. *J. Anat.* **217**, 418–428 (2010).
262. Bockhorst, K. H. *et al.* Early postnatal development of rat brain: In vivo diffusion tensor imaging. *J. Neurosci. Res.* **86**, 1520–1528 (2008).
263. Craig, A. *et al.* Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp. Neurol.* **181**, 231–240 (2003).
264. Catalani, A. *et al.* Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 481–490 (2002).
265. Kakita, A. & Goldman, J. E. Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: Monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* **23**, 461–472 (1999).
266. Levers, T. E., Edgar, J. M. & Price, D. J. The fates of cells generated at the end of neurogenesis in developing mouse cortex. *J. Neurobiol.* **48**, 265–277 (2001).
267. Christopherson, K. S. *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421–433 (2005).
268. Russo, I. *et al.* P140CAP regulates GABAergic synaptogenesis and development of hippocampal inhibitory circuits. *Cereb. Cortex* **29**, 91–105 (2019).
269. Goritz, C., Mauch, D. H. & Pfrieger, F. W. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**, 190–201 (2005).
270. Clancy, B. *et al.* Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics* **5**, 79–94 (2007).
271. Tartaglione, A. M. *et al.* Aberrant self-grooming as early marker of motor dysfunction in a rat model of Huntington's disease. *Behav. Brain Res.* **313**, 53–57 (2016).
272. Fox, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* **13**, (1965).
273. Hillar, C., Onnis, G., Rhea, D. & Tecott, L. Active State Organization of Spontaneous Behavioral Patterns. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
274. Cherian, S. S. *et al.* Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 292–303 (2003).
275. McCarty, J. H. *et al.* Defective Associations between Blood Vessels and Brain Parenchyma Lead to Cerebral Hemorrhage in Mice Lacking  $\alpha$  Integrins. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7667–7677 (2002).
276. Lorenzo, A. V. & Welch, K. Preterm rabbit model of intraventricular hemorrhage. *Journal of neurosurgery* vol. 64 688–689 (1986).
277. Lorenzo, A. V., Welch, K. & Conner, S. Spontaneous germinal matrix and intraventricular hemorrhage in prematurely born rabbits. *J. Neurosurg.* **56**, 404–410 (1982).
278. Lee, J. H., Chang, Y. S., Ahn, S. Y., Sung, S. I. & Park, W. S. Dexamethasone does not prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage in newborn rats. *PLoS One* **13**, (2018).
279. Ahn, S. Y. *et al.* Mesenchymal stem cells prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage. *Stroke* **44**,

- 497–504 (2013).
280. Hagberg, H., Peebles, D. & Mallard, C. Models of white matter injury: Comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* vol. 8 30–38 (2002).
281. Balasubramaniam, J. *et al.* Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Exp. Neurol.* **197**, 122–132 (2006).
282. Fanaroff, A. A. *et al.* Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **196**, 147.e1–147.e8 (2007).
283. Roland, E. H. & Hill, A. Germinal matrix-intraventricular hemorrhage in the premature newborn: Management and outcome. *Neurologic Clinics* vol. 21 833–851 (2003).
284. Levy, M. L. & Masri, L. S. Outcome for preterm infants with germinal matrix hemorrhage and progressive hydrocephalus. *Neurosurgery* **41**, 1111–1118 (1997).
285. Klevebro, S. *et al.* Cohort study of growth patterns by gestational age in preterm infants developing morbidity. *BMJ Open* **6**, 12872 (2016).
286. Schumann, K., Guenther, A., Jewgenow, K. & Trillmich, F. Animal Housing and Welfare: Effects of Housing Conditions on Body Weight and Cortisol in a Medium-Sized Rodent (*Cavia aperea*). *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* **17**, 111–124 (2014).
287. Brouwer, M. J. *et al.* Effects of Posthemorrhagic Ventricular Dilatation in the Preterm Infant on Brain Volumes and White Matter Diffusion Variables at Term-Equivalent Age. *J. Pediatr.* **168**, 41–49.e1 (2016).
288. Nosarti, C. *et al.* Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. *Brain* **125**, 1616–1623 (2002).
289. Trollmann, R., Strehl, E., Wenzel, D. & Dörr, H. G. Does growth hormone (GH) enhance growth in GH-deficient children with myelomeningocele? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2740–2743 (2000).
290. Löppönen, T. *et al.* Pituitary size and function in children and adolescents with shunted hydrocephalus. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **46**, 691–699 (1997).
291. Brouwer, A. *et al.* Neurodevelopmental Outcome of Preterm Infants with Severe Intraventricular Hemorrhage and Therapy for Post-Hemorrhagic Ventricular Dilatation. *J. Pediatr.* **152**, 648–654 (2008).
292. Germinal Matrix Hemorrhage. in *Imaging in Pediatrics* 314 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/b978-0-323-47778-9.50232-4.
293. Papile, L. A., Munsick-Bruno, G. & Schaefer, A. Relationship of cerebral intraventricular hemorrhage and early childhood neurologic handicaps. *J. Pediatr.* **103**, 273–277 (1983).
294. Graeb, D. A., Robertson, W. D., Lapointe, J. S., Nugent, R. A. & Harrison, P. B. Computed tomographic diagnosis of intraventricular hemorrhage. Etiology and prognosis. *Radiology* **143**, 91–96 (1982).
295. Bassan, H. *et al.* Ultrasonographic features and severity scoring of periventricular hemorrhagic infarction in relation to risk factors and outcome. *Pediatrics* **117**, 2111–2118 (2006).
296. Whitelaw, A. Core concepts: Intraventricular hemorrhage. *Neoreviews* **12**, e94–e101 (2011).
297. Ma, S., Santhosh, D., Kumar T., P. & Huang, Z. A Brain-Region-Specific Neural Pathway Regulating Germinal Matrix Angiogenesis. *Dev. Cell* **41**, 366–381.e4 (2017).
298. Whitelaw, A. *et al.* Randomized clinical trial of prevention of hydrocephalus after intraventricular hemorrhage in preterm infants: Brain-washing versus tapping fluid. *Pediatrics* **119**, (2007).
299. Limbrick, D. D. *et al.* Neurosurgical treatment of progressive posthemorrhagic ventricular dilation in preterm infants: A 10-year single-institution study. *J. Neurosurg. Pediatr.* **6**, 224–230 (2010).
300. de Vries, L. S. & Heep, A. Cerebral Hemorrhage in Newborns. in *Neonatology* 2201–2224 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-29489-6\_275.
301. Chua, C. O. *et al.* Consequences of Intraventricular Hemorrhage in a Rabbit Pup Model. *Stroke* **40**, 3369–3377 (2009).
302. Pappas, A. *et al.* Cognitive outcomes after neonatal encephalopathy. *Pediatrics* **135**, e624–e634 (2015).
303. Van Handel, M., Swaab, H., De Vries, L. S. & Jongmans, M. J. Long-term

- cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: A review. *European Journal of Pediatrics* vol. 166 645–654 (2007).
304. Cunha-Rodrigues, M. C., Balduci, C. T. do N., Tenório, F. & Barradas, P. C. GABA function may be related to the impairment of learning and memory caused by systemic prenatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Learn. Mem.* **149**, 20–27 (2018).
305. Gadian, D. G. Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. *Brain* **123**, 499–507 (2000).
306. Mañeru, C., Junqué, C., Botet, F., Tallada, M. & Guardia, J. Neuropsychological long-term sequelae of perinatal asphyxia. *Brain Inj.* **15**, 1029–1039 (2001).
307. Robertson, C. M. T. & Perlman, M. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr. Child Health (Oxford)*. **11**, 278–282 (2006).
308. Bateup, H. S., Denefrio, C. L., Johnson, C. A., Saulnier, J. L. & Sabatini, B. L. Temporal dynamics of a homeostatic pathway controlling neural network activity. *Front. Mol. Neurosci.* **6**, 28 (2013).
309. Ramocki, M. B. & Zoghbi, H. Y. Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. *Nature* vol. 455 912–918 (2008).
310. Murty, V. P., Calabro, F. & Luna, B. The role of experience in adolescent cognitive development: Integration of executive, memory, and mesolimbic systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 70 46–58 (2016).
311. Payne, A. H. *et al.* Neurodevelopmental outcomes of extremely low-gestational-age neonates with low-grade periventricular-intraventricular hemorrhage. *JAMA Pediatr.* **167**, 451–459 (2013).
312. Futagi, Y., Toribe, Y., Ogawa, K. & Suzuki, Y. Neurodevelopmental outcome in children with intraventricular hemorrhage. *Pediatr. Neurol.* **34**, 219–224 (2006).
313. Patra, K., Wilson-Costello, D., Taylor, H. G., Mercuri-Minich, N. & Hack, M. Grades I-II intraventricular hemorrhage in extremely low birth weight infants: Effects on neurodevelopment. *J. Pediatr.* **149**, 169–173 (2006).
314. Mukerji, A., Shah, V. & Shah, P. S. Periventricular/intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes: A meta-analysis. *Pediatrics* vol. 136 1132–1143 (2015).
315. Bolisetty, S. *et al.* Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants. *Pediatrics* **133**, 55–62 (2014).
316. de Vries, L., Benders, M. & Groenendaal, F. Progress in Neonatal Neurology with a Focus on Neuroimaging in the Preterm Infant. *Neuropediatrics* **46**, 234–241 (2015).
317. Volpe, J. J. Impaired neurodevelopmental outcome after mild germinal matrix-intraventricular hemorrhage. *Pediatrics* vol. 136 1185–1187 (2015).
318. Argyropoulou, M. I. *et al.* Is low-grade intraventricular hemorrhage in very preterm infants an innocent condition? Structural and functional evaluation of the brain reveals regional neurodevelopmental abnormalities. *Am. J. Neuroradiol.* **41**, 542–547 (2020).
319. Vose, L. R. *et al.* Treatment with thyroxine restores myelination and clinical recovery after intraventricular hemorrhage. *J. Neurosci.* **33**, 17232–17246 (2013).
320. Dawes, W. J., Zhang, X., Fancy, S. P. J., Rowitch, D. & Marino, S. Moderate-Grade Germinal Matrix Haemorrhage Activates Cell Division in the Neonatal Mouse Subventricular Zone. *Dev. Neurosci.* **38**, 430–444 (2016).
321. Klebe, D. *et al.* Acute and delayed Deferoxamine treatment attenuates long-term Sequelae after germinal matrix hemorrhage in neonatal rats. *Stroke* **45**, 2475–2479 (2014).
322. Lee, J. H., Chang, Y. S., Ahn, S. Y., Sung, S. I. & Park, W. S. Dexamethasone does not prevent hydrocephalus after severe intraventricular hemorrhage in newborn rats. *PLoS One* **13**, (2018).
323. Chua, C. O. *et al.* Consequences of intraventricular hemorrhage in a rabbit pup model. *Stroke* **40**, 3369–3377 (2009).
324. Vinukonda, G. *et al.* Hyaluronidase and Hyaluronan Oligosaccharides Promote Neurological Recovery after Intraventricular Hemorrhage. *J. Neurosci.* **36**, 872–89 (2016).
325. Silbereis, J. C., Huang, E. J., Back, S. A. & Rowitch, D. H. Towards improved animal models of neonatal white matter

- injury associated with cerebral palsy. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 3 678–688 (2010).
326. Robinson, A. P., Rodgers, J. M., Goings, G. E. & Miller, S. D. Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: Clues for MS pathogenesis. *PLoS One* **9**, (2014).
327. Flores-Obando, R. E., Freidin, M. M. & Abrams, C. K. Rapid and specific immunomagnetic isolation of mouse primary oligodendrocytes. *J. Vis. Exp.* **2018**, (2018).
328. Volpe, J. J. & Zipurksy, A. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatric Research* vol. 50 553–562 (2001).
329. Yamauchi, H. *et al.* Atrophy of the corpus callosum, cortical hypometabolism, and cognitive impairment in corticobasal degeneration. *Arch. Neurol.* **55**, 609–614 (1998).
330. Jinnai, M. *et al.* A Model of Germinal Matrix Hemorrhage in Preterm Rat Pups. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, (2020).
331. Mathur, A. M., Neil, J. J. & Inder, T. E. Understanding Brain Injury and Neurodevelopmental Disabilities in the Preterm Infant: The Evolving Role of Advanced Magnetic Resonance Imaging. *Seminars in Perinatology* vol. 34 57–66 (2010).
332. Li, Y., Wu, P., Liang, F. & Huang, W. The Microstructural Status of the Corpus Callosum Is Associated with the Degree of Motor Function and Neurological Deficit in Stroke Patients. *PLoS One* **10**, e0122615 (2015).
333. Guerra, M., Blázquez, J. L. & Rodríguez, E. M. Blood-brain barrier and foetal-onset hydrocephalus, with a view on potential novel treatments beyond managing CSF flow. *Fluids and Barriers of the CNS* vol. 14 19 (2017).
334. Ballabh, P. Pathogenesis and Prevention of Intraventricular Hemorrhage. *Clin. Perinatol.* **41**, 47–67 (2014).
335. Braun, A. *et al.* Paucity of pericytes in germinal matrix vasculature of premature infants. *J. Neurosci.* **27**, 12012–12024 (2007).
336. Bell, A. H., Miller, S. L., Castillo-Melendez, M. & Malhotra, A. The Neurovascular Unit: Effects of Brain Insults During the Perinatal Period. *Frontiers in Neuroscience* vol. 13 1452 (2020).
337. Moretti, R. *et al.* Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. *Front. Neurosci.* **9**, 40 (2015).
338. Xue, M., Balasubramaniam, J., Buist, R. J., Peeling, J. & Del Bigio, M. R. Periventricular/Intraventricular Hemorrhage in Neonatal Mouse Cerebrum. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1154–1165 (2003).
339. Castaneyra-Ruiz, L. *et al.* Preterm intraventricular hemorrhage in vitro: Modeling the cytopathology of the ventricular zone. *Fluids Barriers CNS* **17**, 46 (2020).
340. Antón, M. *et al.* Alcohol binge disrupts the rat intestinal barrier: the partial protective role of oleoylethanolamide. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 4464–4479 (2018).
341. Fernandez Lopez, D. *et al.* Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. doi:10.1523/JNEUROSCI.5977-11.2012.
342. Keep, R. F. *et al.* Brain endothelial cell junctions after cerebral hemorrhage: Changes, mechanisms and therapeutic targets. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 38 1255–1275 (2018).
343. Wang, H. L., Kuo, E. Y. & Lai, T. W. Vascular delivery of intraperitoneal Evans blue dye into the blood-brain barrier-intact and disrupted rat brains. *Neuroreport* **29**, 924–931 (2018).
344. Bors, L. & Erdő, F. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Sci. Pharm.* **87**, 6 (2019).
345. Ruck, T., Bittner, S. & Meuth, S. G. Blood-brain barrier modeling: Challenges and perspectives. *Neural Regen. Res.* **10**, 889–891 (2015).
346. Montagne, A., Toga, A. W. & Zlokovic, B. V. Blood-brain barrier permeability and gadolinium benefits and potential pitfalls in research. *JAMA Neurology* vol. 73 13–14 (2016).
347. Ku, M. C., Waiczies, S., Niendorf, T. & Pohlmann, A. Assessment of blood brain barrier leakage with gadolinium-enhanced MRI. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1718 395–408 (Humana Press Inc., 2018).
348. Heye, A. K., Culling, R. D., Valdés Hernández, M. D. C., Thrippleton, M. J. & Wardlaw, J. M. Assessment of blood-brain barrier disruption using dynamic contrast-

- enhanced MRI. A systematic review. *NeuroImage: Clinical* vol. 6 262–274 (2014).
349. Khazipov, R. *et al.* Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front. Neuroanat.* **9**, 161 (2015).
350. Yip, D. W. & Lui, F. *Physiology, Motor Cortical*. StatPearls (StatPearls Publishing, 2019).
351. Teka, W. W. *et al.* From the motor cortex to the movement and back again. *PLoS One* **12**, (2017).
352. Rolls, E. T. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain Structure and Function* vol. 224 3001–3018 (2019).
353. Riedel, P., Ragert, P., Schelinski, S., Kiebel, S. J. & von Kriegstein, K. Visual face-movement sensitive cortex is relevant for auditory-only speech recognition. *Cortex* **68**, 86–99 (2015).
354. McCullough, S., Saygin, A. P., Korpics, F. & Emmorey, K. Motion-sensitive cortex and motion semantics in American Sign Language. *Neuroimage* **63**, 111–118 (2012).
355. Hinojosa-Rodríguez, M. *et al.* Clinical neuroimaging in the preterm infant: Diagnosis and prognosis. *NeuroImage: Clinical* vol. 16 355–368 (2017).
356. Zhao, Z. & Zlokovic, B. V. Blood-Brain Barrier: A Dual Life of MFSD2A? *Neuron* vol. 82 728–730 (2014).
357. Yang, Y.-R. *et al.* Mfsd2a (Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2a) Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Blood-Brain Barrier Disruption by Inhibiting Vesicular Transcytosis. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).
358. Andreone, B. J. *et al.* Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* **94**, 581–594.e5 (2017).
359. Ben-Zvi, A. *et al.* Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* **509**, 507–511 (2014).
360. Wang, Z. *et al.* Mfsd2a and Spns2 are essential for sphingosine-1-phosphate transport in the formation and maintenance of the blood-brain barrier. *Sci. Adv.* **6**, 8627–8656 (2020).
361. Sánchez-Campillo, M. *et al.* Decreased blood level of MFSD2a as a potential biomarker of alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
362. Berger, J. H., Charron, M. J. & Silver, D. L. Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein 2a (MFSD2A) Has Roles in Body Growth, Motor Function, and Lipid Metabolism. *PLoS One* **7**, e50629 (2012).
363. Qu, C. *et al.* Mfsd2a Reverses Spatial Learning and Memory Impairment Caused by Chronic Cerebral Hypoperfusion via Protection of the Blood–Brain Barrier. *Front. Neurosci.* **14**, 461 (2020).
364. Alakbarzade, V. *et al.* A partially inactivating mutation in the sodium-dependent lysophosphatidylcholine transporter MFSD2A causes a non-lethal microcephaly syndrome. *Nat. Genet.* **47**, 814–817 (2015).
365. Kanamaru, H. & Suzuki, H. Potential therapeutic molecular targets for blood-brain barrier disruption after subarachnoid hemorrhage. *Neural Regen. Res.* **14**, 1138 (2019).
366. Zhao, C. *et al.* Mfsd2a Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption After Subarachnoid Hemorrhage by Inhibiting Caveolae-Mediated Transcellular Transport in Rats. *Transl. Stroke Res.* **11**, 1012–1027 (2020).
367. Rolland, W. B. *et al.* Fingolimod confers neuroprotection through activation of Rac1 after experimental germinal matrix hemorrhage in rat pups. *J. Neurochem.* **140**, 776–786 (2017).
368. Ben-Zvi, A. *et al.* Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* **509**, 507–511 (2014).
369. Gao, F. *et al.* Hydrocephalus after intraventricular hemorrhage: The role of thrombin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 489–494 (2014).
370. Georgiadis, P. *et al.* Characterization of Acute Brain Injuries and Neurobehavioral Profiles in a Rabbit Model of Germinal Matrix Hemorrhage. *Stroke* **39**, 3378–3388 (2008).
371. Paul, D. A., Leef, K. H. & Stefano, J. L. Increased leukocytes in infants with intraventricular hemorrhage. *Pediatr. Neurol.* **22**, 194–199 (2000).
372. Hammond, M. D., Ai, Y. & Sansing, L. H. Gr1+ Macrophages and Dendritic Cells Dominate the Inflammatory Infiltrate 12 h After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* **3**, 125–131 (2012).

373. Lu, J., Kaur, C. & Ling, E. A. An immunohistochemical study of the intraventricular macrophages in induced hydrocephalus in prenatal rats following a maternal injection of 6-aminonicotinamide. *J. Anat.* **188**, 491–495 (1996).
374. Strahle, J. *et al.* Mechanisms of Hydrocephalus After Neonatal and Adult Intraventricular Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* **3**, 25–38 (2012).
375. Lan, X., Han, X., Li, Q., Yang, Q. W. & Wang, J. Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews Neurology* vol. 13 420–433 (2017).
376. Greter, M., Lelios, I. & Croxford, A. L. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front. Immunol.* **6**, 249 (2015).
377. Zhou, K. *et al.* Regulatory T cells ameliorate intracerebral hemorrhage-induced inflammatory injury by modulating microglia/macrophage polarization through the IL-10/GSK3 $\beta$ /PTEN axis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 967–979 (2017).
378. Mracsko, E. *et al.* Leukocyte invasion of the brain after experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* **45**, 2107–2114 (2014).
379. Koneru, R. *et al.* Macrophages play a key role in early blood brain barrier reformation after hypothermic brain injury. *Neurosci. Lett.* **501**, 148–151 (2011).
380. Corraliza, I. Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 262 (2014).
381. Miron, V. E. *et al.* M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* **16**, 1211–1218 (2013).
382. Munder, M., Eichmann, K. & Modolell, M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4+ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. *J. Immunol.* **160**, (1998).
383. Mills, C. D., Shearer, J., Evans, R. & Caldwell, M. D. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J. Immunol.* **149**, 2709–14 (1992).
384. Tang, Y. & Le, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* vol. 53 1181–1194 (2016).
385. Orihuela, R., McPherson, C. A. & Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 649–65 (2016).
386. Cherry, J. D., Olschowka, J. A. & O'Banion, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation* vol. 11 98 (2014).
387. Truettner, J. S., Bramlett, H. M. & Dietrich, W. D. Posttraumatic therapeutic hypothermia alters microglial and macrophage polarization toward a beneficial phenotype. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 2952–2962 (2017).
388. Yang, Z. & Ming, X.-F. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front. Immunol.* **5**, 533 (2014).
389. Gabrusiewicz, K. *et al.* Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *PLoS One* **6**, (2011).
390. Hirai, T. *et al.* The Prevalence and Phenotype of Activated Microglia/Macrophages within the Spinal Cord of the Hyperostotic Mouse (twy/twy) Changes in Response to Chronic Progressive Spinal Cord Compression: Implications for Human Cervical Compressive Myelopathy. *PLoS One* **8**, (2013).
391. Janciauskiene, S., Vijayan, V. & Immenschuh, S. TLR4 Signaling by Heme and the Role of Heme-Binding Blood Proteins. *Frontiers in Immunology* vol. 11 1964 (2020).
392. Kim, S. Y. *et al.* Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology* **129**, 516–524 (2010).
393. Vinukonda, G. *et al.* Hyaluronidase and Hyaluronan oligosaccharides promote neurological recovery after intraventricular hemorrhage. *J. Neurosci.* **36**, 872–889 (2016).
394. Gram, M. *et al.* Extracellular hemoglobin - mediator of inflammation and cell death in the choroid plexus following preterm intraventricular hemorrhage. *J. Neuroinflammation* **11**, 200 (2014).

395. Gram, M. *et al.* Hemoglobin induces inflammation after preterm intraventricular hemorrhage by methemoglobin formation. *J. Neuroinflammation* **10**, 867 (2013).
396. Zhang, Y. *et al.* Chemerin suppresses neuroinflammation and improves neurological recovery via CaMKK2/AMPK/Nrf2 pathway after germinal matrix hemorrhage in neonatal rats. *Brain. Behav. Immun.* **70**, 179–193 (2018).
397. Aronowski, J. & Hall, C. E. New Horizons for Primary Intracerebral Hemorrhage Treatment: Experience From Preclinical Studies. *Neurol. Res.* **27**, 268–279 (2005).
398. Zhao, X. *et al.* Distinct patterns of intracerebral hemorrhage-induced alterations in NF- $\kappa$ B subunit, iNOS, and COX-2 expression. *J. Neurochem.* **101**, 652–663 (2006).
399. Zou, J. & Crews, F. T. Glutamate/NMDA excitotoxicity and HMGB1/TLR4 neuroimmune toxicity converge as components of neurodegeneration. doi:10.3934/molsci.2015.2.77.
400. Lin, X., Kong, J., Wu, Q., Yang, Y. & Ji, P. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on expression of IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synovial fibroblasts from temporomandibular joint exposed to lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
401. Wang, W. Y., Tan, M. S., Yu, J. T. & Tan, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine* vol. 3 136 (2015).
402. Honjoh, K., Nakajima, H., Hirai, T., Watanabe, S. & Matsumine, A. Relationship of Inflammatory Cytokines From M1-Type Microglia/Macrophages at the Injured Site and Lumbar Enlargement With Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in the CCL21 Knockout (plt) Mouse. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).
403. Lu, H. L. *et al.* Activation of M1 macrophages plays a critical role in the initiation of acute lung injury. *Biosci. Rep.* **38**, 20171555 (2018).
404. Wu, X. *et al.* TNF- $\alpha$  mediated inflammatory macrophage polarization contributes to the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis in mice. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **28**, 351–361 (2015).
405. Yang, J.-T. *et al.* Dexamethasone inhibits ICAM-1 and MMP-9 expression and reduces brain edema in intracerebral hemorrhagic rats. *Acta Neurochir. (Wien)*. **153**, 2197–2203 (2011).
406. Shi, G. *et al.* Upregulation of cyclooxygenase-2 is associated with activation of the alternative nuclear factor kappa B signaling pathway in colonic adenocarcinoma. *Am. J. Transl. Res.* **7**, 1612–1620 (2015).
407. Joo Weon Lim, Kim, H. & Kyung Hwan Kim. Nuclear factor- $\kappa$ B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab. Investig.* **81**, 349–360 (2001).
408. Lin, S. *et al.* Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. *J. Neuroinflammation* **9**, 548 (2012).
409. Yang, L. *et al.* ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood* **106**, 584–92 (2005).
410. Wang, Y. *et al.* The role of the TLR4 signaling pathway in cognitive deficits following surgery in aged rats. *Mol. Med. Rep.* **7**, 1137–1142 (2013).
411. Abdul, Y. *et al.* Inhibition of Toll-Like Receptor-4 (TLR-4) Improves Neurobehavioral Outcomes After Acute Ischemic Stroke in Diabetic Rats: Possible Role of Vascular Endothelial TLR-4. *Mol. Neurobiol.* **56**, 1607–1617 (2019).
412. Tsai, C. L. *et al.* TNF- $\alpha$  induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2-mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Biomed. Sci.* **21**, 12 (2014).
413. Zhang, X. P. *et al.* High-fat treatment prevents postoperative cognitive dysfunction in a hyperlipidemia model by protecting the blood-brain barrier via Mfsd2a-related signaling. *Mol. Med. Rep.* **20**, 4226–4234 (2019).
414. Cheng, Y. *et al.* TNF $\alpha$  disrupts blood brain barrier integrity to maintain prolonged depressive-like behavior in mice. *Brain. Behav. Immun.* **69**, 556–567 (2018).
415. Rochfort, K. D., Collins, L. E., McLoughlin, A. & Cummins, P. M. Tumour necrosis factor- $\alpha$ -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *J. Neurochem.* **136**, 564–572 (2016).

416. Lee, I. T., Lin, C. C., Wu, Y. C. & Yang, C. M. TNF- $\alpha$  induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: Role of TNFR1/TRAF2/PKC $\alpha$ -dependent signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* **224**, 454–464 (2010).
417. Eser Ocak, P., Ocak, U., Sherchan, P., Zhang, J. H. & Tang, J. Insights into major facilitator superfamily domain-containing protein-2a (Mfsd2a) in physiology and pathophysiology. What do we know so far? *Journal of Neuroscience Research* vol. 98 29–41 (2020).
418. Hattingen, E. *et al.* Myo-inositol: A marker of reactive astrogliosis in glial tumors? *NMR Biomed.* **21**, 233–241 (2008).
419. Ronaldson, P. T. & Davis, T. P. Regulation of blood–brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 40 S6–S24 (2020).
420. Cabezas, R. *et al.* Astrocytic modulation of blood brain barrier: Perspectives on Parkinson’s disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 8 (2014).
421. Zia, M. T. *et al.* Oxidative-Nitrosative Stress in a Rabbit Pup Model of Germinal Matrix Hemorrhage. *Stroke* **40**, 2191–2198 (2009).
422. Goulding, D. S. *et al.* Acute brain inflammation, white matter oxidative stress, and myelin deficiency in a model of neonatal intraventricular hemorrhage. *J. Neurosurg. Pediatr.* **26**, 613–623 (2020).
423. Thibeault, D. W. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *American Journal of Perinatology* vol. 17 167–181 (2000).
424. Perrone, S., Salvi, G., Bellieni, C. V. & Buonocore, G. Oxidative stress and nutrition in the preterm newborn. in *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* vol. 45 (2007).
425. Wagner, K. R. Modeling Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* **38**, 753–758 (2007).
426. Duan, X., Wen, Z., Shen, H., Shen, M. & Chen, G. Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2016 (2016).
427. Wagner, K. R., Sharp, F. R., Ardizzone, T. D., Lu, A. & Clark, J. F. Heme and iron metabolism: Role in cerebral hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 23 629–652 (2003).
428. Haroon, E., Miller, A. H. & Sanacora, G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* **42**, 193–215 (2017).
429. Ahmad, A. S., Zhuang, H. & Doré, S. Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity. *Neuroscience* **141**, 1703–1708 (2006).
430. Olmos, G. & Lladó, J. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation* vol. 2014 (2014).
431. Fajardo-Fregoso, B. F., Castañeda-Cabral, J. L., Beas-Zárate, C. & Ureña-Guerrero, M. E. Neonatal excitotoxicity modifies blood-brain barrier properties increasing its susceptibility to hypertonic shock in adulthood. *Int. J. Dev. Neurosci.* **80**, 335–346 (2020).
432. Nadeem, M., Clarke, A. & Dempsey, E. M. Day 1 serum lactate values in preterm infants less than 32 weeks gestation. *Eur. J. Pediatr.* **169**, 667–670 (2010).
433. Lafuente, H. *et al.* Effects of cannabidiol and hypothermia on short-term brain damage in new-born piglets after acute hypoxia-ischemia. *Front. Neurosci.* **10**, (2016).
434. Rothman, D. L. *et al.* Localized proton NMR observation of [3-13C] lactate in stroke after [1-13C] glucose infusion. *Magn. Reson. Med.* **21**, 302–307 (1991).
435. Thayyil, S. *et al.* Cerebral magnetic resonance biomarkers in neonatal encephalopathy: A meta-analysis. *Pediatrics* vol. 125 e382–e395 (2010).
436. Kreis, R., Ernst, T. & Ross, B. D. Development of the human brain: In vivo quantification of metabolite and water content with proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **30**, 424–437 (1993).
437. Mehmet, H. *et al.* Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Cell Death Differ.* **5**, 321–329 (1998).
438. Urenjak, J., Williams, S. R., Gadian, D. G. & Noble, M. Specific Expression of N-Acetylaspartate in Neurons, Oligodendrocyte-Type-2 Astrocyte Progenitors, and Immature Oligodendrocytes In Vitro. *J. Neurochem.*

- 59, 55–61 (1992).
439. Grinstein, S., Goetz-Smith, J. D., Stewart, D., Beresford, B. J. & Mellors, A. Protein phosphorylation during activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by phorbol esters and by osmotic shrinking. Possible relation to cell pH and volume regulation. *J. Biol. Chem.* **261**, 8009–8016 (1986).
440. Garcia, J. H. & Kamijyo, Y. Cerebral infarction: Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **33**, 408–421 (1974).
441. Jinnai, M. *et al.* A Model of Germinal Matrix Hemorrhage in Preterm Rat Pups. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, (2020).
442. Ballabh, P. & de Vries, L. S. White matter injury in infants with intraventricular haemorrhage: mechanisms and therapies. *Nature Reviews Neurology* 1–16 (2021) doi:10.1038/s41582-020-00447-8.
443. Papile, L. A., Burstein, J., Burstein, R. & Koffler, H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J. Pediatr.* **92**, 529–34 (1978).
444. Bu, Y. *et al.* Mechanisms of hydrocephalus after intraventricular haemorrhage in adults. *Stroke and Vascular Neurology* vol. 1 23–27 (2016).
445. Gram, M. *et al.* Extracellular hemoglobin - mediator of inflammation and cell death in the choroid plexus following preterm intraventricular hemorrhage. *J. Neuroinflammation* **11**, 200 (2014).
446. Mathew, O. P. & Volpe, J. J. Neonatal intraventricular hemorrhage: Hypoglycorrhachia and its relationship to CSF lactate levels. *J. Pediatr.* **97**, 292–295 (1980).
447. Vinukonda, G. *et al.* Hyaluronidase and Hyaluronan oligosaccharides promote neurological recovery after intraventricular hemorrhage. *J. Neurosci.* **36**, 872–889 (2016).
448. Bernardo-Castro, S. *et al.* Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Front. Neurol.* **11**, 1605 (2020).
449. Hue, C. D. *et al.* Blood-brain barrier dysfunction after primary blast injury in vitro. *J. Neurotrauma* **30**, 1652–1663 (2013).
450. Heinrich, F. *et al.* Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro. *PLoS One* **12**, e0183572 (2017).
451. Li, H., Xu, H. & Liu, S. Toll-like receptors 4 induces expression of matrix metalloproteinase-9 in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1419–1423 (2011).
452. Yu, W. C., Cong, J. P. & Mi, L. Y. Expressions of TOLL-like receptor 4 (TLR-4) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)/Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in pulmonary blood vessels with chronic obstructive pulmonary diseases and their relationships with pulmonary vascular remodelling. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **64**, 361–367 (2018).
453. Li, Y. F. *et al.* The nuclear factor- $\kappa$ B pathway is involved in matrix metalloproteinase-9 expression in RU486-induced endometrium breakdown in mice. *Hum. Reprod.* **27**, 2096–2106 (2012).
454. Wang, T. *et al.* Association of NF- $\kappa$ B and AP-1 with MMP-9 Overexpression in 2-Chloroethanol Exposed Rat Astrocytes. *Cells* **7**, 96 (2018).
455. Marchetti, L., Klein, M., Schlett, K., Pfizenmaier, K. & Eisel, U. L. M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation: Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- $\kappa$ B pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 32869–32881 (2004).
456. Zhang, Y. & Hu, W. NF $\kappa$ B signaling regulates embryonic and adult neurogenesis. *Frontiers in Biology* vol. 7 277–291 (2012).
457. Qin, Z. H., Tao, L. Y. & Chen, X. Dual roles of NF- $\kappa$ B in cell survival and implications of NF- $\kappa$ B inhibitors in neuroprotective therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 28 1859–1872 (2007).
458. Palma-Tortosa, S. *et al.* Toll-like receptor 4 regulates subventricular zone proliferation and neuroblast migration after experimental stroke. *Brain. Behav. Immun.* **80**, 573–582 (2019).
459. Hayashi, C. *et al.* Protective Role for TLR4 Signaling in Atherosclerosis Progression as Revealed by Infection with

- a Common Oral Pathogen. *J. Immunol.* **189**, 3681–3688 (2012).
460. Dolga, A. M. *et al.* TNF- $\alpha$  mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF- $\kappa$ B-dependent up-regulation of K<sub>Ca</sub> 2.2 channels. *J. Neurochem.* **107**, 1158–1167 (2008).
461. Liu, L., Wan, W., Xia, S., Kalionis, B. & Li, Y. Dysfunctional Wnt/ $\beta$ -catenin signaling contributes to blood-brain barrier breakdown in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* vol. 75 19–25 (2014).
462. Laksitorini, M. D., Yathindranath, V., Xiong, W., Hombach-Klonisch, S. & Miller, D. W. Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes blood-brain barrier phenotype in cultured brain endothelial cells. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
463. Walter, L. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) limits reactive oxygen species (ROS) accumulation and DNA damage in colitis-associated cancer. *Cell Death Dis.* **11**, 1–14 (2020).
464. Pujada, A. *et al.* Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. *Oncotarget* **8**, 94650–94665 (2017).
465. Xue, M., Balasubramaniam, J., Buist, R. J., Peeling, J. & Del Bigio, M. R. Periventricular/Intraventricular Hemorrhage in Neonatal Mouse Cerebrum. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1154–1165 (2003).
466. Navarrete, M. & Araque, A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* **68**, 113–126 (2010).
467. Valdez Sandoval, P., Hernández Rosales, P., Quiñones Hernández, D. G., Chavana Naranjo, E. A. & García Navarro, V. Intraventricular hemorrhage and posthemorrhagic hydrocephalus in preterm infants: diagnosis, classification, and treatment options. *Child's Nervous System* vol. 35 917–927 (2019).
468. Kuo, M. F. Surgical management of intraventricular hemorrhage and posthemorrhagic hydrocephalus in premature infants. *Biomedical Journal* vol. 43 268–276 (2020).
469. Wilson, D., Kim, D. & Breitbart, S. Intraventricular Hemorrhage and Posthemorrhagic Ventricular Dilation: Current Approaches to Improve Outcomes. *Neonatal Netw.* **39**, 158–169 (2020).
470. Devinsky, O. *et al.* Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* **55**, 791–802 (2014).
471. Fernández-Ruiz, J. *et al.* Cannabidiol for neurodegenerative disorders: Important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 323–333 (2013).
472. Sagredo, O. *et al.* Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochemical Pharmacology* vol. 157 85–96 (2018).
473. Pazos, M. R. *et al.* Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxic-ischemic newborn pigs: role of 5HT(1A) and CB2 receptors. *Neuropharmacology* **71**, (2013).
474. Mohammed, N., Ceprian, M., Jimenez, L., Pazos, M. & Martínez-Orgado, J. Neuroprotective Effects of Cannabidiol in Hypoxic Ischemic Insult. The Therapeutic Window in Newborn Mice. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **16**, 102–108 (2016).
475. Abrantes De Lacerda Almeida, T. *et al.* Intraperitoneal cannabidiol attenuates neonatal germinal matrix hemorrhage-induced neuroinflammation and perilesional apoptosis. *Neurol. Res.* **41**, 980–990 (2019).
476. Khaksar, S. & Bigdeli, M. R. Intracerebral cannabidiol infusion-induced neuroprotection is partly associated with the TNF- $\alpha$ /TNFR1/NF- $\kappa$ B pathway in transient focal cerebral ischaemia. *Brain Inj.* **31**, 1932–1943 (2017).
477. Gomes, F. V. *et al.* Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT1A receptor. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **23**, 1096–1104 (2013).
478. Deabold, K. A., Schwark, W. S., Wolf, L. & Wakshlag, J. J. Single-Dose Pharmacokinetics and Preliminary Safety Assessment with Use of CBD-Rich Hemp Nutraceutical in Healthy Dogs and Cats. *Animals* **9**, 832 (2019).
479. Jones, N. A. *et al.* Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure* **21**, 344–352 (2012).

480. Machado Bergamaschi, M., Helena Costa Queiroz, R., Waldo Zuardi, A. & Alexandre S. Crippa, J. Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr. Drug Saf.* **6**, 237–249 (2011).
481. Ignatowska-Jankowska, B., Jankowski, M. M. & Swiergiel, A. H. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: Involvement of CB2 receptors. *Neurosci. Lett.* **490**, 82–84 (2011).
482. Alshaarawy, O. & Anthony, J. C. Are cannabis users less likely to gain weight? Results from a national 3-year prospective study. *Int. J. Epidemiol.* **48**, 1695–1700 (2019).
483. Parray, H. A. & Yun, J. W. Cannabidiol promotes browning in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **416**, 131–139 (2016).
484. Lan, X., Han, X., Li, Q., Yang, Q. W. & Wang, J. Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews Neurology* vol. 13 420–433 (2017).
485. Fitzpatrick, J.-M. *et al.* MyD88-dependent and -independent signalling via TLR3 and TLR4 are differentially modulated by  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in human macrophages. *J. Neuroimmunol.* **343**, 577217 (2020).
486. McCoy, K. L. Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. *Mediators of Inflammation* vol. 2016 (2016).
487. Majdi, F., Taheri, F., Salehi, P., Motaghinejad, M. & Safari, S. Cannabinoids  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol may be effective against methamphetamine induced mitochondrial dysfunction and inflammation by modulation of Toll-like type-4(Toll-like 4) receptors and NF- $\kappa$ B signaling. *Med. Hypotheses* **133**, 109371 (2019).
488. Kozela, E. *et al.* Cannabinoids  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF- $\kappa$ B and interferon- $\beta$ /STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 1616–1626 (2010).
489. O’Sullivan, S. E. An update on PPAR activation by cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* vol. 173 1899–1910 (2016).
490. O’Sullivan, S. E. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: an update and review of the physiological relevance. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2**, 17–25 (2013).
491. Granja, A. G. *et al.* A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **7**, 1002–1016 (2012).
492. Casares, L. *et al.* Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1. *Redox Biol.* **28**, (2020).
493. Jastrz b, A., G gotek, A. & Skrzydlewska, E. Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. *Cells* **8**, (2019).
494. Singer, E. *et al.* Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* **6**, e1601 (2015).
495. Huang, J. *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 regulates toll-like receptor 4 innate responses in mouse liver ischemia-reperfusion injury through akt-forkhead box protein o1 signaling network. *Transplantation* **98**, 721–728 (2014).
496. Fujita, K. I., Maeda, D., Xiao, Q. & Srinivasula, S. M. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1427–1432 (2011).
497. Gugliandolo, E. *et al.* Involvement of TLR4 and PPAR- $\alpha$  Receptors in Host Response and NLRP3 Inflammasome Activation, against Pulmonary Infection with Pseudomonas Aeruginosa. *Shock* **51**, 221–227 (2019).
498. Necela, B. M., Su, W. & Thompson, E. A. Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and nuclear factor- $\kappa$ B in macrophages. *Immunology* **125**, 344–358 (2008).
499. Silvestro, S., Schepici, G., Bramanti, P. & Mazzon, E. Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)* vol. 25 (2020).
500. Peres, F. F. *et al.* Cannabidiol as a promising strategy to treat and prevent movement disorders? *Frontiers in Pharmacology* vol. 9 482 (2018).

501. Cunha, J. M. *et al.* Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* **21**, 175–185 (1980).
502. Zhang, Y. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 in macrophages restrains TLR4-NF- $\kappa$ B signaling and protects against endotoxin shock. *Immunity* **40**, 501–514 (2014).
503. Riddell, J. R. *et al.* Peroxiredoxin 1 Stimulates Endothelial Cell Expression of VEGF via TLR4 Dependent Activation of HIF-1 $\alpha$ . *PLoS One* **7**, e50394 (2012).
504. Simão, S., B Bitoque, D., M Calado, S. & A Silva, G. Oxidative stress modulates the expression of VEGF isoforms in the diabetic retina. *New Front. Ophthalmol.* **2**, (2016).
505. Kim, Y. W. & Byzova, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* vol. 123 625–631 (2014).
506. Ballabh, P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: Mechanism of disease. *Pediatric Research* vol. 67 1–8 (2010).
507. Solinas, M. *et al.* Cannabidiol inhibits angiogenesis by multiple mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 1218–1231 (2012).
508. McAllister, S. D. *et al.* Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* **129**, 37–47 (2011).
509. Franco, R. *et al.* Potentiation of cannabinoid signaling in microglia by adenosine A2A receptor antagonists. *Glia* **67**, 2410–2423 (2019).
510. Martínez-Orgado, J., Villa, M. & del Pozo, A. Cannabidiol for the Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Frontiers in Pharmacology* vol. 11 (2021).
511. O’Shea, T. M. *et al.* Intraventricular hemorrhage and developmental outcomes at 24 months of age in extremely preterm infants. *J. Child Neurol.* **27**, 22–29 (2012).
512. Thompson, D. K. *et al.* Corpus callosum alterations in very preterm infants: Perinatal correlates and 2year neurodevelopmental outcomes. *Neuroimage* **59**, 3571–3581 (2012).
513. Callejas, G. H. *et al.* Maternal administration of cannabidiol promotes an anti-inflammatory effect on the intestinal wall in a gastroschisis rat model. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **51**, (2018).
514. Lattanzi, S. *et al.* Efficacy and Safety of Cannabidiol in Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs* vol. 78 1791–1804 (2018).
515. Dalterio, S., Steger, R., Mayfield, D. & Bartke, A. Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in male mice: I. Prenatal exposure. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **20**, 107–113 (1984).
516. Sarrafpour, S. *et al.* Considerations and Implications of Cannabidiol Use During Pregnancy. *Current Pain and Headache Reports* vol. 24 1–10 (2020).
517. Feinshtein, V. *et al.* Cannabidiol changes P-gp and BCRP expression in trophoblast cell lines. *PeerJ* **2013**, (2013).
518. Feinshtein, V. *et al.* Cannabidiol enhances xenobiotic permeability through the human placental barrier by direct inhibition of breast cancer resistance protein: An ex vivo study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **209**, 573.e1-573.e15 (2013).
519. Barateiro, A., Brites, D. & Fernandes, A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 656–679 (2016).
520. Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D. & Dombrowski, Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* **8**, 1424 (2019).
521. Traiffort, E., Zakaria, M., Laouarem, Y. & Ferent, J. Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J. Dev. Biol.* **4**, 28 (2016).
522. Zhou, B., Zhu, Z., Ransom, B. R. & Tong, X. Oligodendrocyte lineage cells and depression. *Molecular Psychiatry* vol. 26 103–117 (2020).
523. Newville, J., Jantzie, L. & Cunningham, L. Embracing oligodendrocyte diversity in the context of perinatal injury. *Neural Regen. Res.* **12**, 1575 (2017).
524. Hamner, M. A. *et al.* Ischemic preconditioning in white matter: Magnitude and mechanism. *J. Neurosci.* **35**, 15599–15611 (2015).
525. McDonald, J. W., Levine, J. M. & Qu, Y. Multiple classes of the oligodendrocyte lineage are highly vulnerable to excitotoxicity. *Neuroreport* **9**, 2757–2762 (1998).

526. Stella, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* vol. 56 244–253 (2009).
527. Lisboa, S. F., Gomes, F. V., Guimaraes, F. S. & Campos, A. C. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. *Frontiers in Neurology* vol. 7 28 (2016).
528. Martín-Moreno, A. M. *et al.* Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: Relevance to alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* **79**, 964–973 (2011).
529. Varnum, M. M. & Ikezu, T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in alzheimer's disease brain. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* vol. 60 251–266 (2012).
530. Zhang, L., Zhang, J. & You, Z. Switching of the microglial activation phenotype is a possible treatment for depression disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 12 (2018).
531. Barata, L. *et al.* Neuroprotection by cannabidiol and hypothermia in a piglet model of newborn hypoxic-ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **146**, 1–11 (2019).
532. García-Arencibia, M. *et al.* Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* **1134**, 162–170 (2007).
533. Müller, C. P. *et al.* Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* vol. 1851 1052–1065 (2015).
534. Tan, S. T., Ramesh, T., Toh, X. R. & Nguyen, L. N. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. *Progress in Lipid Research* vol. 80 101068 (2020).
535. Brook, E. *et al.* Blood-brain barrier disturbances in diabetes-associated dementia: Therapeutic potential for cannabinoids. *Pharmacological Research* vol. 141 291–297 (2019).
536. Calapai, F. *et al.* Cannabinoids, blood–brain barrier, and brain disposition. *Pharmaceutics* vol. 12 (2020).
537. Mecha, M. *et al.* Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: A role for A2A receptors. *Neurobiol. Dis.* **59**, 141–150 (2013).
538. Hind, W. H., England, T. J. & O'Sullivan, S. E. Cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR $\gamma$  and 5-HT $1A$  receptors. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 815–825 (2016).
539. Luo, H. *et al.* Cannabidiol Increases Proliferation, Migration, Tubulogenesis, and Integrity of Human Brain Endothelial Cells through TRPV2 Activation. *Mol. Pharm.* **16**, 1312–1326 (2019).
540. Rawal, S. Y., Dabbous, M. K. & Tipton, D. A. Effect of cannabidiol on human gingival fibroblast extracellular matrix metabolism: MMP production and activity, and production of fibronectin and transforming growth factor  $\beta$ . *J. Periodontal Res.* **47**, 320–329 (2012).
541. Dhital, S., Stokes, J. V., Park, N., Seo, K. S. & Kaplan, B. L. F. Cannabidiol (CBD) induces functional Tregs in response to low-level T cell activation. *Cell. Immunol.* **312**, 25–34 (2017).
542. Chiricosta, L. *et al.* Transcriptomic analysis of stem cells treated with moringin or cannabidiol: Analogies and differences in inflammation pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
543. Xu, P., Liu, J. & Derynck, R. Post-translational regulation of TGF- $\beta$  receptor and Smad signaling. *FEBS Letters* vol. 586 1871–1884 (2012).
544. McMillin, M. A. *et al.* TGF $\beta$ 1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5. *Lab. Investig.* **95**, 903–913 (2015).
545. Kastin, A. J., Akerstrom, V. & Pan, W. Circulating TGF- $\beta$ 1 does not cross the intact blood-brain barrier. *J. Mol. Neurosci.* **21**, 43–48 (2003).
546. Seo, J. H. *et al.* Oligodendrocyte Precursor Cells Support Blood-Brain Barrier Integrity via TGF- $\beta$  Signaling. *PLoS One* **9**, e103174 (2014).
547. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137–161 (1998).
548. Manaenko, A., Lekic, T., Barnhart, M., Hartman, R. & Zhang, J. H. Inhibition of transforming growth factor-p attenuates brain injury and neurological deficits in a rat model of germinal matrix

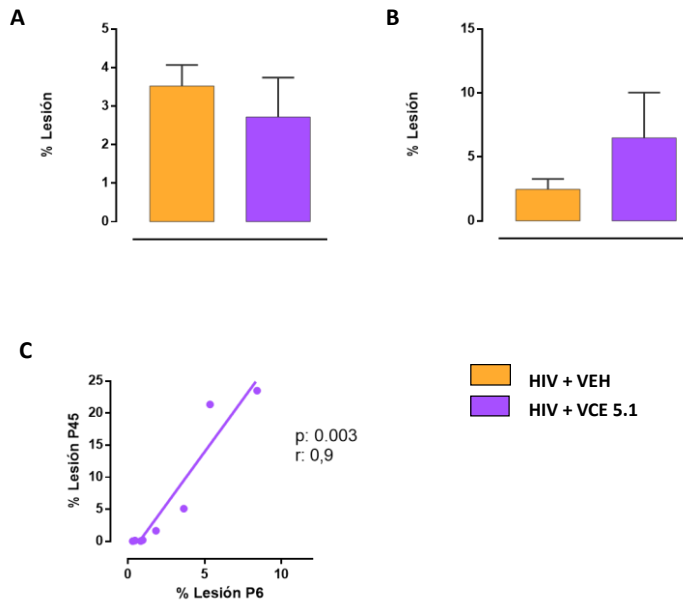
- hemorrhage, Departments of Basic Science. *Stroke* **45**, 828–834 (2014).
549. Tang, J. *et al.* Pharmacological Preventions of Brain Injury Following Experimental Germinal Matrix Hemorrhage: an Up-to-Date Review. *Translational Stroke Research* vol. 7 20–32 (2016).
550. Fernández-Ruiz, J. *et al.* Cannabidiol for neurodegenerative disorders: Important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 323–333 (2013).
551. Atalay, S., Jarocka-karpowicz, I. & Skrzydlewska, E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants* vol. 9 (2020).
552. Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J. & Wink, D. Cannabidiol and (-)- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8268–8273 (1998).
553. da Silva, V. K. *et al.* Antiapoptotic effects of cannabidiol in an experimental model of cognitive decline induced by brain iron overload. *Transl. Psychiatry* **8**, 176 (2018).
554. Mecha, M. *et al.* Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis.* **3**, e331 (2012).
555. Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J. & de Lago, E. Analysis of endocannabinoid receptors and enzymes in the post-mortem motor cortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 377–386 (2018).
556. Duncan, M. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G78 (2008).
557. Gómez-Gálvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernández-Ruiz, J. & García, C. Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **64**, 200–208 (2016).
558. Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gu, S. & Liu, Q. R. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: Beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *Journal of Psychopharmacology* vol. 26 92–103 (2012).
559. Li, L. *et al.* A cannabinoid receptor 2 agonist reduces blood–brain barrier damage via induction of MKP-1 after intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res.* **1697**, 113–123 (2018).
560. Chung, Y. C. *et al.* CB2 receptor activation prevents glial-derived neurotoxic mediator production, BBB leakage and peripheral immune cell infiltration and rescues dopamine neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.* **48**, 205 (2016).
561. Wang, Z., Li, Y., Cai, S., Li, R. & Cao, G. Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates blood-brain barrier damage in a rat model of intracerebral hemorrhage by activating the Rac1 pathway. *Int. J. Mol. Med.* **42**, 2914–2922 (2018).
562. Jaworska, J., Ziemka-Nalecz, M., Sypecka, J. & Zalewska, T. The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxia-ischemia. *J. Neuroinflammation* **14**, 1–17 (2017).
563. Hablitz, L. M., Gunesch, A. N., Cravetchi, O., Moldavan, M. & Allen, C. N. Cannabinoid signaling recruits astrocytes to modulate presynaptic function in the suprachiasmatic nucleus. *eNeuro* **7**, (2020).
564. Colangelo, A. M., Alberghina, L. & Papa, M. Astroglisis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters* vol. 565 59–64 (2014).



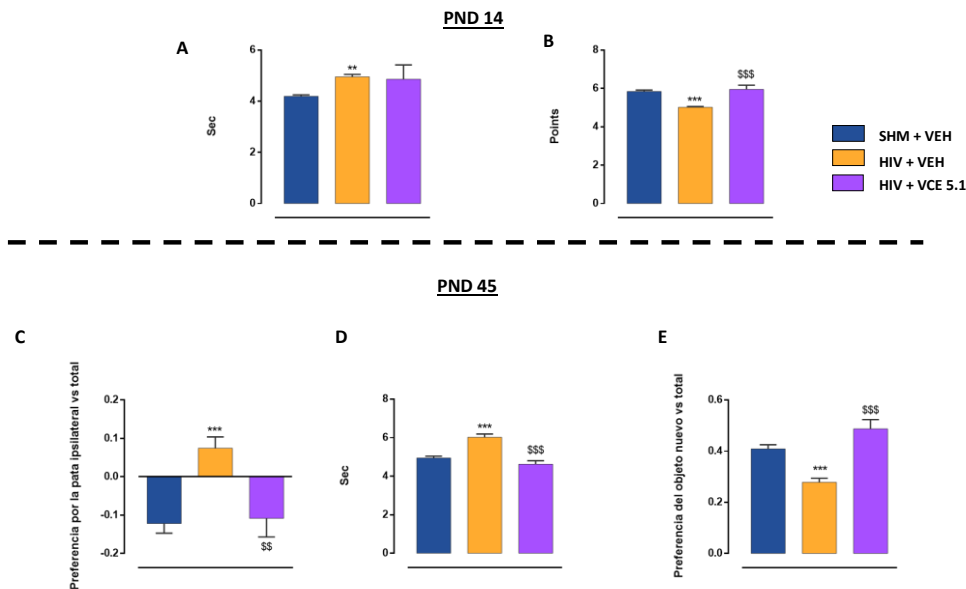


# **ANEXO**

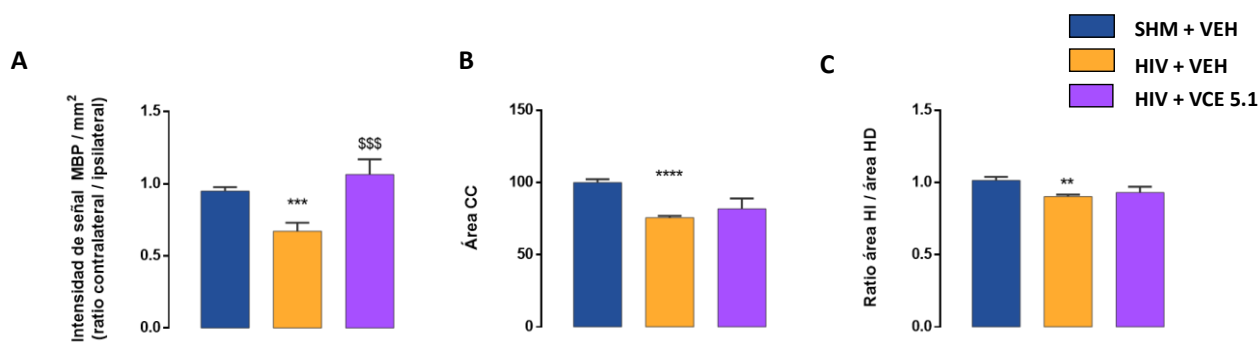




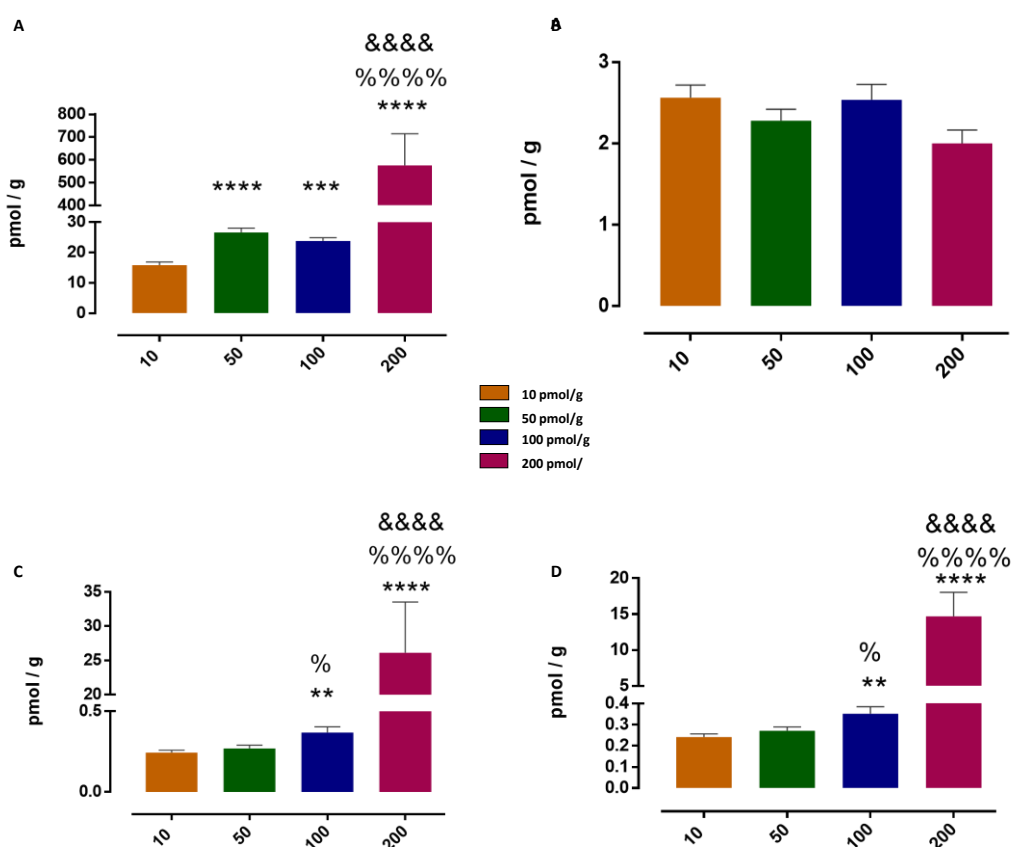
**Figura S1. Efecto del tratamiento con VCE 005.1 en la HIV.** La administración del fármaco no reduce el porcentaje de lesión ni su mantenimiento a lo largo del tiempo. (A) Porcentaje de lesión a PND 6 (B) Porcentaje de lesión a PND 45 (C) Estudios correlacionales de la lesión a corto y largo plazo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una T-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (§ respecto a los animales HIV + VEH). En la Fig. C, los datos no siguen una distribución normal, por lo que se realizó una correlación de Spearman. (N=8).



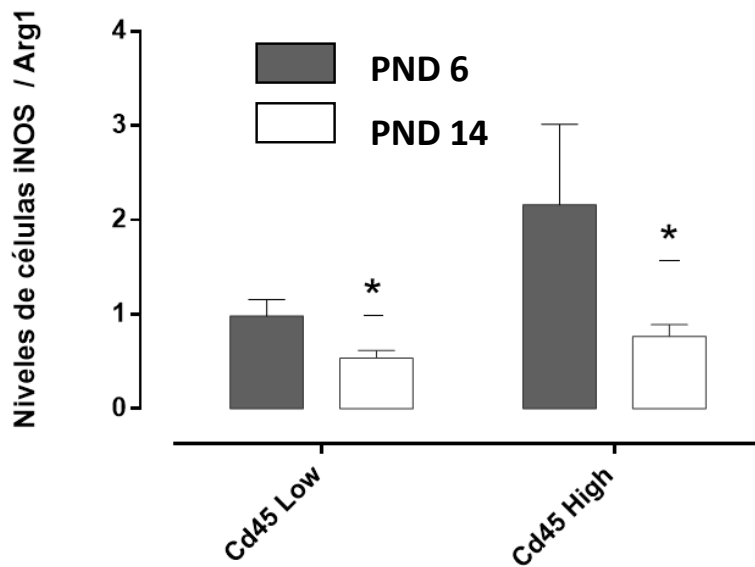
**Figura S2. El tratamiento con VCE 005.1 previene el déficit motor y cognitivo a medio y largo plazo.** (A) Segundos necesarios para que el animal gire 180° en una plataforma con una pendiente de 45°. (B) Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. (C) Preferencia por la pata ipsilateral. (D) Segundos (E) Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se utilizó no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; (§ respecto a los animales HIV + VEH). (N=8)



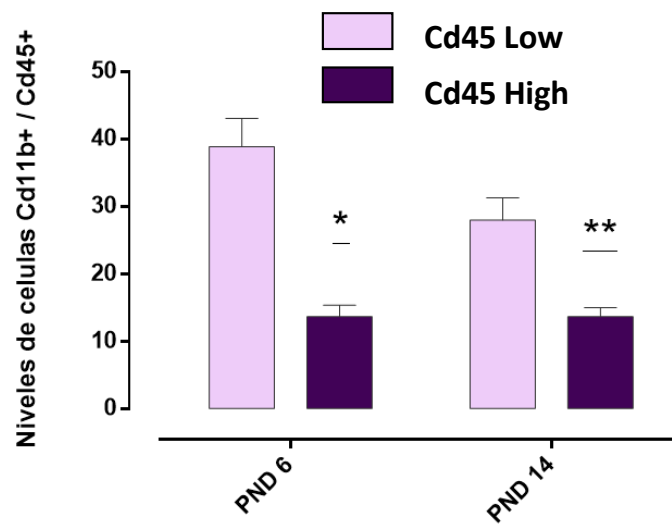
**Figura S3. Análisis del daño en la SB a largo plazo en el tratamiento con VCE 005.1.** El tratamiento con este compuesto previene parcialmente el daño en la SB a largo plazo. **(A)** Ratio de los niveles de intensidad de señal MBP en lado ipsilateral vs contralateral del CC. **(B)** Área del CC. **(C)** Ratio entre el área del hemisferio ipsilateral vs hemisferio contralateral. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se utilizó no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a los animales SHM + VEH; \$ respecto a los animales HIV + VEH) (N=8).



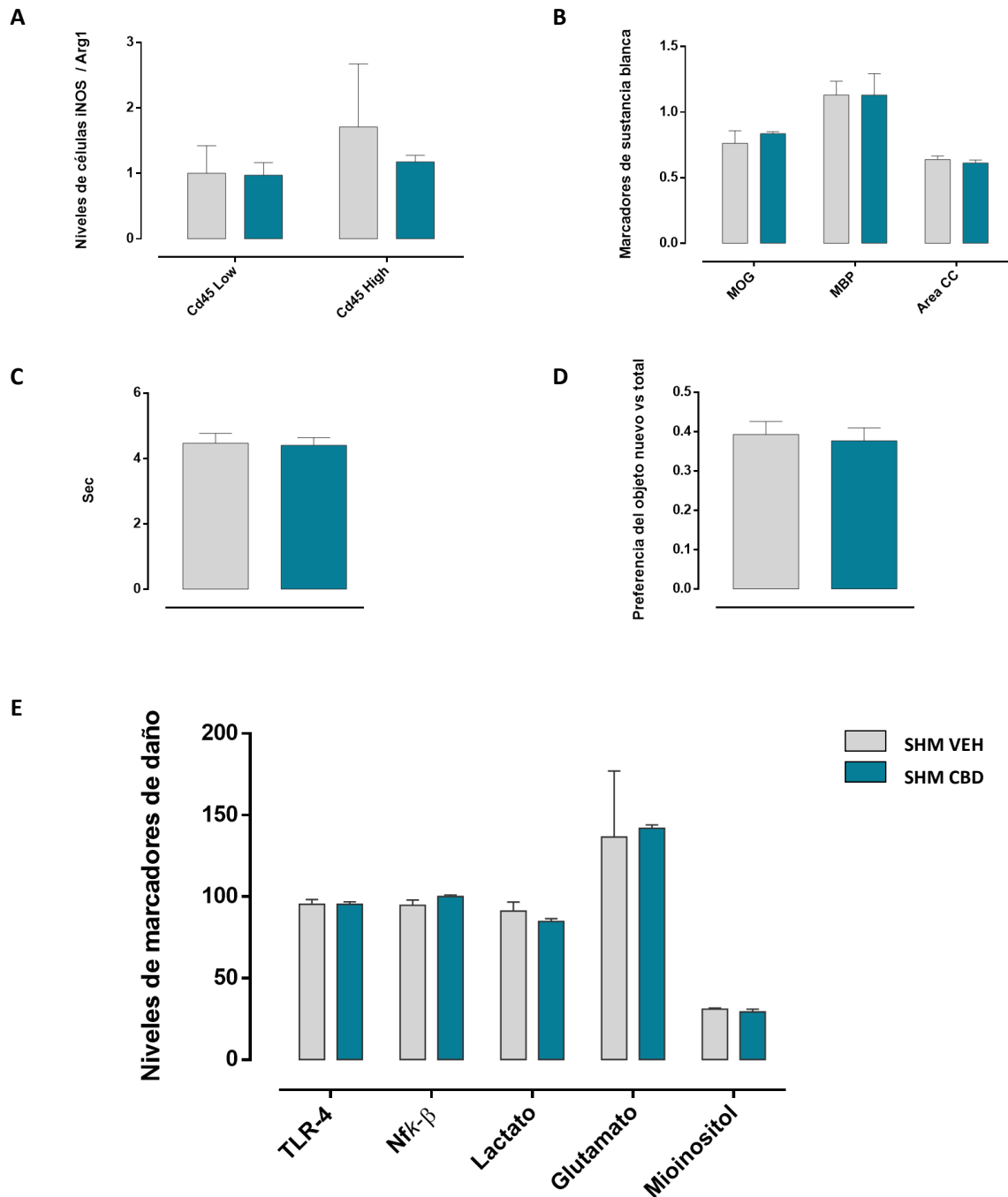
**Figura S4. Niveles de ECs en el cerebro de las crías cuyas madres fueron tratadas con una dosis variable de CBD.** El pretratamiento con CBD aumenta el tono endocannabinoide especialmente en concentraciones elevadas. **(A)** Niveles de AEA **(B)** Niveles de 2-ag **(C)** Niveles de PEA **(D)** Niveles de OEA. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se utilizó no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de un post-test de Dunn. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (\* respecto a la dosis de 10 mg/kg; % respecto a la dosis de 50 mg/kg; & respecto a la dosis de 100 mg/kg) (N=8)



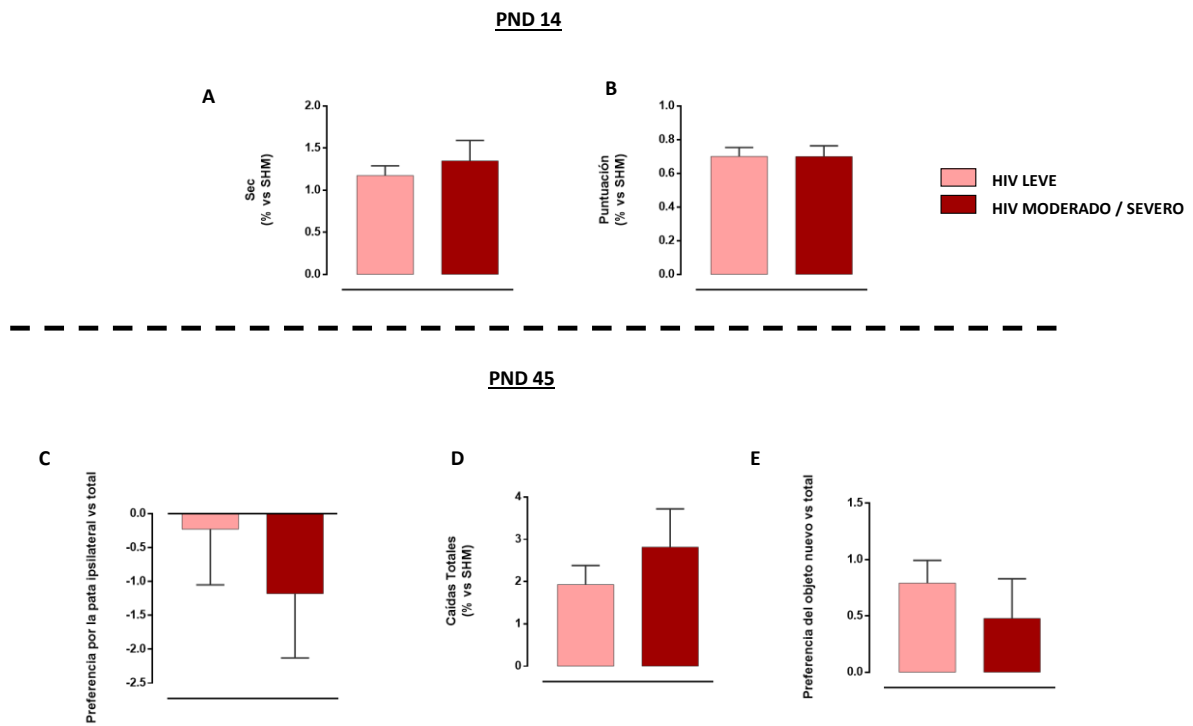
**Figura S5. Comparación entre los niveles de los niveles de iNOS / Arg-1 a corto y medio plazo en los controles.** Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una T-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a los niveles obtenidos a PND 14). (N=8)



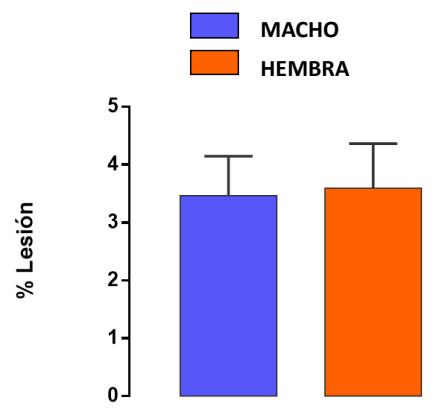
**Figura S6. Comparación entre los niveles de células Cd11b+ / Cd45 High y Low a corto y medio plazo en el grupo control.** Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una T-Student. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (\* respecto a la población Cd45 Low). (N=8)



**Figura S7. Comparación de los diferentes parámetros entre los controles tratados prenatalmente con vehículo o con CBD.** El pretratamiento con CBD no produce ninguna alteración conductual ni molecular en un individuo sano. **(A)** Niveles de expresión de iNOS / Arg-1. **(B)** Niveles de los marcadores de integridad de SB. **(C)** Tiempo en girar 180° en la prueba de la Geotaxia invertida. **(D)** Preferencia por el objeto nuevo en la prueba del NOR. **(E)** Niveles de expresión de los principales marcadores de daño. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante una T-Student. (N=8)



**Figura S8. Comparación entre los animales lesionados en función del grado de hemorragia a corto plazo.** No existen diferencias significativas entre el grupo HIV lesionado en función de su grado de lesión. **(A)** Segundos necesarios para que el animal gire 180° en una plataforma con una pendiente de 45°. **(B)** Suma de la puntuación del reflejo de Grip en todas las patas del animal. **(C)** Preferencia por la pata ipsilateral. **(D)** Segundos **(E)** Preferencia por el objeto nuevo. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante Mann-Whitney. (N=12)



**Figura S9. Comparación en el volumen de lesión entre sexos.** No existen diferencias entre machos y hembras en el volumen de lesión a PND 6. Los datos representados son la media de cada grupo  $\pm$  SEM. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante Mann-Whitney. (N=15)



## Índice de Figuras

Figura 1. Algoritmo utilizado para clasificar el subtipo de PCI según la Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (del inglés, SCPE).	22
Figura 2. Alteraciones en la madre durante el embarazo pueden afectar al correcto neurodesarrollo del individuo.	23
Figura 3. Mapa demográfico sobre los países con mayor porcentaje de casos de embarazos prematuros.	25
Figura 4. Comparación de prematuro (<37 semanas de gestación), bajo peso al nacer (<2500 gramos) y PEG (menos del percentil 10 de peso al nacer).	26
Figura 5. (A) Gráfica del porcentaje de casos prematuros extremos. (B) Gráficas del porcentaje mortalidad y morbilidad según el peso del RN. (C) Porcentaje de casos de PCI a causa de la inmadurez del RN	27
Figura 6. Grafica representativa de la incidencia en la mortalidad neonatal según el peso del RN (A) y la EG (B).	28
Figura 7. Distintos eventos que ocurren durante el desarrollo del cerebro en humanos.	29
Figura 8. Cerebro en sección coronal a las 28 semanas de gestación que muestra eventos críticos en el desarrollo cortical.	32
Figura 9. Integrantes de la UNV.	33
Figura 10. Integrantes de la BHE: Las Uniones Estrechas.	34
Figura 11. (A) Imagen representativa de los tipos de Hemorragias craneales que se producen en el ser humano. (B) Diagrama de la MG y las estructuras colindantes.	37
Figura 12. Imagen ilustrativa del tipo de daño según el grado de lesión. Adaptado de Hancock 1995	40
Figura 13. Esquema de la producción de DVPH en el PE y EBPN.	41
Figura 14. (A) Productos de degradación de la lisis de eritrocitos como consecuencia de la rotura de los vasos de la MG. La liberación de Fe produce una hiperproducción de radicales -OH que promueven el daño neuronal.	44
Figura 15. Esquema representativo de los receptores implicados en los procesos excitotóxicos y consecuencia de la liberación de Glutamato al interior del oligodendrocito.	47
Figura 16. Metabolismo de la adenosina y sus efectos sobre las OPC. Descripción general del metabolismo de la adenosina y las acciones inducidas por el receptor de adenosina sobre el desarrollo oligodendroglial.	48
Figura 17. Papel de la microglía en función de su fenotipo reparador o inflamatorio en diversas patologías.	50
Figura 18. Esquema de la activación de la vía proinflamatoria dependiente del receptor TLR-4 por la acción de los productos resultantes de la lisis de eritrocitos. La activación de este receptor promueve la translocación de NFκ-B y la síntesis de CKs, quemoquinas y enzimas con efecto citotóxico.	52
Figura 19. (A) Origen embrionario de los macrófagos y microglía (B) Marcadores representativos de cada fenotipo.	53
Figura 20. Alteración de la BHE como consecuencia de los componentes de la sangre	54
Figura 21. Esquema de las consecuencias a largo plazo producidas por la HIV	56
Figura 22. Interacciones entre las vías PPARγ y Nrf2.	62
Figura 23. Procesos fisiológicos principales en los que participa el SEC y función que desempeña.	64
Figura 24. Principales vías de síntesis y degradación del SEC	65
Figura 25. Propiedades neuroprotectoras del CBD en la EHI	68
Figura 26. Esquema representativo del Diseño Experimental 1	76
Figura 27. Esquema representativo del Diseño experimental 2	78
Figura 28. Esquema representativo del Diseño experimental 3	79
Figura 29. (A) Imagen del procedimiento quirúrgico (B) Imagen representativa de la MG en el cerebro de una rata Wistar PND1	81
Figura 30. (A) Imagen representativa del test de la Geotaxia invertida (B) Imagen representativa del test del Grasp (C) Imagen representativa del test del Grip	85

Figura 31. (A) Imagen representativa del CRT (B) Imagen representativa del BW (C) Imagen representativa del NOR	88
Figura 32. Selección de las poblaciones viables de microglía y macrófagos.	102
Figura 33. Ganancia de peso.	105
Figura 34. La inyección de Colagenasa de <i>Chlostridium</i> produce un daño variado que se mantiene a lo largo del tiempo.	106
Figura 35. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).	107
Figura 36. Número de células con marcaje NeuN <sup>+</sup> , GFAP <sup>+</sup> e Iba-1 <sup>+</sup> tanto en corteza como en estriado..	108
Figura 37. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión.	109
Figura 39. Análisis de la afectación sobre el linaje oligodendroglial a medio plazo por CF.	110
Figura 38. Marcadores de cada estadio madurativo del linaje oligodendroglial	110
Figura 40. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV llevado a cabo a PND 6.	112
Figura 41. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE.	113
Figura 42. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a PND 6.	114
Figura 43. Análisis por WB de los niveles de expresión de marcadores proinflamatorios.)	115
Figura 44. Relación entre la inflamación y el daño a nivel funcional y en la BHE.	116
Figura 45. Niveles de glutamato, lactato, mioinositol y oxidación proteica.	118
Figura 46. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV llevado a cabo a PND 6.)	119
Figura 47. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE.	120
Figura 48. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a PND 14.	121
Figura 49 Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios.	122
Figura 50. Imagen representativa de la posible extravasación de Gd en el grupo control y HIV llevado a cabo a PND 45.	123
Figura 51. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE.	124
Figura 52. Para medir la evolución de los niveles de de MMP9 y Mfsd2a a lo largo del tiempo.)	124
Figura 53. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a PND 45.	125
Figura 54. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a lo largo del tiempo.	126
Figura 55. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios.)	127
Figura 56. Evolución de los niveles de expresión de TLR-4 y Nfk-B a lo largo del tiempo.	128
Figura 57. Ganancia de peso.	129
Figura 58. Efecto del CBD administrado a las 6 horas después del daño sobre la lesión.)	130
Figura 59. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).	131
Figura 60. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.)	132
Figura 61. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento de CBD a las 6h.	133
Figura 62. Efecto del CBD administrado a las 6, 18 y 24 horas después del daño sobre la lesión.	135
Figura 63. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).	136
Figura 64. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento de CBD a las 6h.	137
Figura 65. Ganancia de peso.	138
Figura 66. Efecto del CBD administrado en múltiples dosis sobre la lesión.	139
Figura 67. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).	140
Figura 68. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.	141
Figura 69. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento de CBD en múltiples dosis.	142
Figura 70. Ganancia de peso.	144
Figura 71. Efecto del CBD administrado prenatalmente sobre el porcentaje de lesión..	145

<i>Figura 72. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).</i>	146
<i>Figura 73. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.</i>	147
<i>Figura 74. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento de CBD en múltiples dosis.</i>	148
<i>Figura 75. Ganancia de peso.</i>	149
<i>Figura 76. Efecto del CBD administrado de forma combinada sobre el porcentaje de lesión.</i>	150
<i>Figura 77. Puntuación de los test neuroconductuales realizados a medio (PND 14) y largo plazo (PND 45).</i>	151
<i>Figura 78. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios a largo plazo.</i>	152
<i>Figura 79. Análisis del daño en la SB a largo plazo y su relación con el volumen de lesión en el tratamiento de CBD en múltiples dosis.</i>	153
<i>Figura 80. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control, HIV + Veh y HIV + CBD llevado a cabo a PND 6.</i>	156
<i>Figura 81. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE.</i>	157
<i>Figura 82. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a PND 6.</i>	158
<i>Figura 83. Análisis por WB de los niveles de expresión de marcadores proinflamatorios.</i>	159
<i>Figura 84. Niveles de glutamato, lactato, mioinositol y oxidación proteica.</i>	160
<i>Figura 85. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV vehículo y CBD llevado a cabo a PND 14.</i>	161
<i>Figura 86. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE.</i>	162
<i>Figura 87. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a PND 14.</i>	163
<i>Figura 88. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores proinflamatorios.</i>	164
<i>Figura 89. Imagen representativa de la extravasación de Gd en el grupo control y HIV vehículo y CBD llevado a cabo a PND 45.</i>	165
<i>Figura 90. Análisis bioquímico de la expresión de marcadores de daño y permeabilidad de BHE.</i>	166
<i>Figura 91. Análisis por CF de los niveles de expresión CD11b / CD45 a PND 45.</i>	167
<i>Figura 92. Cambio en los niveles de expresión de marcadores inflamatorios a lo largo del tiempo.</i>	168
<i>Figura 93. Análisis de la afectación sobre el linaje oligodendroglial a medio plazo por CF.</i>	170
<i>Figura 94. Esquema representativo del desarrollo del daño en la HIV.</i>	184
<i>Figura 95. Efecto del CBD en la fisiopatología de la HIV.</i>	192
<i>Figura S2. El tratamiento con VCE 005.1 previene el déficit motor y cognitivo a medio y largo plazo.</i>	229
<i>Figura S1. Efecto del tratamiento con VCE 005.1 en la HIV.</i>	229
<i>Figura S3. Análisis del daño en la SB a largo plazo en el tratamiento con VCE 005.1.</i>	230
<i>Figura S4. Niveles de ECs en el cerebro de las crías cuyas madres fueron tratadas con una dosis variable de CBD.</i>	230
<i>Figura S5. Comparación entre los niveles de los niveles de iNOS / Arg-1 a corto y medio plazo en los controles.</i>	231
<i>Figura S6. Comparación entre los niveles de células Cd11b / Cd45 High y Low a corto y medio plazo en el grupo control.</i>	231
<i>Figura S7. Comparación de los diferentes parámetros entre los controles tratados prenatalmente con vehículo o con CBD.</i>	232
<i>Figura S9. Comparación en el volumen de lesión entre sexos.</i>	233
<i>Figura S8. Comparación entre los animales lesionados en función del grado de hemorragia a corto plazo.</i>	233

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Lista principales secuelas a corto y largo plazo como consecuencia de la prematuridad y del extremado bajo peso del RN.</i>	24
<i>Tabla 2. Papel de las distintas CKs en la fisiopatología de la HIV</i>	51
<i>Tabla 3. Modelos preclínicos que reproducen la HIV</i>	57
<i>Tabla 4. Esquema temporal de los distintos tratamientos con CBD en los Diseños Experimentales 2 y 3</i>	83
<i>Tabla 5. Relación de anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica</i>	95
<i>Tabla 6. Relación de anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunotinción</i>	98
<i>Tabla 7. Relación de anticuerpos utilizados en los ensayos de CF</i>	101
<i>Tabla 8. Niveles de CBD (pmol/mg) en tejido cerebral y en sangre en cada dosis administrada prenatalmente.</i>	143
<i>Tabla 9. Resumen de la comparación entre los diferentes tratamientos en las pruebas descritas anteriormente.</i>	155