



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Estudio del efecto del cannabidiol en monoterapia o en combinación
con antiepilépticos, en la expresión de crisis convulsivas generalizadas
recurrentes en rata**

TESIS

Que presenta:

M. EN C. CHRISTIAN LIZETTE FRÍAS SORIA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL

Directora de la Tesis:

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

Ciudad de México

Febrero, 2023

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio 8 del Departamento de Farmacobiología, ubicado en la Sede Sur del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. La dirección de esta tesis estuvo a cargo de la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta, Investigadora Cinvestav 3E y miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel III.

El trabajo fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

No. de Proyecto A3-S-26782

No. de Beca 704471

Adicionalmente agradezco a los Laboratorios HEMPMeds, LLC, USA por haber donado el cannabidiol utilizado durante el desarrollo del proyecto.

Dedicatoria

A mis padres, Yolanda Soria Arriola y Arturo Frías García, por su gran apoyo, cariño incondicional y por toda la dedicación que han mostrado a lo largo de mi formación profesional, ustedes han sido fundamentales para culminar este proceso.

A mi hermana Yolanda María del Carmen Frías Soria, por todos sus cuidados, por la paciencia, su apoyo y cariño infinitos. Por estar siempre pendiente de mis necesidades para lograr cada una de mis metas.

A mi hermano Arturo César Frías Soria que ha sido un ejemplo de fortaleza ante todos los retos personales y laborales que enfrenta día con día.

A Eunice Yolanda Badillo Frías por su paciencia, confianza y apoyo, sin importar las circunstancias.

A Francisco del Valle Orozco por sus cuidados y apoyo a pesar de las condiciones adversas.

A mis sobrinos, César Patricio Frías Hernández y Génesis Abigail Frías Hernandez, por ser ese incentivo que nos hace mejorar en todos los aspectos de la vida.

A CDK, Luz María Luna Flores y Patricia Janette Hernández Villegas, porque a pesar de su breve paso por mi vida me dejaron grandes enseñanzas y nuevos retos.

Agradecimientos

A la **Dra. Luisa L. Rocha Arrieta** por darme su orientación y apoyo para la toma de decisiones, por abrir nuevamente las puertas de su laboratorio, por todos los desvelos, su gran paciencia y dedicación. Pero sobre todo por la confianza y motivación que me brindó durante los momentos más difíciles.

A la **Dra. Sandra A. Orozco Suárez** y la **Dra. Mónica E. Ureña Elisa Guerrero**, gracias por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por dedicarme su tiempo, darme las herramientas y la orientación necesaria para realizar este trabajo.

A mis sinodales: **Dra. Claudia González Espinosa**, **Dra. Leticia Gómez Víquez** y **Dr. Francisco J. López Muñoz**, agradezco su gran paciencia y sus aportaciones para enriquecer constantemente este trabajo. Al **Dr. David Centurión Pacheco** y a la **Dra. Janet Murbartían Aguilar** por su cálida atención como coordinadores del Programa de Doctorado.

A la **Dra. Vinnitsa Buzoianu Anguiano**, el **Dr. José Luis Castañeda Cabral**, la **Q.F.I. Francia Carmona Cruz** y el **Dr. Daniel Pérez Pérez** muchas gracias por su amistad, por toda la paciencia para resolver todas y cada una de mis dudas (sin importar el día y la hora), por darme todas las facilidades para trabajar en las mejores condiciones.

A **Christopher Martínez Aguirre** y **Daniel Fonseca Barriendos**, gracias por hacerme sentir bienvenida en el laboratorio desde el primer momento, por su esfuerzo para hacerme una persona “más sociable”, por todo su apoyo. A **Cindy L. Santiago Castañeda**, **Alma Pinedo Rodríguez** y **Ángeles Nuñez Lumbreras**, son un ejemplo de fortaleza, constancia y dedicación. Gracias por ser las mejores maestras, la mejor compañía, las mejores compañeras de viaje. A **Adacrid Durán Colunga** y **Saúl Huerta de la Cruz** gracias por su amistad y todas esas pláticas terapéuticas. Amigos tienen todo mi cariño y admiración!

A **Guadalupe Valle Dorado**, **Marysol Segovia Oropeza**, **Martín Saenz Castro**, **Montserrat Fuentes Mejía**, **Félix I. López Presa**, aunque la convivencia fue breve, gracias por su confianza y sus comentarios en los seminarios.

A mis amigos de Centro Médico: **Josué**, **Angélica**, **Jared**, **Mayra**, **Stephany**, **Víctor** y **David**, gracias por adoptarme y hacerme sentir como en casa.

Agradezco el apoyo brindado por el personal del bioterio y al personal de vigilancia por brindarme siempre la mejor atención (a pesar de la hora).

Índice

Índice de Figuras	1
Índice de Tablas	1
Lista de abreviaturas	2
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1 Epilepsia	6
1.1.1 La severidad intrínseca de la epilepsia.....	7
1.1.2 Cambios cerebrales inducidos por la actividad epiléptica	8
1.1.3 Cambios inducidos en la barrera hematoencefálica – unión neurovascular por la actividad epiléptica.....	9
1.2 Cannabidiol y epilepsia	14
1.2.1 Farmacocinética del cannabidiol	14
1.2.2 Farmacodinamia del cannabidiol	16
1.2.3 Evidencias clínicas del uso del cannabidiol en epilepsias de difícil control	18
1.2.4 Evidencias preclínicas del uso de cannabidiol en el control de crisis generalizadas.....	19
2. Justificación	21
3. Hipótesis	21
3.1 Hipótesis 1	21
3.2 Hipótesis 2	21
4. Objetivos	22
5. Material y métodos	23
5.1 Metodología general	23
5.1.1 Animales.....	23
5.1.2 Habitación	23
5.1.3 Grupos Experimentales	23
5.1.4 Inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas, estado epiléptico y evaluación de la conducta	25
5.1.5 Ensayo cruzado.....	26
5.2 Western blot de proteínas de la barrera hematoencefálica ... 29	
5.3 Experimentos	32
5.3.1 Experimento 1: Caracterización de la actividad convulsiva durante la administración repetida de MP	32
5.3.2 Experimento 2: Evaluación del efecto de la administración aguda de CBD en animales sometidos a crisis convulsivas repetidas	32
5.3.3 Experimento 3: Caracterización de la actividad convulsiva durante la administración repetida de CBD	33
5.3.4 Experimento 4: Evaluación del efecto de la administración aguda y subcrónica de CBD en combinación con antiepilépticos	33

5.3.5	Experimento 5. Determinación de la expresión de las proteínas de la barrera hematoencefálica	33
5.4	Análisis de resultados	34
5.4.1	Experimentos 1 a 4	34
5.4.2	Experimento 5	34
6.	Resultados	35
6.1	Experimento 1. <i>La inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas incrementó la severidad de la actividad convulsiva</i>	35
6.2	Experimento 2: <i>La administración aguda de CBD redujo la prevalencia de estado epiléptico en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas</i>	36
6.3	Experimento 3: <i>La administración subcrónica de CBD redujo la prevalencia de estado epiléptico en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas</i>	36
6.4	Experimento 4: <i>La administración aguda de cannabidiol en combinación con fenobarbital mantuvo elevada la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico) en el grupo MP</i>	37
6.4.1	En animales del grupo CBD-MP, el fenobarbital evitó las crisis mayores y disminuyó la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico)	38
6.4.2	El cannabidiol en combinación con fenitoína en los animales del grupo MP exacerbó la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico)	38
6.4.3	En animales con antecedente de cannabidiol subcrónico la fenitoína evitó las crisis convulsivas mayores y mantuvo elevada la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico)	39
6.5	Experimento 5	41
6.5.1	La inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas se asoció a un incremento en la expresión de VEGF-A y claudina-5	41
6.5.2	La administración aguda de CBD se asoció a una expresión de eNOS similar a condiciones control e incrementó la expresión de claudina-5 en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas	42
6.5.3	La administración subcrónica de CBD evitó los efectos de las crisis convulsivas repetidas en la expresión de VEGF y eNOS	43
7.	Discusión	44
8.	Conclusiones	55
9.	Perspectivas y limitaciones	55
10.	Referencias	58

Índice de Figuras

Figura 1. Epilepsia y respuesta al tratamiento.....	6
Figura 2. El daño a la barrera hematoencefálica favorece la hiperexcitabilidad neuronal.....	12
Figura 3. La liberación de VEGF favorece la disrupción de la barrera hematoencefálica.....	13
Figura 4. Metabolismo del cannabidiol.....	15
Figura 5. Blancos moleculares del cannabidiol.....	17
Figura 6. Diseño experimental.....	24
Figura 7. Protocolo experimental usado para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en las ratas del grupo MP.....	28
Figura 8. Protocolo experimental usado para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en las ratas del grupo CBD-MP.....	29
Figura 9. Tejido procesado para la determinación de expresión de proteínas por la técnica de Western blot.....	30
Figura 10. Fase de intensidad máxima de actividad convulsiva y prevalencia de estado epiléptico durante las administraciones repetidas de MP.....	35
Figura 11. Fase de intensidad máxima de la actividad convulsiva y prevalencia de estado epiléptico durante el tratamiento subcrónico con cannabidiol.....	37
Figura 12. Expresión de VEGF-A y de proteínas asociadas a su vía transduccional en animales control vs animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas (grupo MP).....	41
Figura 13. Expresión de VEGF-A y de proteínas asociadas a su vía transduccional en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas tratados con una dosis única de CBD (grupo MP, 200 mg/kg v.o.).....	42
Figura 14. Expresión de VEGF-A y de proteínas asociadas a su vía transduccional en los animales de los grupos CBD-MP y CBD-MP.....	43
Figura 15. Reguladores de la expresión de claudina-5.....	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Proteínas de unión de la barrera hematoencefálica.....	11
Tabla 2. Farmacocinética del cannabidiol en diferentes especies.....	15
Tabla 3. Antiepilépticos que comparten blancos moleculares con el cannabidiol.....	18
Tabla 4. Escala de evaluación de crisis generalizadas.....	26
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los ensayos de western blot para determinar la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica.....	31
Tabla 6. Latencia y prevalencia de las crisis convulsivas menores y mayores y estado epiléptico.....	40

Lista de abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza
AKT	Protein kinase B; Proteína cinasa B
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> ; Trifosfato de adenosina
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	<i>Bovine seric albumin</i> ; Abúmina sérica bovina
CBD	Cannabidiol
Cmax	Concentración plasmática máxima
CYP450	Citocromo P450
EE	Error estándar
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; Ensayo de inmunoabsorción acoplado a actividad enzimática
EMA	<i>European Medicines Agency</i> ; Agencia Europea de Medicamentos
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> ; Óxido nítrico sintasa endotelial
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> ; Ácido gamma-aminobutírico
GABA-T	<i>Gamma-aminobutyric acid-transaminase</i> ; Ácido gamma-aminobutírico transaminasa
GAD	<i>Glutamic acid decarboxylase</i> ; Glutamato descarboxilasa
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i> ; Factor inducible por hipoxia
IL	<i>Interleukin</i> ; Interleucina
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i> ; Liga Internacional Contra la Epilepsia
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i> ; Moléculas de adhesión de unión
i.p.	Intraperitoneal
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MP	<i>3-Mercaptopropionic acid</i> ; Ácido 3-Mercaptopropiónico
NO	Nitric oxide; Óxido nítrico
PB	<i>Phenobarbital</i> ; Fenobarbital

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Solución salina amortiguada por fosfatos
PHT	<i>Phenytoin</i> ; Fenitoína
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase; fosfatidilinositol-3–cinasa <i>Polyvinylidene fluoride</i> ; Fluoruro de polivinilideno
RIPA	<i>Radio immunoprecipitation assay buffer</i> ; Solución amortiguadora de radio inmunoprecipitación
SE	<i>Status epilepticus</i> ; Estado epiléptico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio
SS	Solución de cloruro de sodio al 0.9%
T20	Tween 20
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> ; Solución salina amortiguada con Tris
Tmax	Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGF-R	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> ; Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
VEH	Vehículo
Vm	Vida media
v.o.	Vía oral
WV	<i>WestVision Block and Diluent</i> ; Bloqueador y diluyente WestVision
ZO-1	<i>Zonula occludens</i>

Resumen

Las crisis convulsivas severas recurrentes se asocian al desarrollo de estado epiléptico y farmacorresistencia, por lo que existen gran interés en identificar fármacos que eviten dicha progresión. Además, diversos estudios sugieren una relación entre la severidad de la epilepsia y el daño a la barrera hematoencefálica. El cannabidiol (CBD) es un fármaco con propiedades anticonvulsivas, antiinflamatorias y neuroprotectoras. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de CBD en monoterapia o en combinación con antiepilépticos en la expresión y severidad de la actividad convulsiva; así como los efectos del CBD en la expresión de proteínas de la BHE. **Metodología:** Grupo MP: Ratas Wistar macho recibieron ácido 3-mercaptopropiónico (MP) i.p. cada 12 h por 5 días para inducir crisis convulsivas generalizadas repetidas. Los animales fueron sometidos a un ensayo cruzado, recibiendo CBD (200 mg/kg v.o.), fenitoína (PHT 75 mg/kg i.p.), fenobarbital (PB 15 mg/kg i.p.) en monoterapia y en combinación. Grupo CBD-MP: Las ratas se manipularon como el grupo MP, con la diferencia de que recibieron CBD (50 mg/kg v.o.) durante la inducción de crisis convulsivas repetidas. Grupo control: Las ratas se manipularon como el grupo MP, con la diferencia de que recibieron solución fisiológica (1 ml/kg/día i.p.) en lugar de MP. La administración de MP indujo crisis convulsivas mayores y menores. El estado epiléptico registrado durante las últimas administraciones se consideró como un marcador de severidad. La expresión de proteínas de la BHE en animales control se comparó con la de animales que recibieron tratamiento agudo y subcrónico con CBDI. **Resultados:** El CBD no modificó la expresión de las crisis convulsivas, pero redujo la prevalencia de estado epiléptico en ambos grupos experimentales. PHT disminuyó la expresión de crisis convulsivas mayores pero no modificó la prevalencia de estado epiléptico (grupos MP y CBD-MP). El CBD combinado con PHT no modificó estos efectos. El PB disminuyó la expresión de crisis convulsivas mayores, un efecto más evidente cuando se combinó con CBD (grupos MP y CBD-MP). La combinación de PB y CBD redujo la expresión de estado epiléptico en el grupo CBD-MP. La mortalidad en los grupos MP y CBD-MP al final del ensayo cruzado fue de 30% y 9% respectivamente ($p=0.2$). La inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas incrementó significativamente la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y claudina-5 (CLD-5). El tratamiento con cannabidiol incrementó significativamente la expresión de CLD-5 en ambos grupos experimentales (MP y CBD-MP). Mientras que el grupo con antecedente de tratamiento subcrónico (grupo CBD-MP) mostró una expresión del VEGF similar al grupo control. **Conclusiones:** El tratamiento subcrónico con CBD reduce la severidad de la actividad convulsiva e induce cambios en la expresión de VEGF y CLD-5. Adicionalmente, cuando el CBD subcrónico se asocia a fármacos anticonvulsivos apropiados reduce la expresión de crisis convulsivas mayores. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para identificar las consecuencias funcionales de los cambios de expresión de VEGF y CLD-5 y su posible relación con la expresión/severidad de la actividad convulsiva.

Abstract

Recurrent and high frequency severe seizures facilitate the drug resistant phenotype in epilepsy and status epilepticus, so there is great interest in identifying drugs that prevent such progression. Several studies suggest a relationship between the severity of epilepsy and blood-brain barrier (BBB) disruption. Cannabidiol (CBD) is a drug with anticonvulsant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. The aim of this study was to evaluate the effects of cannabidiol alone or in combination with antiseizure drugs in the expression of recurrent generalized seizures in a rat model; as well as the effects of CBD on the expression of BBB proteins. **Methodology:** MP group: Male Wistar rats received 3-mercaptopropionic acid (MP) i.p. every 12 h for 5 days to induce recurrent generalized seizures. Thereafter, the animals were submitted to a crossover protocol to receive different treatments with CBD (200 mg/kg p.o.), phenytoin (PHT 75 mg/kg i.p.) and phenobarbital (PB 15 mg/kg i.p.), alone and in combination. CBD-MP group: Rats were manipulated as MP group, but they received CBD during the induction of recurrent seizures. Control group: Rats were handled as the MP group, but they received saline solution (1 ml/kg/día i.p.) instead of MP. Minor and major seizures were induced after each MP administration. Status epilepticus (SE) detected during the last MP administrations was considered a sign of high seizure severity. Moreover, the BBB proteins expression of the animals with acute administration (MP group) and subchronic administration of CBD (CBD-MP group), was compared with the control group. **Results:** CBD did not modify the expression of the MP induced seizures but reduced the prevalence of SE in both experimental groups. PHT decreased the expression of major seizures but did not modify the prevalence of SE (MP and CBD-MP groups). CBD combined with PHT did not modify these effects. PB diminished the expression of major seizures, an effect more evident when combined with CBD (MP and CBD-MP groups). The combination of PB and CBD reduced the expression of SE of group CBD-MP. The mortality rate of MP and CBD-MP groups at the end of the crossover protocol was 30% and 9%, respectively ($p=0.2$). Induction of repeated generalized seizures significantly increased the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and claudin-5 (CLD-5). CBD significantly increased the expression of claudin-5 (CLD-5) in both experimental groups (MP and CBD-MP). While, the history of subchronic treatment (CBD-MP group) was related to a VEGF expression similar to the control group. **Conclusions:** Subchronic treatment with CBD reduces the seizure severity and induces changes in VEGF and CLD-5 expression. Additionally, when subchronic CBD is associated with appropriate anticonvulsant drugs, it reduces the expression of major seizures. However, further studies are required to identify the functional consequences of changes in VEGF and CLD-5 expression and their possible relationship with the expression/severity of seizure activity.

1. Introducción

1.1 Epilepsia

La epilepsia es una enfermedad neurológica que afecta a aproximadamente 50 millones de personas a nivel mundial (World Health Organization, 2019). Este padecimiento se caracteriza por la sincronización anormal de una población de neuronas, que ocurre de forma recurrente y espontánea. Estos eventos tienen consecuencias neurobiológicas, psicológicas y cognitivas (Fisher et al., 2014), sin embargo, las repercusiones trascienden más allá del individuo que la padece. La severidad de la enfermedad y la falta de respuesta al tratamiento (Fig. 1) tienen gran impacto a nivel económico (Beghi, Garattini, Ricci, Cornago, & Parazzini, 2004; Tetto et al., 2002) y familiar (Jakobsen & Elklit, 2021). Adicionalmente, estos factores también incrementan el riesgo de muerte asociada a epilepsia (Devinsky, 2022; Hesdorffer et al., 2011; Kothare & Trevathan, 2018).

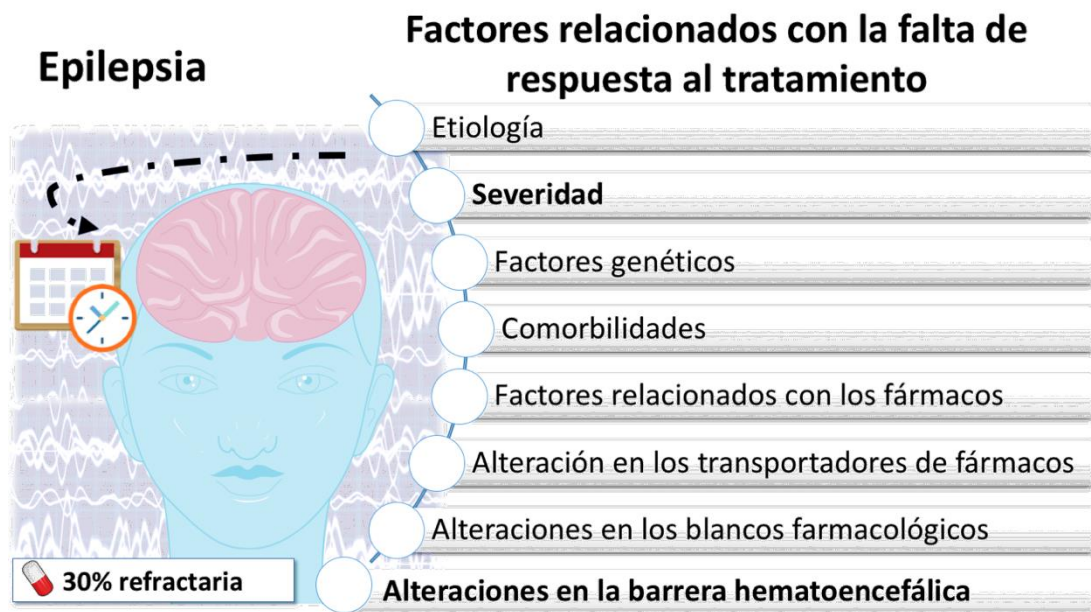


Figura 1. Epilepsia y respuesta al tratamiento.

En la epilepsia existe una predisposición al desarrollo de crisis epilépticas de manera recurrente y espontánea. Las crisis epilépticas son la manifestación clínica de la sincronización anormal de una población de neuronas. Aproximadamente la tercera parte de los pacientes no logra el control del padecimiento a pesar del tratamiento adecuado, esta falta de respuesta está influenciada por diversos factores (Löscher et al., 2020). Para fines de este estudio destacan la severidad de la epilepsia y las alteraciones en la barrera hematoencefálica.

1.1.1 *La severidad intrínseca de la epilepsia*

El objetivo principal del tratamiento es el control de las crisis epilépticas con un mínimo de efectos adversos, sin embargo, esto no es posible en todos los casos (Wolfgang Löscher, 2002). Hasta un tercio de los pacientes no logra alcanzar la libertad de crisis a pesar de la prescripción adecuada y el apego al tratamiento. Uno de los factores que podría ser determinante en la respuesta terapéutica es la severidad del padecimiento, ya que se considera que las epilepsias más severas son más difíciles de tratar. La hipótesis de la severidad intrínseca de la epilepsia se basa en estudios clínicos y preclínicos que han permitido establecer una asociación entre una alta frecuencia de crisis y el desarrollo de farmacorresistencia (Rogawski, 2013; Rogawski & Johnson, 2008). Hasta el momento, se han diseñado múltiples instrumentos para evaluar clínicamente la severidad de la epilepsia, en los cuales se han considerado factores adicionales a la frecuencia de las crisis (Todorova, Velikova, Kaprelyan, & Tsekov, 2013). Aunque estas escalas a menudo son subjetivas y no existe un consenso respecto a su aplicación, hay elementos en común que es posible monitorear, como el tipo de crisis epilépticas (p. Ej. crisis convulsivas generalizadas), su duración e intensidad (Beniczky, Arbune, Jeppesen, & Ryvlin, 2020; Cramer & French, 2008).

Se ha sugerido que la duración de las crisis epilépticas podría ser un buen marcador de severidad, ya que las crisis epilépticas prolongadas favorecen el deterioro funcional del paciente (Claassen, Lokin, Fitzsimmons, Mendelsohn, & Mayer, 2002; Cramer & French, 2008). Por lo general, las crisis epilépticas son breves y autolimitadas (Betjemann & Lowenstein, 2015), debido a que durante el transcurso de éstas se desencadenan mecanismos homeostáticos que reducen la excitabilidad (Kovács et al., 2018). Sin embargo, en ocasiones puede presentarse una falla en el inicio de los mecanismos responsables de la terminación de la crisis epilépticas, perpetuando la hiperexcitabilidad y generando en consecuencia un estado epiléptico (Trinka et al., 2015). Dado que la presentación de estado epiléptico

se asocia a una alta morbi-mortalidad, éste se considera como la máxima expresión de la epilepsia (Walker, 2018).

Se ha propuesto que las crisis epilépticas severas recurrentes no solo facilitan el fenotipo farmacorresistente (Rogawski, 2013; Rogawski & Johnson, 2008), sino que favorecen la presentación de estado epiléptico (Lambrechtsen & Buchhalter, 2008; Sánchez Fernández et al., 2014). Estas implicaciones tienen sustento en estudios preclínicos que muestran que las crisis convulsivas repetidas producen un incremento progresivo de su severidad (Auzmendi et al., 2014; Ferland & Applegate, 1998; Szot et al., 2001) y eventualmente conducen a estado epiléptico (Auzmendi et al., 2014; Girardi, González, & Lazarowski, 2005).

1.1.2 Cambios cerebrales inducidos por la actividad epiléptica

Es posible que la progresión de la severidad sea consecuencia de los cambios bioquímicos, anatómicos y funcionales producidos por las crisis convulsivas repetidas (Cole, Koh, & Zheng, 2002; Kälviäinen & Salmenperä, 2002; Löscher & Friedman, 2020; Meldrum, 2001).

1.1.2.1 Neuroinflamación inducida por la actividad epiléptica

La inflamación es un proceso fisiológico que se desencadena en respuesta a un estímulo dañino, sin embargo, las alteraciones en su regulación se han relacionado con la progresión de enfermedades como la epilepsia. Cuando el proceso inflamatorio ocurre en el sistema nervioso central (SNC), participan astrocitos, neuronas, células endoteliales de la barrera hematoencefálica y células de la microglia. Dichas células liberan mediadores como la IL-1 β y TNF- α que favorecen la respuesta inflamatoria y son capaces de modificar la excitabilidad neuronal (Vezzani, Balosso, & Ravizza, 2008; Vezzani, French, Bartfai, & Baram, 2011; Vezzani & Granata, 2005; Vezzani, Ravizza, Balosso, & Aronica, 2008). La hiperexcitabilidad neuronal generada por las crisis epilépticas induce un proceso

neuroinflamatorio que se asocia a resistencia farmacológica (Kumar et al., 2022) y al incremento en la severidad de la enfermedad (frecuencia y duración de las crisis) (Löscher et al., 2020; Vezzani, Balosso, & Ravizza, 2019).

1.1.2.2 Plasticidad neuronal

Las crisis convulsivas de difícil control favorecen la formación de circuitos hiperexcitables que incrementan su actividad con el paso del tiempo (Fang, Xi, Wu, & Wang, 2011). La remodelación de circuitos neuronales secundaria a las crisis convulsivas repetidas genera cambios a largo plazo que inducen la formación de conexiones aberrantes. Los cambios en la plasticidad neuronal han sido caracterizados principalmente en modelos de crisis convulsivas secundariamente generalizadas (Pitkänen & Sutula, 2002). Este es el caso del kindling amigdalino, en donde se ha observado que los estímulos eléctricos subconvulsivos repetidos facilitan la propagación a estructuras como el tálamo y la corteza frontal. Estos cambios en la plasticidad de los circuitos neocórtico-límbicos se asocian estrechamente a la progresión de la severidad de las crisis convulsivas (intensidad máxima y duración) (Blumenfeld et al., 2007). Por otra parte, la inducción de crisis generalizadas repetidas en la edad temprana se ha vinculado con la reorganización de circuitos sinápticos en el hipocampo que incrementan la susceptibilidad a la presentación de crisis convulsivas en la edad adulta, además de producir alteraciones en el aprendizaje y la memoria (Holmes, Gairsa, Chevassus-Au-Louis, & Ben-Ari, 1998).

1.1.3 Cambios inducidos en la barrera hematoencefálica – unión neurovascular por la actividad epiléptica

La microvasculatura cerebral tiene características únicas que le permiten regular el paso de moléculas y células del sistema inmune desde la

circulación sanguínea hacia el parénquima celular. Las células endoteliales de la barrera hematoencefálica carecen de fenestraciones y cuentan con uniones adherentes y uniones estrechas que les permiten regular de forma dinámica su permeabilidad paracelular (Hawkins & Davis, 2005). Tanto las uniones estrechas como las uniones adherentes, están conformadas por diversas proteínas transmembranales que interactúan con proteínas intracelulares de andamiaje (Tabla 1). La composición de estas proteínas en la microvasculatura cerebral y la comunicación cruzada (cross-talk) que se establece entre éstas es fundamental para la integridad y el adecuado funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Tietz & Engelhardt, 2015). Destaca entre ellas la claudina-5, proteína esencial para la supervivencia que regula la permeabilidad paracelular de moléculas de bajo peso molecular (Nitta et al., 2003).

El endotelio y la membrana basal actúan como una barrera física permitiendo una estricta regulación del microambiente cerebral (Xu, Nirwane, & Yao, 2019). La membrana basal está compuesta por un complejo proteico que además de dar soporte estructural, tiene componentes que participan en vías de señalización relacionadas con crecimiento, diferenciación y migración celular (Yurchenco, 2011). Adicionalmente, las células endoteliales se encuentran en estrecha relación con astrocitos, pericitos y neuronas, conformando la unión neurovascular. Esta interacción tiene gran importancia para mantener la integridad de la barrera y modular el flujo sanguíneo cerebral (Bennett & Kim, 2021; Iadecola, 2017). La maduración de la barrera hematoencefálica (barriergénesis) requiere la formación de membrana basal, uniones estrechas y uniones adherentes. Este proceso está finamente regulado por el microambiente cerebral, por lo que en condiciones patológicas se puede alterar el equilibrio entre la proliferación de células endoteliales (angiogénesis) y la barriergénesis (Umans et al., 2017; van Lanen et al., 2021).

Tabla 1. Proteínas de unión de la barrera hematoencefálica

Uniones estrechas	Uniones adherentes	Proteínas intracelulares de andamiaje
Claudinas CLD-1, CLD-2, CLD-3, CLD-5, CLD-11, CLD-12	Cadherinas E-cadherina, VE-cadherina, N-cadherina	Cateninas p120-catenina, α -catenina, β -catenina, γ -catenina
Occludina		
Moléculas de adhesión de la unión JAM-A (1), JAM-B (2), JAM-C (3)	Fosfotirosina fosfatasa específica endothelial VE-PTP	Zonula occludens ZO-1, ZO-2, ZO-3
Tricelulina	Nectina	

Es importante señalar que existe una gran diversidad en el origen, la composición molecular, la función y disposición de las distintas células que conforman la unión neurovascular. Esto, aunado a la variabilidad regional en la densidad y el diámetro de los capilares, le confiere diferencias funcionales (Noumbissi, Galasso, & Stins, 2018; Wilhelm, Nyúl-Tóth, Suciú, Hermenean, & Krizbai, 2016). Sin embargo, debido a que los procesos patológicos generan modificaciones en el microambiente cerebral aún quedan muchos aspectos por dilucidarse.

Diversos estudios indican que la inducción de crisis convulsivas produce disrupción transitoria de la barrera hematoencefálica y extravasación de albúmina (Nitsch & Klatzo, 1983; Sahin, Ilbay, & Ates, 2003; Sokrab, Kalimo, & Johansson, 1989). Este compromiso en la integridad de la barrera se ha relacionado con cambios a largo plazo en la excitabilidad neuronal (Fig. 2) (Ivens et al., 2007; Seiffert, 2004).

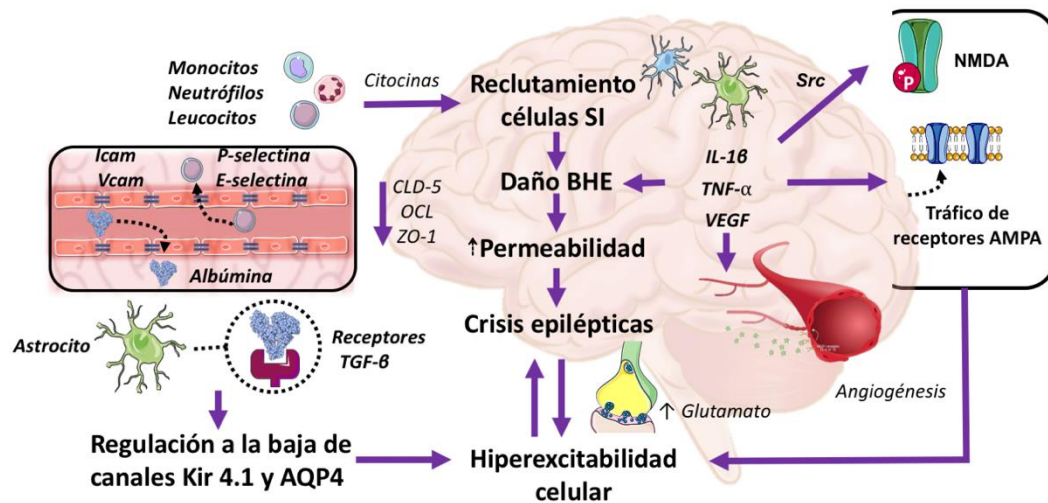


Figura 2. El daño a la barrera hematoencefálica favorece la hiperexcitabilidad neuronal. En el cerebro con epilepsia se establece un círculo vicioso en el que las alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica facilitan la presentación de crisis convulsivas generando inflamación, daño y en consecuencia más crisis convulsivas. La actividad convulsiva favorece la activación endotelial, la expresión de moléculas de adhesión (Icam, Vcam, P-selectina, E-selectina) promueve el reclutamiento e ingreso de células de sistema inmune. Los astrocitos y microglía activada liberan IL-1 β , TNF- α y VEGF; en consecuencia hay cambios en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas. Adicionalmente, la liberación de VEGF induce la formación de vasos aberrantes que exacerban las alteraciones en la permeabilidad. El incremento en la permeabilidad permite el paso de moléculas como la albúmina, la cual es capaz de activar al receptor de TGF- β . Este evento genera alteraciones en la regulación del potasio favoreciendo la hiperexcitabilidad neuronal mediada por receptores NMDA (Wolfgang Löscher, 2020). Por otra parte, tanto la IL-1 β como el TNF- α pueden favorecer la neurotransmisión glutamatérgica a través de la fosforilación de receptores NMDA (Viviani et al., 2003) e incremento en la disponibilidad de receptores AMPA (Leonoudakis et al., 2004).

Por otra parte, estudios recientes sugieren que la disfunción de la barrera hematoencefálica de pacientes con epilepsia resistente a fármacos, se asocia a cambios en la expresión de proteínas de las uniones estrechas y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Castañeda-Cabral et al., 2020). Evidencias en modelos animales y pacientes con epilepsia indican que durante las crisis convulsivas e incluso en el periodo post-ictal hay hipoperfusión e hipoxia tisular (Farrell et al., 2016; Tran, George, Teskey, & Gordon, 2020). Esta situación, aunada al incremento en la actividad neuronal, pueden dar lugar al incremento de factores angiogénicos como el VEGF (van Lanen et al., 2021). La interacción del VEGF con su receptor

VEGF-R2 incrementa la permeabilidad vascular (Fig. 3). Este círculo vicioso que se establece incrementa la severidad intrínseca de la enfermedad (Wolfgang Löscher et al., 2020), puesto que el daño a la barrera hematoencefálica es capaz de generar crisis epilépticas, contribuye al proceso de epileptogénesis y favorece el sostenimiento de las crisis epilépticas (Marchi & Lerner-Natoli, 2013).

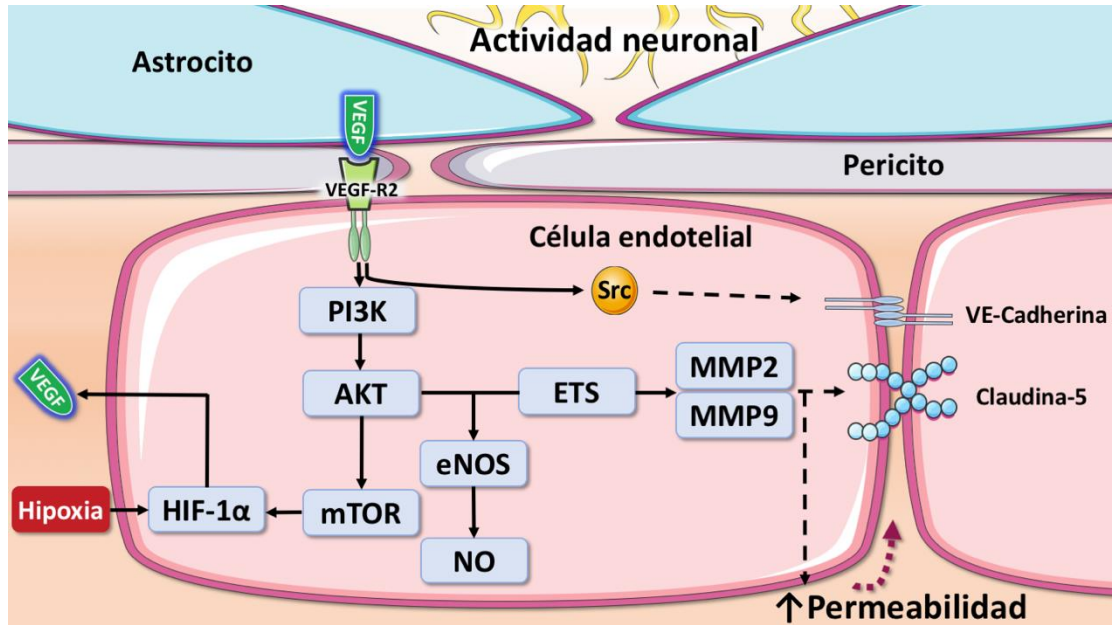


Figura 3. La liberación de VEGF favorece la disrupción de la barrera hematoencefálica. La hiperexcitabilidad neuronal y la hipoxia inducida durante las crisis favorecen la liberación de VEGF. La activación del receptor 2 (VEGF-R2) en la célula endotelial produce la activación de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) que fosforila a la cinasa AKT y a su vez fosforila a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) incrementando la producción de óxido nítrico. Adicionalmente AKT puede activar al factor de transcripción ETS e inducir en consecuencia a las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP2 y MMP9), produciendo la degradación de claudina-5 y en consecuencia incrementando la permeabilidad. Modificado de Van Lanen et al (2021).

Tanto en pacientes como en modelos animales de epilepsia focal se han descrito cambios en la expresión del VEGF (Rigau et al., 2007), por lo que se ha sugerido la utilidad de un tratamiento anti-VEGF para evitar los cambios progresivos en este tipo de epilepsia (Morin-Brureau, Rigau, & Lerner-Natoli, 2012). Benini et al. (2016) observaron que el tratamiento con sunitinib (inhibidor tirosina-cinasa de receptores VEGF-R1, VEGF-R2, PDGF-R β) evita las crisis espontáneas post-estado epiléptico en el modelo de litio-

pilocarpina. Sin embargo, dado que el VEGF es un factor neurotrófico importante identificar recursos terapéuticos que permitan modular la acción del VEGF, así como los posibles cambios en su expresión por la inducción de crisis generalizadas.

1.2 Cannabidiol y epilepsia

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide no psicotrópico de la planta del género *Cannabis*, que tiene dos subespecies principales *Cannabis sativa* y *Cannabis indica*. Los primeros esfuerzos por aislar los componentes de la planta llevaron a su hallazgo incidental en el siglo pasado (Adams et al., 1941a; Adams et al., 1941b; Adams et al., 1940a; Adams et al., 1940b; Jacob & Todd, 1940), sin embargo, su estructura actual fue caracterizada hasta los años 60 (Mechoulam & Shvo, 1963).

1.2.1 Farmacocinética del cannabidiol

Actualmente existen pocos estudios que evalúen la farmacocinética del cannabidiol (administrado en monoterapia) en humanos sanos (Millar, Stone, Yates, & O'Sullivan, 2018). Los parámetros farmacocinéticos del cannabidiol varían con respecto a la dosis y la vía de administración (Tabla 2).

Adicionalmente, la variabilidad individual en la farmacocinética del fármaco está influenciada por el sexo y la composición corporal de los sujetos participantes en los estudios clínicos (Williams et al., 2021). Cuando la administración es por vía oral, tiene una baja biodisponibilidad (6%) ya que experimenta efecto de primer paso hepático e intestinal (Itin et al., 2020). Aunque la ingesta de alimentos incrementa la concentración plasmática y la biodisponibilidad del cannabidiol y sus metabolitos (7-COOH-CBD y 7-OH-CBH) (Birnbaum et al., 2019; Crockett et al., 2020; Taylor et al., 2018), se han realizado diversos esfuerzos para mejorar las formas farmacéuticas (Atsmon, Heffetz, Deutsch, Deutsch, & Sacks, 2018; Knaub et al., 2019).

Tabla 2. Farmacocinética del cannabidiol en diferentes especies

Especie	Vía	Dosis (promedio)	Tmax (h)	Cmax (ug/ml)	Vm (h)	Referencia
Humano	Oral	1.5-20 mg (14±15 mg)	1.9±1.2	0.0028 ± 0.0022	1.09- 1.97	(Atsmon et al., 2018; Crockett, et al., 2020; Nelson et al., 2020)
		100-800 mg (525±340 mg)	3.1±0.3	0.131 ± 0.082	3.6- 41.3	
	Inhalación	1.5-20 mg (3.5±5.5 mg)	0.3±0.3	0.0353 ± 0.0413	≈ 2	
Rata	Oral	120 mg/kg	2 a 6	2-3.2	4-4.6	(Deiana et al., 2012)
	i.p.	120 mg/kg	0.5 a 2	2.4-2.6	7.75- 10.1	
Ratón	Oral	120 mg/kg	1	2.2	2-6	
	i.p.	120 mg/kg	2	14.3	4-24	

Cmax: Concentración plasmática máxima; i.p.: Intraperitoneal; Tmax: Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima; Vm: Vida media

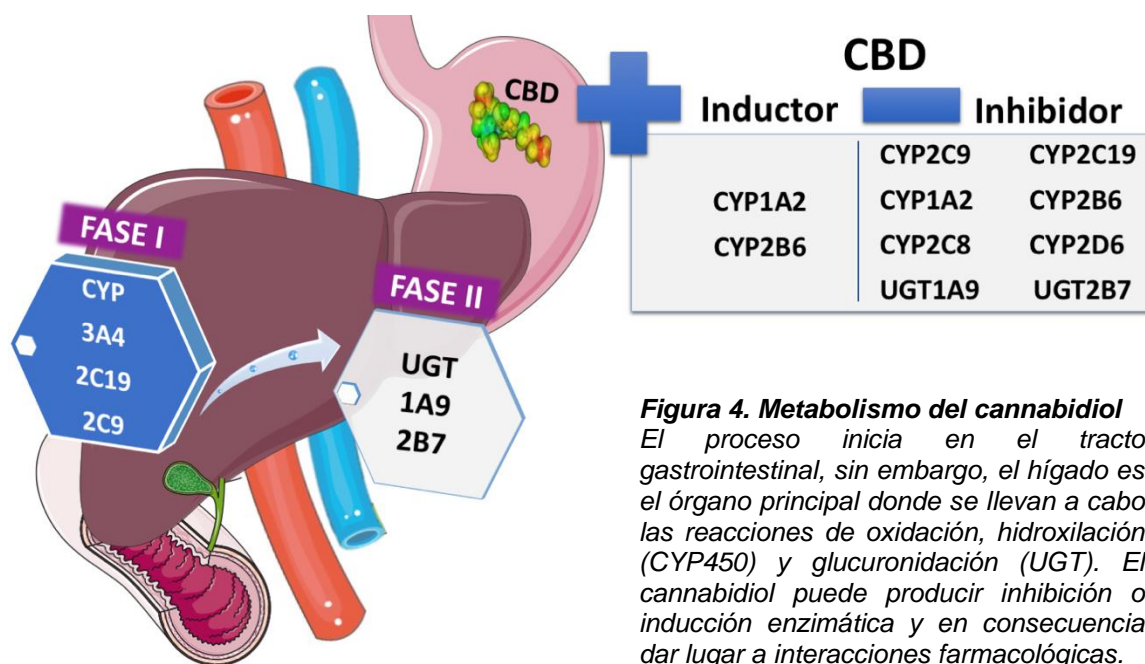


Figura 4. Metabolismo del cannabidiol
El proceso inicia en el tracto gastrointestinal, sin embargo, el hígado es el órgano principal donde se llevan a cabo las reacciones de oxidación, hidroxilación (CYP450) y glucuronidación (UGT). El cannabidiol puede producir inhibición o inducción enzimática y en consecuencia dar lugar a interacciones farmacológicas.

Al igual que otros cannabinoides la lipofilicidad del cannabidiol (LogP 6.3) le permite cruzar rápidamente la barrera hematoencefálica (Odi et al., 2020). El cannabidiol tiene una alta unión a proteínas ($\approx 94\%$) (Biosciences Greenwich, 2022) y su metabolismo está mediado por enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP450) (Jiang et al., 2011; Watanabe et al., 1995; Watanabe et al., 2007) y UGT-glucuronosiltransferasas (UGT) (Mazur et al., 2009). Adicionalmente el cannabidiol puede producir cambios en el metabolismo de fármacos que son sustrato de esta familia de enzimas (Al Saabi et al., 2013; Kocis & Vrana, 2020) (Fig. 4).

1.2.2 *Farmacodinamia del cannabidiol*

Actualmente, el cannabidiol es conocido como un fármaco multiblanco, con propiedades anticonvulsivantes, antioxidantes y neuroprotectoras (Do Val-da Silva et al., 2017; Hosseinzadeh et al., 2016; Rosenberg et al., 2017). Entre sus blancos farmacológicos se encuentran canales iónicos, receptores y transportadores (Castillo et al., 2010; Costa et al., 2004; Elmes et al., 2015; Ghovanloo et al., 2018; Hind et al., 2016; Holland et al., 2006; Holland et al., 2008; Kathmann et al., 2006; Ross et al., 2008; Zhu et al., 2006) (Fig. 5). Sin embargo, es importante señalar que algunos de estos efectos han sido descritos únicamente *in vitro* o exclusivamente en algunas especies.

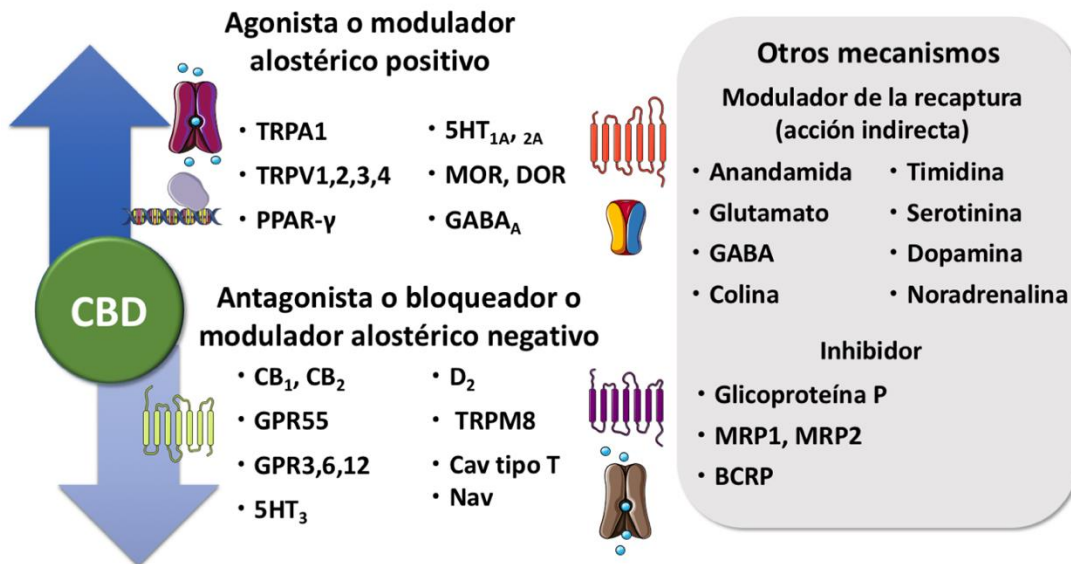


Figura 5. Blancos moleculares del cannabidiol

5HT_{1A}, 2A, 3: Receptores serotoninérgicos tipo 1A,2A y 3; Cav: Canales de calcio dependientes de voltaje, CB₁, CB₂: Receptor de cannabinoides 1 y 2; D₂: Receptor dopaminérgico 2; DOR: Receptor opioide delta; GABA: Ácido gamma-aminobutírico; GPR: Receptor acoplado a proteína G; MOR: Receptor opioide mu; Nav: Canales de sodio dependientes de voltaje; PPAR: Receptor activados por proliferadores de peroxisomas; TRPA1: Receptor de potencial transitorio tipo A1; TRPV1-4: Receptor de potencial transitorio vanilloide subtipos 1-4.

Con respecto a su acción anticonvulsiva, los estudios sugieren que podría deberse a que el cannabidiol comparte blancos moleculares con diversos antiepilépticos (Tabla 3). A estos efectos se suman la reducción de la excitabilidad neuronal a través de diferentes mecanismos:

- El receptor GPR55 es un receptor huérfano acoplado a proteína G, que tiene la capacidad de reconocer diferentes endocannabinoides y cannabinoides (Pertwee, 2007). El bloqueo de este receptor regula la actividad epiléptica al disminuir la liberación de calcio intracelular en las sinapsis excitatorias CA1-CA3 en el hipocampo (Whalley et al., 2018).
- El receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1 (TRPV1) es un canal catiónico no selectivo permeable a calcio (Etemad, Karimi, Alavi, & Roohbakhsh, 2022). El cannabidiol actúa como

agonista TRPV1 e induce una rápida desensibilización, reduciendo los niveles de calcio extracelular (Iannotti et al., 2014).

- La disminución en la recaptura de aminoácidos inhibitorios como la adenosina (Nichol et al., 2019).

Tabla 3. Antiepilépticos que comparten blancos moleculares con el cannabidiol

Antiepiléptico	Blanco molecular	Referencias
Carbamazepina, eslicarbazepina, fenitoína, fosfenitoína, lamotrigina, lacosamida, rufinamida, topiramato, zonisamida	Canales de sodio dependientes de voltaje	(Bakas et al., 2017; Ghovanloo et al., 2018; Wolfgang Löscher et al., 2020; Ross et al., 2008)
Etosuximida, zonisamida	Canales de calcio dependientes de voltaje tipo T	
Benzodiacepinas, felbamato, fenobarbital, primidona, retigabina, topiramato	Receptor GABA _A	

1.2.3 Evidencias clínicas del uso del cannabidiol en epilepsias de difícil control

Actualmente el cannabidiol cuenta con la aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el control de crisis generalizadas de difícil control asociadas al síndrome de Dravet, Lennox-Gastaut (EMA, 2020; FDA, 2018) y esclerosis tuberosa (FDA, 2020).

Los primeros estudios realizados en pacientes con crisis convulsivas secundariamente generalizadas, mostraron beneficios al añadir cannabidiol al tratamiento antiepiléptico al que previamente habían tenido poca respuesta (Carlini & Cunha, 1981; Cunha et al., 1980). Las evidencias recientes indican que otros pacientes con epilepsias refractarias, podrían lograr una mejoría en el control de las crisis epilépticas y en su calidad de

vida, al combinar su tratamiento antiepiléptico habitual con cannabidiol (Rocha, Frías-Soria, Ortiz, Auzmendi, & Lazarowski, 2020). Los resultados de un estudio abierto sugieren que el cannabidiol reduce la severidad de las crisis epilépticas en niños y adultos con epilepsia farmacorresistente (DeWolfe, Bebin, Cutter, Liu, & Szaflarski, 2016). En este caso, la disminución de la duración de las crisis epilépticas parece tener un papel importante (Szaflarski et al., 2018). Adicionalmente se ha señalado que los efectos en la severidad de las crisis podrían ser más notables en la población adulta (Gaston et al., 2021). Sin embargo, al presente no hay estudios clínicos que evalúen cuáles son los antiepilépticos que ofrecen los mayores beneficios al combinarse con cannabidiol.

1.2.4 Evidencias preclínicas del uso de cannabidiol en el control de crisis generalizadas

Las primeras evidencias del efecto anticonvulsivo del cannabidiol surgieron en los años 70 (Carlini, Leite, Tannhauser, & Berardi, 1973; Izquierdo, Orsingher, & Berardi, 1973). Posteriormente se identificaron los posibles beneficios en control de las crisis convulsivas mayores al combinar el cannabidiol con antiepilépticos como fenobarbital (PB) o fenitoína (PHT) (Chesher & Jackson, 1974; Chesher, Jackson, & Malor, 1975). Sin embargo, los estudios preclínicos posteriores se han enfocado a evaluar los efectos del cannabidiol en monoterapia en modelos animales de crisis convulsivas agudas y modelos de epilepsia.

Estudios en modelos animales de crisis convulsivas generalizadas (Jones et al., 2010; Vilela et al., 2017), crisis convulsivas secundariamente generalizadas (Jones et al., 2012) y estado epiléptico (Patra et al., 2019), sugieren que el cannabidiol reduce la fase de intensidad máxima y duración de las crisis convulsivas, además de tener un efecto neuroprotector (Mao et al., 2015). Uno de los mecanismos más estudiados en estos modelos es su acción en algunos elementos del sistema endocannabinoide. El sistema

endocannabinoide es un modulador endógeno de la actividad epiléptica, incluso se ha destacado el papel del receptor CB1 en la terminación y la duración de las crisis convulsivas secundariamente generalizadas (Wallace et al., 2003). Aunque el cannabidiol tiene una baja afinidad por los receptores cannabinoideos (CB1 y CB2), al parecer ejerce una acción indirecta sobre éstos al inhibir la hidrólisis y recaptura de anandamida (Bisogno et al., 2001), de manera que se ha reportado que la administración de antagonistas CB1 y CB2 revierte los efectos observados en la duración de las crisis convulsivas (Vilela et al., 2017). Sin embargo, estos hallazgos son controversiales, ya que en otros estudios se ha señalado que los efectos anticonvulsivos del cannabidiol son independientes del receptor CB1 (Wallace et al., 2001) y CB2; destacando la participación del receptor GPR55 (Kaplan, Stella, Catterall, & Westenbroek, 2017), vías como mTOR y la reducción de los niveles de glutamato en la duración de las crisis convulsivas generalizadas (Gobira et al., 2015).

Por otra parte, dado que el cannabidiol es un fármaco multiblanco que generalmente se administra por vía sistémica, es importante evaluar los posibles efectos del cannabidiol en otros elementos del sistema nervioso central. Este es el caso de la barrera hematoencefálica, que, como se revisó previamente juega un papel importante en la severidad intrínseca de la epilepsia (sección 1.1.3). En un modelo experimental de diabetes tipo 1 el tratamiento con cannabidiol fue capaz de prevenir la ruptura de la barrera hematorretiniana y reducir la expresión de VEGF en retina (El-Remessy et al., 2006), por lo que cabe la posibilidad de que pueda ejercer un efecto similar en la barrera hematoencefálica. Esto destaca la importancia de identificar si el cannabidiol ejerce algún efecto a este nivel en asociación con cambios en la severidad en un modelo de crisis convulsivas generalizadas severas.

2. Justificación

Diversas evidencias sugieren que las crisis convulsivas repetidas producen alteraciones a nivel cerebral que facilitan la progresión de su severidad. Debido a que los cambios en la barrera hematoencefálica podrían estar relacionados con los cambios progresivos en la severidad de las crisis epilépticas, es necesario identificar alteraciones en la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica secundarias a la inducción de crisis convulsivas repetidas.

Por otra parte, estudios clínicos sustentan que el tratamiento con cannabidiol, en combinación con antiepilépticos, reduce la aparición de crisis generalizadas y de difícil control. Sin embargo, al presente se desconoce si el cannabidiol evita la progresión de la severidad secundaria a la inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas.

3. Hipótesis

3.1 *Hipótesis 1*

El cannabidiol reduce la expresión de VEGF y las alteraciones en proteínas asociadas a su vía de señalización, ocasionadas por la inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas.

3.2 *Hipótesis 2*

El cannabidiol en monoterapia y/o en combinación con antiepilépticos disminuye la severidad de la actividad convulsiva asociada a crisis convulsivas generalizadas repetidas en un modelo preclínico.

4. Objetivos

4.1 *Objetivo general*

Analizar el efecto del cannabidiol en la expresión de VEGF y las alteraciones en proteínas asociadas a su vía de señalización, inducidas por la inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas. Así como evaluar el efecto del cannabidiol en monoterapia y en combinación con antiepilépticos en la severidad de la actividad convulsiva en un modelo preclínico de crisis convulsivas generalizadas repetidas.

4.2 *Objetivos específicos*

En animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas:

- 4.2.1 Caracterizar la severidad de la actividad convulsiva y los cambios en la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica.
- 4.2.2 Determinar el efecto de la administración aguda de cannabidiol en la severidad de la actividad convulsiva y en la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica.
- 4.2.3 Analizar el efecto de la administración subcrónica de cannabidiol en la severidad de la actividad convulsiva y en la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica.
- 4.2.4 Evaluar el efecto de la administración aguda y subcrónica de cannabidiol en combinación con fenobarbital o fenitoína en la expresión y severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico).

5. Material y métodos

5.1 Metodología general

5.1.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (n=40) con un peso de 250-300 g. Los animales fueron alimentados *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones controladas de humedad (50-60%) y temperatura (20-22 °C), en una habitación con aire acondicionado y ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El cuidado, el manejo y el uso de los animales de experimentación se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

5.1.2 Habitación

Con la finalidad de evitar las consecuencias del estrés asociado a la manipulación (Skilbeck, Johnston, & Hinton, 2010), se realizó un periodo de habituación de cinco días en el que se administró por vía intraperitoneal solución de cloruro de sodio al 0.9% (SS) 1 ml/kg/día. Adicionalmente, todos los animales fueron habituados a la cánula orogástrica con la administración de 1 ml de agua por vía oral durante cinco días. Veinticuatro horas después de la última administración i.p. de SS, los animales (n=40) fueron divididos en los diferentes grupos experimentales.

5.1.3 Grupos Experimentales

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo, los animales fueron divididos en tres grupos básicos (Fig. 6):

- **Grupo MP (n=18):** Los animales fueron sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas cada 12 horas durante 5 días (ver sección 5.1.4).
- **Grupo CBD-MP (n=18):** Los animales recibieron el mismo tratamiento que el grupo MP, con la diferencia de que se administró cannabidiol (50 mg/kg v.o.) 120 minutos antes de la inducción de cada crisis convulsiva generalizada.

- Grupo control (n=4): La manipulación de los animales fue igual al grupo MP, excepto que recibieron administraciones de 1 ml/kg i.p. de solución de cloruro de sodio al 0.9% en lugar de ácido 3-mercaptopropiónico.

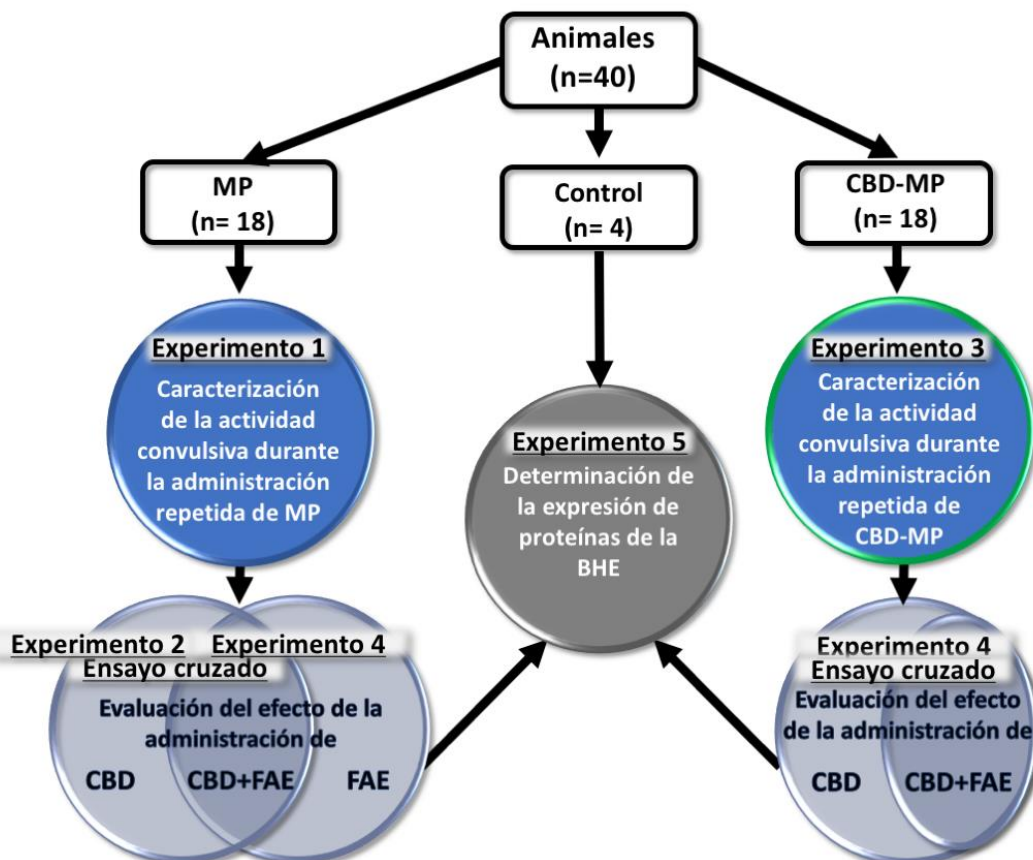


Figura 6. Diseño experimental

Los animales fueron divididos en tres grupos básicos para llevar a cabo los diferentes experimentos, el grupo control permitió la determinación basal de la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica. La caracterización de la actividad convulsiva en los experimentos 1 y 3 se consideró como la expresión basal de la actividad convulsiva, permitiendo evaluar el efecto del CBD solo y en combinación con antiépilépticos (experimento 4). BHE: Barrera hematoencefálica, CBD: Cannabidiol, FAE: Fármaco anticonvulsivante, MP: Ácido 3-mercaptopropiónico.

5.1.4 *Inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas, estado epiléptico y evaluación de la conducta*

Para la inducción de crisis convulsivas generalizadas se eligió la administración repetida de ácido 3-mercaptopropiónico (MP). Este agente convulsivante inhibe competitivamente y de forma transitoria la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Lamar, 1970); adicionalmente activa a la enzima GABA transaminasa (GABA-T) encargada de la degradación del ácido gamma-aminobutírico (GABA) (De Lores et al., 1973). La combinación de ambos mecanismos reduce notablemente los niveles del neurotransmisor en diferentes estructuras cerebrales (Karlsson et al., 1974). Conductualmente la administración de MP induce crisis convulsivas severas de tipo clónico-tónico generalizadas, que se caracterizan por tener un inicio abrupto entre los 4 a 8 min posteriores a su administración (Lazarowski et al; 2004; W Löscher, 1979).

El MP fue preparado diariamente antes de cada administración en solución de cloruro de sodio al 0.9%, previo ajuste del pH con Trizma base (pH 7.4). Los animales recibieron ácido 3-mercaptopropiónico (MP, Sigma CAT. M5801) cada 12 horas durante 5 días (8 am y 8 pm). La latencia y prevalencia de las crisis convulsivas fue evaluada con base en la escala modificada de Velísková et al. (1990, Tabla 4). La dosis inicial fue de 30 mg/kg de peso y las dosis subsecuentes se incrementaron paulatinamente hasta llegar a una dosis máxima de 37.5 mg/kg. El escalamiento de la dosis se llevó a cabo para inducir una respuesta conductual de fase \geq III en cada administración, con una mortalidad reducida. Los cambios conductuales se registraron durante los 90 min posteriores a la administración de MP. Las fases I a III fueron clasificadas como crisis menores, mientras que las fases IV y V se catalogaron como crisis mayores.

**Tabla 4. Escala de evaluación de crisis generalizadas
(Modificado de Velišková et al., 1990)**

Fase	Cambios conductuales	Tipo de crisis
I	Mioclonias aisladas	Menores
II	Clonus incompleto (unilateral, asimétrico)	
III	Clonus completo (bilateral, simétrico)	
IV	Salto salvaje o corrida salvaje	Mayores
V	Crisis tónico-clónica	

Para fines de este estudio consideramos como un marcador de severidad la presentación de estado epiléptico (crisis convulsivas con duración ≥ 5 min), por lo que se registró su prevalencia en cada administración. En el estudio realizado por Girardi et al., (2005), la administración de 45 mg/kg i.p. de MP cada 24 horas condujo a estado epiléptico fatal en el 100% de los animales en la administración 13.

5.1.5 *Ensayo cruzado*

Durante más de cuarenta años, los ensayos cruzados han permitido analizar la respuesta a dos o más tratamientos en un mismo sujeto experimental. Se han utilizado con frecuencia para evaluar nuevos fármacos, siendo de gran utilidad para comparar sus efectos con las terapias estándar (Hedayat & Yang, 2005; Mills et al., 2009). El uso de este diseño es frecuente a nivel preclínico y en ensayos clínicos de padecimientos del sistema nervioso central (Wellek & Blettner, 2012), tal es el caso de la epilepsia (Grabenstatter & Dudek, 2008, 2019; Grabenstatter, Ferraro, Williams, Chapman, & Dudek, 2005). Asimismo, ha permitido evaluar la respuesta a cannabinoides en sus diferentes usos terapéuticos (Friedman, French, & Maccarrone, 2019; Whiting et al., 2015). Entre las ventajas de los ensayos cruzados destaca la oportunidad de estimar el efecto del tratamiento con una disminución de la variabilidad entre los animales (cada sujeto se evalúa como su propio control) y la reducción de costos (menor número de sujetos

experimentales). Este diseño resultó ideal para el presente trabajo, ya que nos permitió comparar el efecto del cannabidiol con el de fármacos usados en el tratamiento estándar, así como el efecto de la combinación de estos en el mismo sujeto experimental. A continuación se describen los tratamientos administrados aleatoriamente durante el ensayo cruzado:

- CBD-PB-MP: Se administró cannabidiol (200 mg/kg v.o.), 60 min después se administró fenobarbital (15 mg/kg i.p.) y finalmente 60 min después el convulsivante MP (37.5 mg/kg i.p.).
- CBD-PHT-MP: Se administró de forma similar a lo descrito en el tratamiento CBD-PB-MP, excepto que recibieron fenitoína (75 mg/kg i.p.) en lugar de fenobarbital.
- PB-MP: El tratamiento fue similar al enunciado en CBD-PB-MP, excepto que se administró vehículo en lugar de cannabidiol.
- PHT-MP: Se administró de forma similar a lo descrito en el tratamiento CBD-PHT-MP, excepto que se administró vehículo en lugar de cannabidiol.
- CBD-MP: El tratamiento fue similar al mencionado en CBD-PB-MP, excepto que se administró vehículo en lugar de fenobarbital.

En el [grupo MP](#) se probaron aleatoriamente los 5 tratamientos, aplicando uno cada 48 h (Fig. 7). Entre cada uno de los tratamientos se indujeron crisis convulsivas con la administración de MP (37.5 mg/kg i.p.). Los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos se compararon con lo obtenido con el MP solo durante el ensayo cruzado.

Por otra parte, los animales del [grupo CBD-MP](#) recibieron únicamente tres de los tratamientos descritos previamente: [CBD-PB-MP](#), [CBD-PHT-MP](#), [CBD-MP](#) (Fig. 8). En este caso el estímulo convulsivo se mantuvo con 37.5 mg/kg i.p. de MP previa administración de CBD (50 mg/kg v.o. 120 min antes).

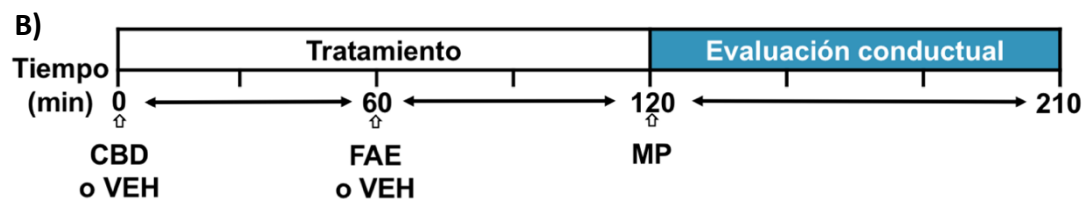
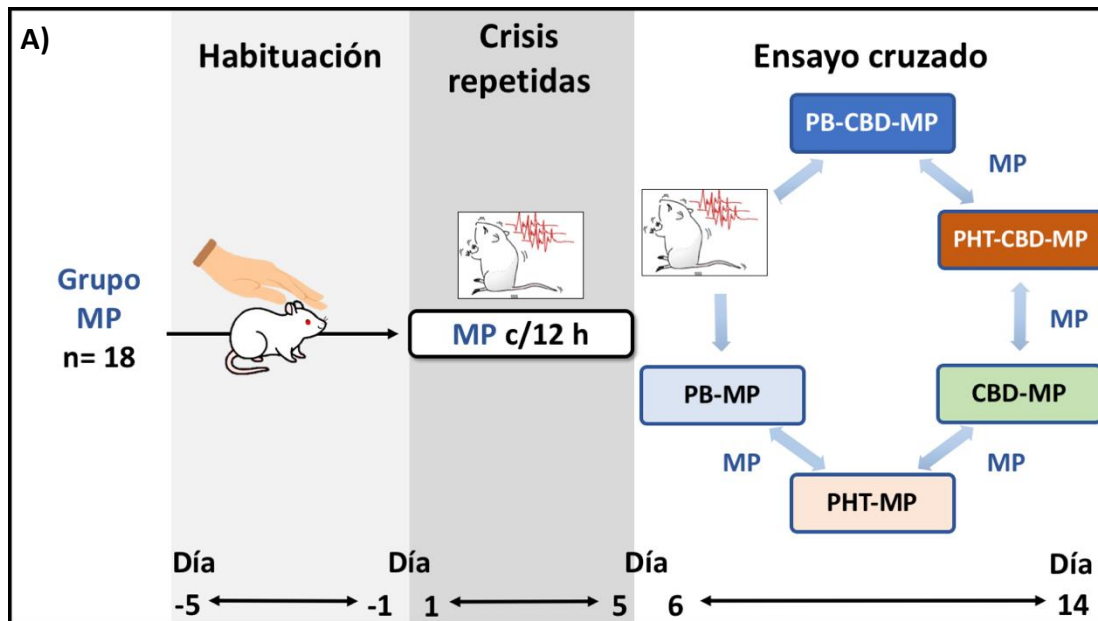


Figura 7. Protocolo experimental usado para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en las ratas del grupo MP

Línea temporal del protocolo y representación esquemática del ensayo cruzado. Después de los 5 días de habituación, los animales recibieron MP (30-37.5 mg/kg i.p.) cada 12 h durante 5 días. El día 6 los animales fueron sometidos a ensayo cruzado en donde recibieron aleatoriamente uno de cinco tratamientos cada 48 h. Para mantener el estímulo convulsivo 24 h después de los tratamientos se aplicó una dosis de MP (37.5 mg/kg i.p.). **B)** Diagrama del procedimiento para la aplicación de tratamientos durante el ensayo cruzado. Inicialmente se administró CBD (200 mg/kg v.o.) o vehículo (VEH). Sesenta minutos después los animales recibieron fenitoína (PHT, 75 mg/kg i.p.) o fenobarbital (PB, 15 mg/kg i.p.) o vehículo. Finalmente, sesenta minutos después de la administración del anticonvulsivante (FAE), se administró MP (37.5 mg/kg i.p.). La actividad convulsiva se registró durante los 90 min posteriores a la administración de MP.

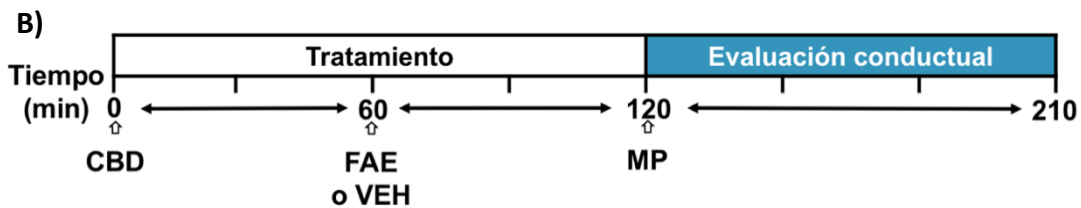
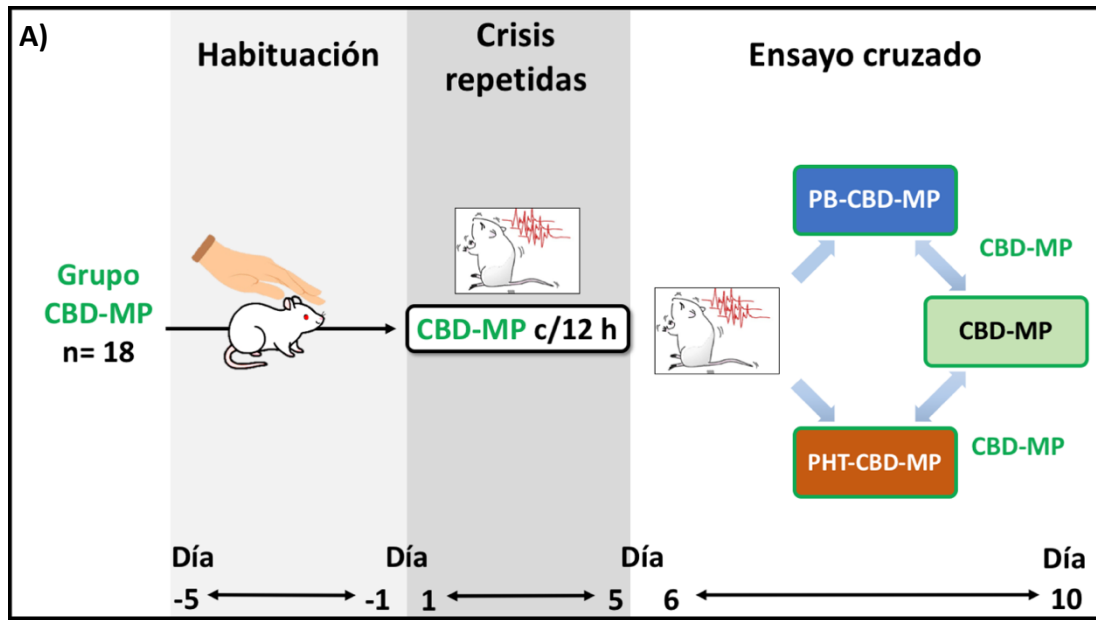


Figura 8. Protocolo experimental usado para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos en las ratas del grupo CBD-MP

A) Línea temporal del protocolo. Después de los 5 días de habituación, los animales recibieron CBD (50 mg/kg v.o.) 120 minutos antes de la administración de MP cada 12 h durante 5 días. El día 6 los animales fueron sometidos a ensayo cruzado en donde recibieron aleatoriamente uno de tres tratamientos cada 48 h. Para mantener el estímulo convulsivo 24 h después de los tratamientos se aplicó una dosis de CBD (50 mg/kg v.o.) 120 minutos antes de la administración de MP (37.5 mg/kg i.p.). **B)** Diagrama del procedimiento para la aplicación de tratamientos durante el ensayo cruzado. Inicialmente se administró CBD (200 mg/kg v.o.). Sesenta minutos después los animales recibieron fenitoína (PHT, 75 mg/kg i.p.) o fenobarbital (PB, 15 mg/kg i.p.). Finalmente, sesenta minutos después de la administración del anticonvulsivante (FAE), se administró MP (37.5 mg/kg i.p.). La actividad convulsiva se registró durante los 90 min posteriores a la administración de MP.

5.2 Western blot de proteínas de la barrera hematoencefálica

Para identificar los cambios en la expresión de las proteínas de la barrera hematoencefálica, el tejido de los animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas fue comparado con tejido de animales control.

Los cerebros fueron colocados uno a uno en una caja de Petri sobre una superficie a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener el tejido de interés. Se realizaron dos cortes coronales entre el quiasma óptico y los pedúnculos cerebrales, posteriormente se realizó un corte sagital sobre la línea media (Fig. 9).

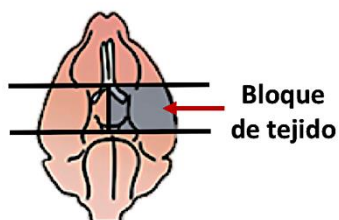


Figura 9. Tejido procesado para la determinación de expresión de proteínas por la técnica de Western blot

Se esquematiza la cara ventral del cerebro de rata en donde se representan con líneas sólidas los cortes realizados. El segmento identificado con la flecha roja y sombreado gris muestra la zona de interés.

Los bloques de tejido cerebral congelado fueron homogenizados en solución amortiguadora de radio inmunoprecipitación (RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 1%, pH 7.4), en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, CAT. 04693116001) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los homogenados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las alícuotas de los extractos de proteína fueron resguardadas inmediatamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Lowry (DC Protein Assay Bio-Rad, CAT. 5000116) usando albúmina sérica bovina (BSA, Bio-Rad, CAT. 500-0007) como estándar.

El día del experimento se tomó el volumen correspondiente a $30\text{ }\mu\text{g}$ de proteína y se añadió solución amortiguadora de Laemmli (Tris-HCl 500 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, beta-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.1%), colocando cada una de las muestras en baño maría para su ebullición durante 6 min (volumen final de $20\text{ }\mu\text{l}$). Para la electroforesis se empleó una cámara de western blot conectada a una fuente de poder (Bio-Rad), en la que se montaron geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 8% y 10% de acuerdo al peso molecular de la proteína de interés. Las muestras y el marcador de peso molecular ($4\text{ }\mu\text{l}$, Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, CAT. 26634)

fueron cargados en el carril correspondiente, colocando solución amortiguadora de carga (Laemmli 5 µl) en los carriles vacíos.

La electroforesis se realizó en solución amortiguadora (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3; Bio-Rad, CAT. 1610723) a 85 V durante 30 min, seguida de 95 V durante 150 min. Posteriormente los geles y las membranas de nitrocelulosa (0.45 µm, GE Healthcare Life Sciences, CAT. GE10600002) se montaron en la cámara de transferencia con solución amortiguadora (Trizma base 25 mM, glicina 250 mM, metanol 20%, SDS 0.01%, pH 8.3) a 110 V durante 30 min. Las membranas se lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.1% y se incubaron a 4 °C durante 1 h en agitación suave con el bloqueador inespecífico al 5% (Blot-QuickBlocker, EMD Millipore, CAT. WB57) disuelto en PBS-Tween 20 al 0.1%. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios (Tabla 5). A continuación, las membranas se lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.1% y se incubaron durante 2 h en agitación suave con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasas (Tabla 5). Para eliminar los anticuerpos secundarios de las membranas de nitrocelulosa, se sometieron a tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% (PBS-T) y uno con PBS (5 min c/u).

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los ensayos de western blot para determinar la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica

Anticuerpo	Origen	Dilución	Marca	Catálogo
VEGF-A	Conejo	1:1000 (PBS 1X)	Abcam	Ab46154
VEGF-R2	Conejo	1:500 (WV)	Abcam	Ab39256
eNOS	Conejo	1:1000 (PBS 1X)	Abcam	Ab5589
Claudina-5	Ratón	1:1000 (PBS 1X)	Invitrogen	35-2500
β-Actina	Conejo	1:5000 (PBS 1X)	Abcam	Ab8227
Anti-mouse	Cabra	1:10000 (PBS 1X)	Li-Cor	926-80010
Anti-Rabitt	Cabra	1:10000 (PBS 1X) 1:7500 (PBS 1X)	Li-Cor	926-80011

WV: WestVision Block and Diluent, Vector, CAT. SP-7000

Finalmente, las membranas se expusieron durante 5 min a la solución de revelado (Thermo Western ECL Blotting Substrate) y se analizaron con el software Image Studio (LI-COR).

5.3 Experimentos

5.3.1 Experimento 1: *Caracterización de la actividad convulsiva durante la administración repetida de MP*

El propósito de este experimento fue analizar la progresión de la severidad de la actividad convulsiva en los animales del grupo MP (n=18). Al completar el periodo inicial de inducción de crisis convulsivas generalizadas (MP cada 12 horas durante 5 días), los animales continuaron con las administraciones de 37.5 mg/kg de MP cada 24 horas hasta completar dieciocho administraciones. La prevalencia y la latencia de crisis convulsivas, así como la presentación de estado epiléptico convulsivo se registró de acuerdo a lo enunciado previamente (sección 5.1.4).

5.3.2 Experimento 2: *Evaluación del efecto de la administración aguda de CBD en animales sometidos a crisis convulsivas repetidas*

El propósito de este experimento fue determinar el efecto del tratamiento agudo con cannabidiol en la severidad de la actividad convulsiva y en la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica. Para este experimento se utilizaron los animales del grupo MP (n=18, Fig. 6), previamente sometidos a la administración repetida de MP. Se evaluó el efecto del tratamiento CBD-MP durante el ensayo cruzado (ver sección 5.1.5, Fig. 7).

5.3.3 *Experimento 3: Caracterización de la actividad convulsiva durante la administración repetida de CBD*

El propósito de este experimento fue analizar el efecto del pretratamiento subcrónico con cannabidiol a lo largo del procedimiento experimental. Se usaron animales del grupo **CBD-MP**. En estos animales se caracterizó la actividad convulsiva durante la inducción repetida de crisis convulsivas generalizadas y durante el ensayo cruzado cuando recibieron el tratamiento CBD-MP (n=18, Fig. 6).

5.3.4 *Experimento 4: Evaluación del efecto de la administración aguda y subcrónica de CBD en combinación con antiepilépticos*

Un aspecto relevante para el presente trabajo fue indagar si el efecto del cannabidiol en la severidad de la actividad convulsiva se mantenía al administrarlo en combinación con fármacos antiepilépticos. El propósito de este experimento fue determinar el efecto del tratamiento agudo y subcrónico con cannabidiol en combinación con antiepilépticos en la severidad de la actividad convulsiva. Para este experimento, se utilizaron animales del **grupo MP** (Fig. 7) y del **grupo CBD-MP** (Fig. 8), los cuales se sometieron a un ensayo cruzado (ver sección 5.1.5).

Los animales fueron sacrificados por decapitación cuatro horas después del último tratamiento. Inmediatamente después se obtuvo el tejido cerebral y se resguardó a -70 °C para determinar la expresión de las proteínas de la barrera hematoencefálica por la técnica de western blot (ver sección 5.2).

5.3.5 *Experimento 5. Determinación de la expresión de las proteínas de la barrera hematoencefálica*

El propósito de este experimento fue analizar la expresión de las proteínas de las uniones estrechas en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas y los posibles efectos del tratamiento subcrónico con cannabidiol. Para los ensayos de western blot se utilizó el

tejido de animales de los grupos MP y CBD-MP (sección 5.2). Los resultados obtenidos se compararon con el grupo control, los cuales fueron sacrificados cuatro horas después de la última administración de solución de cloruro de sodio al 0.9%. La disposición, el resguardo y procesamiento del tejido se realizó con el mismo procedimiento para todos los grupos experimentales (sección 5.2).

5.4 Análisis de resultados

5.4.1 Experimentos 1 a 4

Los valores obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar. El análisis de datos se realizó con el software GraphPad Prism versión 7 para Mac OS X. Inicialmente se llevó a cabo el análisis de datos con la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos (paramétrica o no paramétrica). La latencia de las crisis mayores y menores se analizó mediante la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey como prueba post hoc. Los datos que mostraron una distribución no paramétrica fueron analizados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn. La prevalencia de crisis menores, mayores y estado epiléptico se expresó como porcentaje y se analizó con la prueba exacta de Fisher. Se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

5.4.2 Experimento 5

Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto a actina para obtener los valores de densidad relativa. Posteriormente estos se expresaron como el porcentaje de cambio \pm error estándar. Debido a que éstos mostraron una distribución paramétrica (prueba de Shapiro-Wilk), el análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA, seguida de Tukey como prueba post hoc. Se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

6. Resultados

6.1 Experimento 1. La inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas incrementó la severidad de la actividad convulsiva

Durante toda la etapa experimental el grupo MP presentó crisis convulsivas clónico-tónicas con una fase de intensidad máxima entre III y IV en cada administración (Fig. 10).

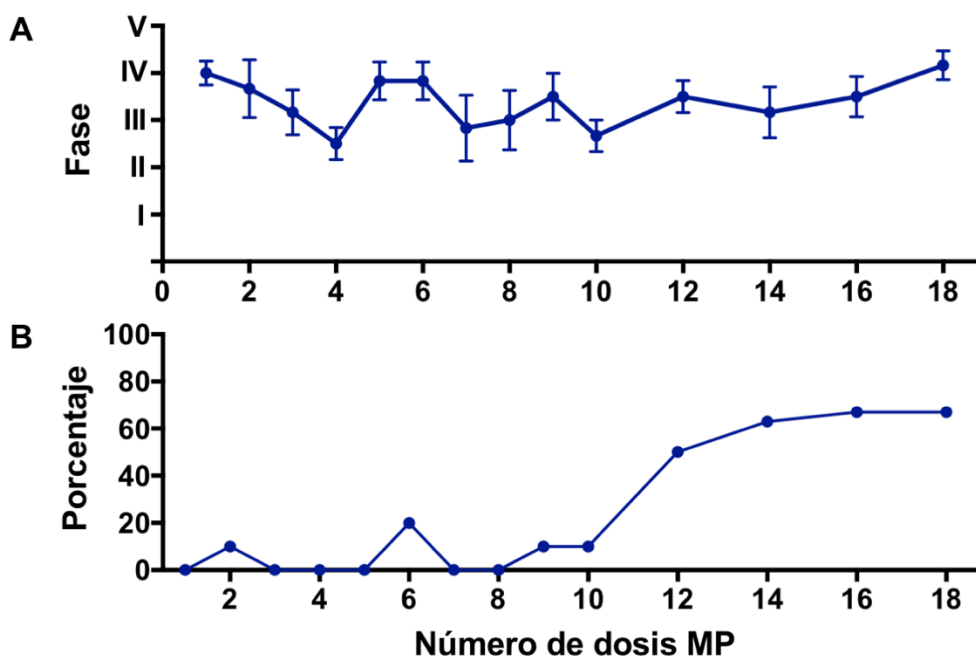


Figura 10. Fase de intensidad máxima de actividad convulsiva y prevalencia de estado epiléptico durante las administraciones repetidas de MP

(A) La administración repetida de MP indujo crisis convulsivas generalizadas, la fase de intensidad máxima se mantuvo constante durante todo el protocolo experimental. (B) En las primeras diez administraciones de MP (30-37.5 mg/kg i.p.), algunos animales presentaron estado epiléptico. Sin embargo, es notable un incremento progresivo en la prevalencia de estado epiléptico durante las últimas administraciones de MP (37.5 mg/kg i.p.).

Aunque algunos animales presentaron estado epiléptico durante las primeras administraciones de MP, es notable el incremento progresivo de la prevalencia, que alcanzó el 67% durante las últimas administraciones de MP (dosis 16-18, Fig. 10). La duración del estado epiléptico fue de 14.83 ± 2.7 min, los animales presentaron crisis menores (61 %) y mayores (39 %). El

grupo MP presentó una tasa de mortalidad del 30% al finalizar el protocolo experimental.

6.2 Experimento 2: La administración aguda de CBD redujo la prevalencia de estado epiléptico en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas

Durante el ensayo cruzado del grupo MP, el tratamiento CBD-MP no modificó la latencia y prevalencia de crisis convulsivas menores (296.5 ± 39.7 s, 100%) y mayores (591.4 ± 68.8 s, 77.8%). Sin embargo, se observó una menor prevalencia de estado epiléptico (22%, $p < 0.01$ vs MP, Tabla 6). Estos resultados sugieren que la administración aguda de cannabidiol en animales sometidos a crisis convulsivas repetidas reduce la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico).

6.3 Experimento 3: La administración subcrónica de CBD redujo la prevalencia de estado epiléptico en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas

En los animales del grupo CBD-MP, tanto la fase de intensidad máxima (Fig. 11A) como la latencia y prevalencia de las crisis convulsivas menores (338.8 ± 56.2 s, 100%) y mayores (478.9 ± 64.5 s, 62.5%) fueron similares a las observadas en el grupo MP (Tabla 6). Sin embargo, la prevalencia de estado epiléptico en el grupo CBD-MP fue menor (13%, $p < 0.05$ vs MP, Fig. 11B y Tabla 6). Esto sugiere que la administración subcrónica de cannabidiol reduce la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico). En este grupo se observó una tasa de mortalidad del 9% al finalizar el protocolo experimental ($p = 0.2$ vs MP), que fue significativamente mayor a la observada en el grupo control? O no?

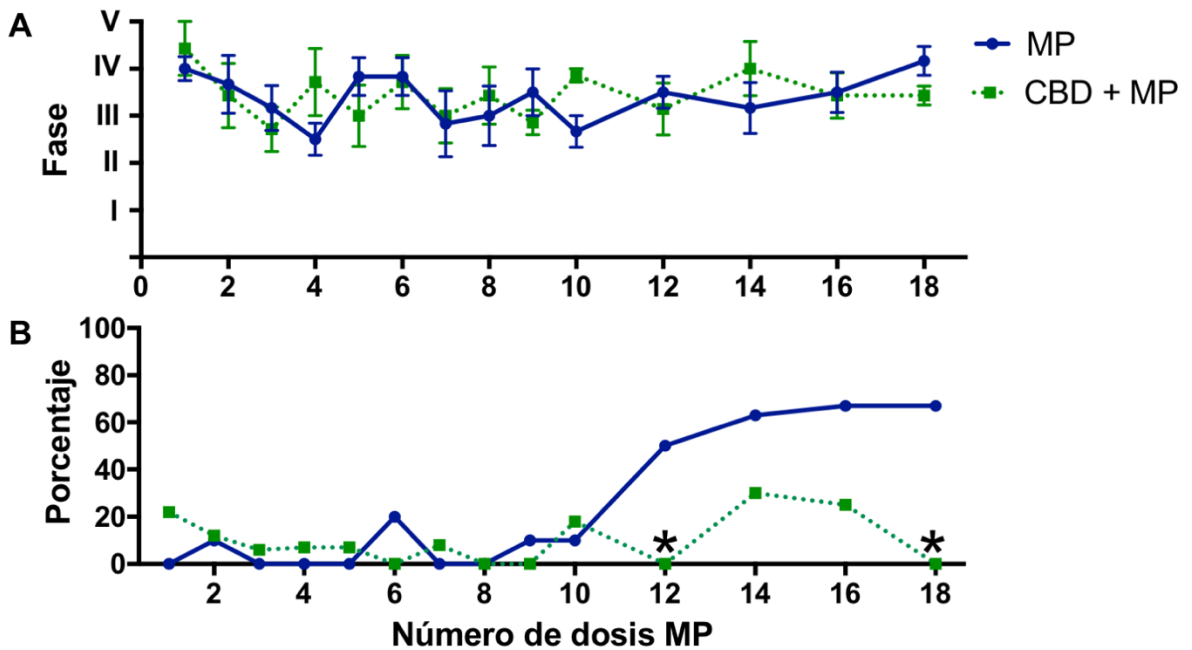


Figura 11. Fase de intensidad máxima de la actividad convulsiva y prevalencia de estado epiléptico durante el tratamiento subcrónico con cannabidiol
 (A) El grupo CBD-MP sometido a la administración repetida de cannabidiol (50 mg/kg v.o.) durante la inducción de crisis generalizadas repetidas mostró una fase de intensidad máxima similar al grupo MP durante todo el protocolo experimental. (B) Algunos animales del grupo CBD-MP presentaron estado epiléptico en las primeras diez administraciones, sin embargo, es notable la disminución en la prevalencia de estado epiléptico durante las últimas administraciones del protocolo experimental en comparación con los animales del grupo MP.

6.4 Experimento 4: La administración aguda de cannabidiol en combinación con fenobarbital mantuvo elevada la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico) en el grupo MP

En el ensayo cruzado del grupo MP, la administración de los tratamientos PB-MP y CBD-PB-MP no produjo modificaciones en la latencia y prevalencia de crisis convulsivas menores (Tabla 6). Sin embargo, se observó un incremento en la latencia (1060 ± 235.6 , $p < 0.05$ vs MP) y una disminución en la expresión de las crisis convulsivas mayores (27.3 %, $p < 0.05$ vs MP). A pesar de que la expresión de crisis menores y mayores fue similar entre los tratamientos PB-MP y CBD-PB-MP, se observaron diferencias en la prevalencia de estado epiléptico; i.e., cuando se administró

el tratamiento **PB-MP** la prevalencia de estado epiléptico (27%, $p < 0.05$ vs **MP**) fue menor a lo observado en el grupo **MP**. Sin embargo, la administración del tratamiento combinado con cannabidiol mantuvo elevada la prevalencia de estado epiléptico (**CBD-PB-MP** 75%, $p=0.5$ vs **MP**, Tabla 6). Debido a que la administración de **CBD-PB-MP** evitó el efecto en la severidad de la actividad convulsivo observado con cada fármaco por separado, era indispensable evaluar su efecto en animales con administraciones repetidas de cannabidiol (**grupo CBD-MP**).

6.4.1 En animales del grupo CBD-MP, el fenobarbital evitó las crisis mayores y disminuyó la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico)

En el ensayo cruzado del **grupo CBD-MP**, el tratamiento **CBD-PB-MP** no modificó la latencia (302.9 ± 69.3 , $p > 0.99$ vs **MP**) y prevalencia (100%, $p > 0.99$ vs **MP**) de crisis convulsivas menores en comparación con el **grupo MP**. Sin embargo, evitó la expresión de las crisis convulsivas mayores (0%, $p < 0.01$ vs **MP**). Por otra parte, a diferencia de lo obtenido con el tratamiento **CBD-PB-MP** en el **grupo MP**, en los animales **grupo CBD-MP** se observó una reducción significativa en la prevalencia de estado epiléptico cuando se administró fenobarbital (13%, $p < 0.05$ vs **CB-PB-MP** y **MP**, Tabla 6).

6.4.2 El cannabidiol en combinación con fenitoína en los animales del grupo MP exacerbó la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico)

En el **grupo MP** la administración de **PHT-MP** y **CBD-PHT-MP** durante el ensayo cruzado, no modificó la latencia (**PHT-MP** 201.2 ± 34.3 , $p > 0.99$ vs **MP**; **CBD-PHT-MP** 268.2 ± 40 , $p > 0.99$ vs **MP**) y expresión de crisis convulsivas menores (**PHT-MP** 100%, $p > 0.99$ vs **MP**; **CBD-PHT-MP** 100%, $p > 0.99$ vs **MP**), aunque disminuyó la prevalencia de crisis mayores en comparación con las condiciones basales (**PHT-MP** 8.3%, $p > 0.01$ vs **MP**;

CBD-PHT-MP 15.4%, $p > 0.01$ vs MP, Tabla 6). Con respecto a la expresión de estado epiléptico, el tratamiento con PHT-MP no modificó su prevalencia (42%, $p = 0.2$ vs MP) e incluso se observó un incremento al combinar con cannabidiol (CBD-PHT-MP 100%, $p < 0.05$ vs MP, Tabla 6).

6.4.3 *En animales con antecedente de cannabidiol subcrónico la fenitoína evitó las crisis convulsivas mayores y mantuvo elevada la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico)*

Durante el ensayo cruzado del grupo CBD-MP, el tratamiento con CBD-PHT-MP no indujo cambios en la latencia (239.4 ± 33.3 , p vs MP) y expresión de crisis convulsivas menores (100%, $p > 0.99$ vs MP) en comparación con el grupo MP. Sin embargo, el tratamiento con CBD-PHT-MP disminuyó la prevalencia de crisis mayores (14.3 %, $p < 0.05$ vs MP, Tabla 6). Con respecto a la expresión de estado epiléptico, el tratamiento CBD-PHT-MP no indujo cambios significativos en la prevalencia con respecto a los animales del grupo MP (71%, $p = 0.6$ vs MP, Tabla 6).

Tabla 6. Latencia y prevalencia de las crisis convulsivas menores y mayores y estado epiléptico

		Crisis Menores	Crisis Mayores	Estado epiléptico
Grupo	MP	237.5 ± 62.9 (100 %)	495 ± 58.9 (83.3%)	67%
Tratamientos (ensayo cruzado)	CBD-MP	296.5 ± 39.7 (100 %)	591.4 ± 68.8 (77.8 %)	22% **
	PB-MP	192.1 ± 31.4 (100 %)	1060 ± 235.6* & (27.3 %)* &	27% *
	CBD-PB-MP	280 ± 45.4 (100 %)	NP (0%)** &&&	75%&
	PHT-MP	201.2 ± 34.3 (100 %)	692 (8.3 %)** &&&	42%
	CBD-PHT-MP	268.2 ± 40 (100 %)	1195 ± 21* & (15.4 %)** &&&	100% * &&&& ‡‡
Grupo	CBD-MP	338.8 ± 56.2 (100 %)	478.9 ± 64.5 (62.5%)	13%*
Tratamientos (ensayo cruzado)	CBD-PB-MP	302.9 ± 69.3 (100 %)	NP (0%)** ¥	13%* \$
	CBD-PHT-MP	239.4 ± 33.3 (100 %)	875 (14.3 %)*	71% ¥

La expresión de la actividad convulsiva en los grupos *MP* y *CBD-MP* se consideró como la expresión basal, permitiendo evaluar el efecto del CBD solo y en combinación con antiepilépticos (tratamientos- ensayo cruzado). Valores de latencia expresados en segundos, valores de prevalencia expresados en porcentaje. CBD: Cannabidiol; MP: Ácido 3-Mercaptopropiónico; NP: No presentó; PB: Fenobarbital, PHT: Fenitoina. Los valores de latencia fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de Dunn. Los valores de prevalencia fueron analizados con la prueba exacta de Fisher de una cola.

* $p < 0.05$ vs *MP*, ** $p < 0.01$ vs *MP*

& $p < 0.05$ vs *CBD-MP*, && $p < 0.001$ vs *CBD-MP*, &&& $p < 0.0001$ vs *CBD-MP*

‡‡ $p < 0.005$ vs *PHT-MP*

\$ $p < 0.05$ vs *CBD-PB-MP*

¥ $p < 0.05$ vs *CBD-MP*

6.5 Experimento 5

6.5.1 La inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas se asoció a un incremento en la expresión de VEGF-A y claudina-5

El análisis de la expresión de VEGF-A mostró un incremento del $37.7\% \pm 8.1$, $p < 0.01$ en los animales del grupo MP con respecto al grupo control (Fig. 12). No se observaron diferencias significativas en la expresión de VEGF-R2 ($-5\% \pm 5.6$, $p=0.528$) y eNOS ($9.1\% \pm 4.7$, $p=0.264$) entre ambos grupos. Sin embargo, se observó un aumento en la expresión de claudina-5 en el grupo MP ($58.4\% \pm 11$, $p < 0.01$, Fig. 12).

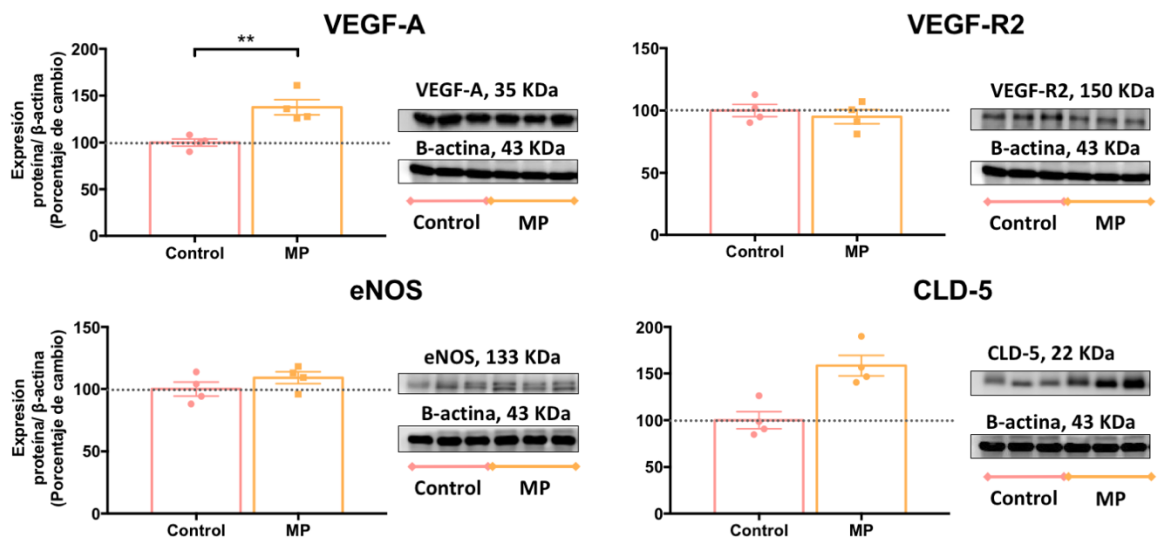


Figura 12. Expresión de VEGF-A y de proteínas asociadas a su vía transduccional en animales control vs animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas (grupo MP).

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial; CLD-5: Claudina-5, CBD: Cannabidiol, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular A; VEGF-R2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular. $n=4$, Media \pm error estándar. Prueba t de Student, ** $p < 0.01$

6.5.2 *La administración aguda de CBD se asoció a una expresión de eNOS similar a condiciones control e incrementó la expresión de claudina-5 en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas*

Los animales del grupo MP presentaron menor expresión de eNOS cuando recibieron el tratamiento agudo con cannabidiol (CBD-MP) en comparación con las condiciones basales (CBD-MP $-14\% \pm 2.3$ vs MP $9.1\% \pm 4.7$, $p < 0.05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de eNOS entre el tratamiento CBD-MP y el grupo control ($p = 0.362$, Fig. 13). Por otra parte, con el tratamiento CBD-MP se observó un incremento en la expresión de claudina-5 en comparación con el grupo control ($126.1\% \pm 6.2$, $p < 0.0001$) y las condiciones basales (CBD-MP $126.1\% \pm 6.2$ vs MP $58.4\% \pm 11$, $p < 0.005$, Fig. 13). No se observaron diferencias significativas en la expresión de VEGF (MP $37.7\% \pm 8.1$ vs CBD-MP $17.8\% \pm 3.7$, $p = 0.076$) y VEGF-R2 (MP $-5\% \pm 5.6$ vs CBD-MP $14.9\% \pm 13.8$, $p = 0.312$) entre las condiciones basales (MP) y el tratamiento CBD-MP.

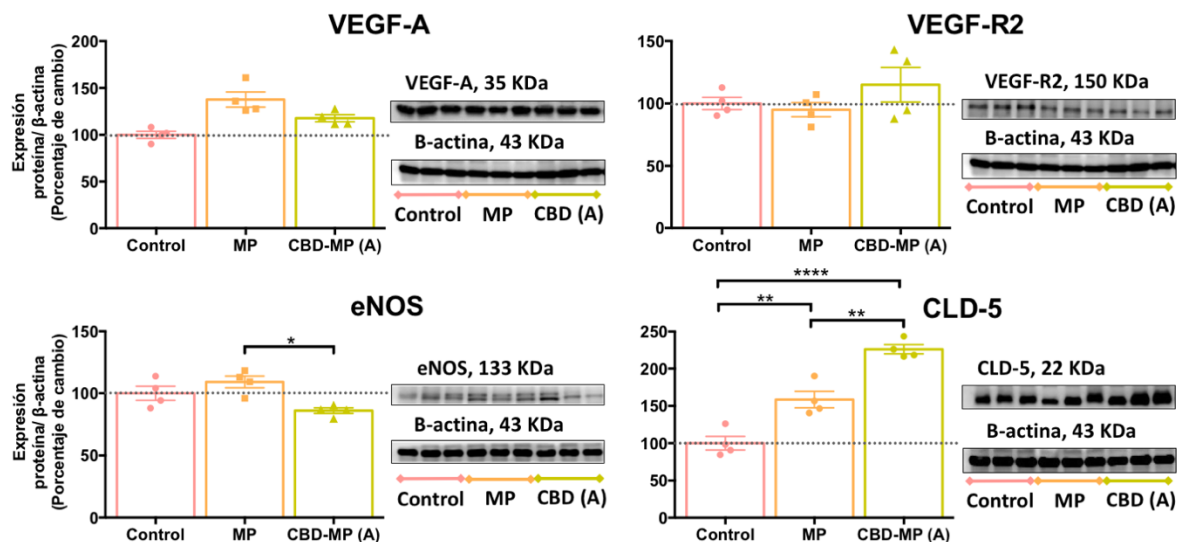


Figura 13. Expresión de VEGF-A y de proteínas asociadas a su vía transduccional en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas tratados con una dosis única de CBD (grupo MP, 200 mg/kg v.o.).

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial; CLD-5: Claudina-5, CBD: Cannabidiol, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular A; VEGF-R2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular. $n=4$, Media \pm error estándar. Prueba ANOVA de una vía, post hoc Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$

6.5.3 *La administración subcrónica de CBD evitó los efectos de las crisis convulsivas repetidas en la expresión de VEGF y eNOS*

La segunda parte del experimento reveló que el tratamiento subcrónico con cannabidiol (**grupo CBD-MP**) mantiene la expresión de VEGF-A ($6.6\% \pm 6.3$, $p=0.848$) y eNOS ($-16.2\% \pm 7.4$, $p=0.195$) en valores similares a los observados en el grupo control (Fig. 14). Adicionalmente, el **grupo CBD-MP** mostró un incremento en la expresión de claudina-5 ($148.8\% \pm 15.3$, $p<0.0001$) en comparación con los grupos control y **MP** (**CBD-MP** $148.8\% \pm 15.3$ vs **MP** 58.4 ± 11 $p<0.001$, Fig. 14). Sin embargo, al comparar los efectos del tratamiento agudo con cannabidiol (**grupo MP**) con el **grupo CBD-MP** que recibió la administración subcrónica, únicamente se observaron diferencias en la expresión del receptor VEGF-R2 (**CBD-MP** $14.9\% \pm 13.8$ vs **CBD-MP** $-21.6\% \pm 2.1$, $p<0.05$, Fig. 14).

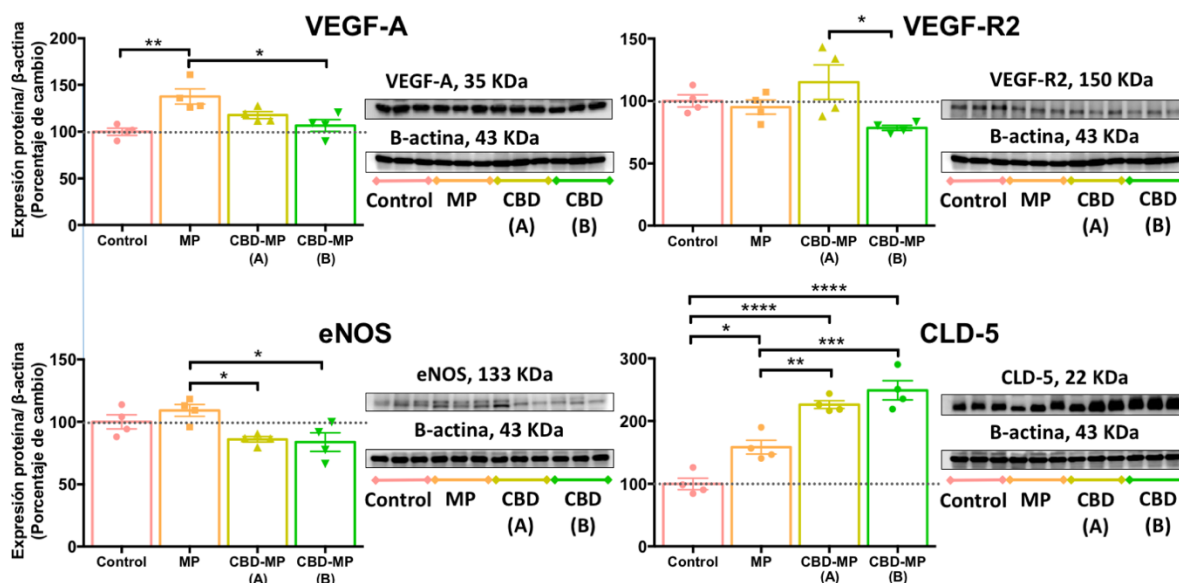


Figura 14. Expresión de VEGF-A y de proteínas asociadas a su vía transduccional en los animales de los grupos CBD-MP y CBD-MP.

eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial; CLD-5: Claudina-5, CBD: Cannabidiol, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular A; VEGF-R2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular. $n=4$, Media \pm error estándar. Prueba ANOVA de una vía, post hoc Tukey, * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

7. Discusión

Existe una estrecha relación entre la severidad de la epilepsia y el desarrollo de farmacoresistencia, por lo que resulta de gran utilidad contar con recursos terapéuticos que eviten dicha progresión. En este trabajo evaluamos en un modelo preclínico el efecto de la administración aguda y subcrónica de cannabidiol en la expresión y severidad de la actividad convulsiva, así como en la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica. Debido a que en la práctica clínica el cannabidiol se administra en combinación con otros fármacos, también se evaluó el efecto de la combinación con antiepilépticos en la expresión y severidad de la actividad convulsiva.

Inicialmente llevamos a cabo la inducción de crisis convulsivas generalizadas repetidas con MP. Debido a que la actividad convulsiva se puede expresar como un evento sostenido y letal, consideramos al estado epiléptico como marcador de severidad máxima.

Nuestros resultados mostraron un incremento progresivo en la severidad de la actividad convulsiva (que se asoció a estado epiléptico convulsivo). Estudios en modelos animales han evidenciado que las crisis convulsivas tienen consecuencias a nivel celular y molecular que ocurren a diferentes intervalos de tiempo: Alteraciones en las subunidades de receptores, en la función de canales iónicos, en la función sináptica, alteraciones en la expresión de genes, activación glial, muerte neuronal, alteraciones en la neurogénesis, etc. (Cole et al., 2002; Meldrum, 2001).

Diversos estudios sugieren que la inducción de una crisis convulsiva con MP favorece cambios en sistemas de neurotransmisión que son clave para la terminación de las crisis:

- Reducción en los niveles de ATP (Folbergrová, 1977).
- Incremento en la unión a receptores de adenosina A1 en diversas capas de CA1, CA2, CA3 e hilus (Giraldez et al., 1998; Vanore et al., 2001).

- Incremento en la unión a receptores de adenosina A2 estriatales (Giraldez, Zanetti, & Girardi, 1999).
- Incremento en los niveles de enzima citrato sintasa 5-nucleotidasa (enzima clave para la síntesis de adenosina) en corteza, cerebelo e hipocampo (Giraldez et al., 1998; Girardi et al., 1989).
- Incremento en la actividad específica de la acetilcolinesterasa (AChE) en el hipocampo (Girardi et al., 1994).

Al presente, las evidencias del efecto de las crisis convulsivas repetidas inducidas con MP son limitadas. En el estudio realizado por Girardi et al., (2005), la administración repetida de MP cada 24 horas condujo a estado epiléptico fatal en el 100% de los animales en la administración 13. Respecto a los cambios a nivel molecular, es importante señalar que el número de eventos parece ser un factor determinante. Se ha documentado que la inducción de crisis convulsivas repetidas con MP (cada 24 horas durante 4 días) incrementa la expresión de la subunidad GluN2A (Gori & Girardi, 2013) y disminuye la expresión de la subunidad NRB2B de receptores NMDA hipocampales. En contraste, cuando los animales son sometidos a 7 crisis convulsivas (cada 24 horas) tienen una expresión de la subunidad NRB2B similar a los animales control (Auzmendi et al., 2009).

Aunque las evidencias sugieren que los efectos mencionados son transitorios y tienen la finalidad de modular la actividad convulsiva, el proceso adaptativo podría favorecer la excitabilidad y con ello el incremento en la severidad de las crisis (prevalencia de estado epiléptico).

Entre los factores que podrían estar implicados en el incremento en la severidad de las crisis, destacan la producción de especies reactivas de oxígeno y la muerte neuronal. La inducción de una crisis convulsiva con MP genera un aumento transitorio en las especies reactivas de oxígeno. Este efecto ha sido reportado principalmente en la corteza cerebral y el cerebelo (Lores Arnaiz et al., 1998). Adicionalmente, las crisis convulsivas inducidas con MP pueden producir daño en diferentes estructuras cerebrales (sustancia nigra pars reticulata, hipotálamo y globo pálido), condición que tiene una

relación estrecha con la duración del evento (O'Connell et al., 1988). Una de las estructuras con daño significativo es la sustancia nigra (Towfighi et al., 1989), la cual tiene un importante papel como supresor endógeno de la actividad convulsiva (Velíšková & Moshé, 2006). Por lo que es posible que el incremento en la severidad observado en este trabajo, esté relacionado con el daño producido en la sustancia nigra (Brodovskaya & Kapur, 2019) y otras áreas cerebrales.

El desarrollo de estado epiléptico no se debe exclusivamente al fracaso de los mecanismos implicados en la terminación de las crisis convulsivas (Trinka & Kälviäinen, 2017). La inflamación, el incremento en la expresión de péptidos proepileptogénicos (p. Ej. sustancia P, hormona liberadora de corticotropina) y la ruptura de la barrera hematoencefálica son factores que pueden interferir con este proceso (Janković & Đešević, 2022; Walker, 2018). En los últimos años, se ha dado gran importancia a la disfunción-remodelación cerebrovascular y la ruptura de la barrera hematoencefálica, ya que ambos factores pueden favorecer y/o mantener las crisis convulsivas (Marchi, Banjara, & Janigro, 2016; Marchi & Lerner-Natoli, 2013).

Respecto a la disfunción-remodelación vascular, existen evidencias preclínicas que sustentan que las crisis convulsivas pueden inducir el desacople de la unión neurovascular. En condiciones normales durante la actividad convulsiva se produce vasodilatación en respuesta al incremento de las demandas metabólicas. Sin embargo, las crisis convulsivas repetidas se asocian a daño progresivo de los pericitos y en consecuencia a respuestas hemodinámicas inversas (vasoconstricción). Ambos factores interfieren con la repolarización neuronal (Arango-Lievano et al., 2018; Friedman, 2011; Prager et al., 2019; Van Vliet et al., 2015) y al prolongarse la despolarización neuronal también se retarda la terminación de las crisis convulsivas (Friedman, 2011). Debido a que las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral son una consecuencia temprana de la disrupción de la barrera

hematoencefálica (Amtul & Hepburn, 2014), resulta de gran importancia identificar recursos terapéuticos con efecto protector.

Por otra parte, durante el periodo ictal y post-ictal se ha documentado hipoperfusión e hipoxia tisular (Farrell et al., 2017; Parfenova et al., 2005), condiciones que pueden desencadenar un aumento de VEGF-A (Croll et al., 2004). Asimismo, la liberación de IL-1 β y TNF- α durante las crisis convulsivas induce la liberación de VEGF-A en neuronas y células gliales (Vezzani, 2005). Adicionalmente se ha propuesto que la actividad neuronal durante las crisis convulsivas también podría contribuir a este incremento (van Lanen et al., 2021). Es por ello que en este trabajo decidimos evaluar la expresión de VEGF-A.

El aumento en los niveles de VEGF-A ha sido estudiado en diferentes poblaciones celulares del cerebro, entre las que destacan neuronas y células gliales. Se considera que inicialmente el VEGF-A podría ejercer un papel neuroprotector y neurotrófico a través de la activación del receptor 2 (VEGFR-2) (Croll, Goodman, et al., 2004). Además, la producción autocrina y paracrina de VEGF-A ejerce un papel fundamental para la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales (Koch & Claesson-Welsh, 2012). Sin embargo, el VEGF-A también puede desencadenar efectos deletéreos ya que su liberación por astrocitos y microglia favorece la disrupción de la barrera hematoencefálica (Lange et al., 2016).

El incremento en los niveles de VEGF-A asociado a cambios en la permeabilidad y angiogénesis han sido documentados en tejido de pacientes y modelos animales de epilepsia del lóbulo temporal (Castañeda-Cabral et al., 2020; Rigau et al., 2007). Se ha sugerido que bastan 30 min de exposición a VEGF-A para comprometer la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Aunque el proceso de degradación de VEGF-A dura un par de horas, sus efectos tardíos (hasta 24 horas post exposición) se relacionan con su efecto angiogénico (Dobrogowska et al., 1998).

Nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de VEGF-A, efecto que no se asoció a cambios en la expresión de otras proteínas

de la vía de señalización del receptor VEGF-R2 en células endoteliales (Fig. 3). En el estudio de Castañeda-Cabral *et al.* (2020), el incremento en la expresión de VEGF-A se acompañó de un incremento en la expresión del receptor VEGFR-2. Estudios en animales sugieren que un aumento del receptor VEGFR-2 se relaciona con una menor duración de la actividad convulsiva (Nikitidou *et al.*, 2012). Con base en esta información, es posible hipotetizar que las diferencias observadas en la expresión de VEGFR-2 podrían estar relacionadas con la cronicidad y con el tipo de crisis convulsivas que se presentan en la epilepsia del lóbulo temporal (focales secundariamente generalizadas).

Una de las limitaciones de nuestro trabajo es que la determinación en la expresión de VEGF-A se realizó en un bloque de tejido. Por lo que sería de gran utilidad llevar a cabo el análisis de la expresión por estructura cerebral, así como realizar estudios que permitan identificar la población celular involucrada en su producción, así como las células blanco de ese factor de crecimiento, que deberían expresar al VEGFR2 u otro receptor.

Debido a la estrecha relación entre la expresión elevada de VEGF-A y los cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, el siguiente paso fue evaluar la expresión de claudina-5. Nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de esta proteína de las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica. El aumento de claudina-5 se ha reportado anteriormente en tejido cerebral obtenido de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente (Castañeda-Cabral *et al.*, 2020). Sin embargo, parece ser un fenómeno dinámico ya que en un modelo de estado epiléptico se observó una reducción en la expresión de claudina-5 a las 12 h, seguido de un incremento a los tres días (Kim, Ko, Hyun, & Kang, 2015). Ya que claudina-5 regula la permeabilidad paracelular en la barrera hematoencefálica, su sobreexpresión podría ser un mecanismo protector (Ohtsuki *et al.*, 2007) como parte de un proceso reparativo (Kim *et al.*, 2015).

A nivel molecular existen múltiples elementos reguladores de la expresión de claudina-5 (Fig. 15), por lo que es posible que las crisis convulsivas repetidas favorezcan la acción de alguno de éstos.

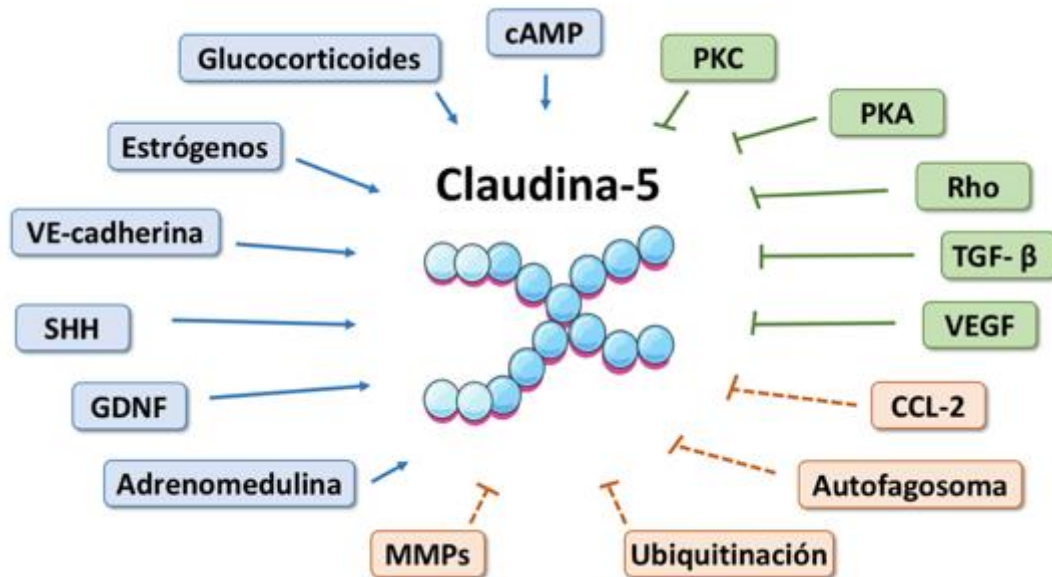


Figura 15. Reguladores de la expresión de claudina-5

CCL-2: Proteína quimioatrayente de monocitos 1, GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía, MMPs: Metaloproteinasas de matriz extracelular, PKA: Proteína cinasa A, PKC: Proteína cinasa C, Rho: Cinasa Rho, SHH: Proteína sonic hedgehog, TGF- β : Factor de crecimiento transformante β , VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (Greene, Hanley, & Campbell, 2019).

La administración aguda y subcrónica de cannabidiol redujo la severidad de la actividad convulsiva en animales sometidos a crisis convulsivas repetidas

En diversos estudios clínicos el cannabidiol ha mostrado reducir la severidad de las crisis convulsivas generalizadas y de difícil control, como las que se presentan en los síndromes de Dravet y Lennox-Gastaut. Asimismo, el cannabidiol reduce la intensidad máxima de las crisis convulsivas en diversos modelos de crisis agudas (Patra et al., 2019b). En este trabajo evaluamos la eficacia de la administración oral de cannabidiol en el control de las crisis convulsivas generalizadas repetidas. Estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo sugieren que una dosis de cannabidiol (200 mg/Kg v.o.) incrementa el umbral post-descarga en ratas normales (Pinedo-Rodríguez, 2020). Es

importante señalar que nuestro trabajo es el primero en evaluar el efecto del cannabidiol en un modelo de crisis severas de difícil control. Esta característica podría ser un factor determinante en la respuesta al tratamiento, por lo que también consideramos evaluar el efecto de la administración subcrónica de cannabidiol (50 mg/Kg v.o.) durante la inducción de crisis repetidas generalizadas. Además, consideramos que la administración subcrónica de cannabidiol (200 mg/Kg v.o.) en ratas podría modificar la expresión de las crisis convulsivas inducidas con MP, tal como se ha visto en otros modelos de crisis convulsivas secundariamente generalizadas (Patra et al., 2019a).

Nuestros resultados muestran que la administración aguda o subcrónica de cannabidiol no modifica la expresión de crisis convulsivas mayores y menores inducidas por MP. Adicionalmente, la administración de cannabidiol durante el periodo de inducción de crisis tampoco modifica la expresión de las crisis convulsivas. Esta falta de efectos podría deberse a que la eficacia del cannabidiol en el manejo de las crisis de difícil control, se observa cuando los pacientes lo reciben en combinación con antiepilépticos durante al menos 4 semanas (Gofshteyn et al., 2017). Incluso, se ha recomendado completar un periodo de hasta doce semanas de tratamiento para alcanzar el efecto anticonvulsivo (Australian Government, Department of Health, 2017).

En relación al estado epiléptico, encontramos que la administración aguda o subcrónica de cannabidiol reduce su prevalencia (grupos **MP** y **CBD-MP**). Estos datos sugieren que, aunque el cannabidiol no modificó la expresión de la actividad convulsiva en ratas sometidas a crisis generalizadas repetidas, el cannabidiol en monoterapia reduce su severidad.

Los efectos del cannabidiol en la severidad de la actividad convulsiva podrían estar relacionados con su acción en sistemas de neurotransmisión involucrados en la terminación de las crisis. El cannabidiol produce un aumento del tono de adenosina al incrementar los niveles extracelulares (Mijangos-Moreno et al., 2014), ya que ejerce un efecto inhibitorio de la recaptura de adenosina (Liou et al., 2008; Nichol et al., 2019).

La adenosina tiene un papel fundamental en la prevención del estado epiléptico (Avsar & Empson, 2004; Young & Dragunow, 1994). Incluso se ha sugerido que podría contrarrestar el desacople de la unión neurovascular, la inflamación, así como ejercer un efecto neuroprotector en condiciones de hipoxia postictal. Es por ello que la inhibición de la recaptura de adenosina es un mecanismo de gran utilidad en la regulación de la actividad convulsiva (Gray & Whalley, 2020; Purnell et al., 2021).

La administración aguda y subcrónica de cannabidiol incrementa la expresión de claudina-5 en animales sometidos a crisis convulsivas generalizadas repetidas

La administración de cannabidiol (200 mg/kg v.o.) en animales de los grupos **MP** y **CBD-MP**, mantuvo la expresión de VEGF-A, VEGF-R2 y eNOS en valores similares a los observados en el grupo control.

Se ha sugerido que la administración de un tratamiento anti-VEGF (sunitinib, inhibidor tirosina-cinasa de receptores VEGF-R1, VEGF-R2, PDGF-R β) podría evitar la progresión de la epilepsia del lóbulo temporal en el modelo de litio pilocarpina (Benini et al., 2016). Sin embargo, no podemos ignorar que a corto plazo el VEGF-A parece tener efecto neuroprotector (Croll, Goodman, et al., 2004) y que los niveles bajos de VEGF-A han sido vinculados con procesos neurodegenerativos (Storkebaum & Carmeliet, 2004). Estas evidencias destacan la importancia de contar con un fármaco modulador, que favorezca la neuroprotección y además reduzca el efecto inflamatorio y angiogénico que induce la exposición prolongada a VEGF-A (Croll, Ransohoff, et al., 2004). En el diseño de este trabajo consideramos que el cannabidiol podría cumplir con estas características.

El efecto del cannabidiol en la expresión de VEGF-A ya había sido evaluado previamente a nivel de la barrera hematorretiniana (El-Remessy et al., 2006). A diferencia de este estudio, nuestro trabajo consistió en determinar la expresión a nivel de la barrera hematoencefálica. En estudios

in vitro se ha reportado que el cannabidiol es capaz de inhibir procesos mediados por VEGF a través de la activación del receptor VEGFR-2: migración de células endoteliales, formación de estructuras similares a capilares, así como la actividad de metaloproteinasas 2 y 9 (Solinas et al., 2012). Estas evidencias sugieren que el tratamiento con cannabidiol podría reducir los efectos angiogénicos del VEGF-A, que a largo plazo pueden mantener las alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y que son evidentes en el cerebro con epilepsia (Morin-Bureau et al., 2012; Rigau et al., 2007). Adicionalmente, son bien conocidas las propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras del cannabidiol (Castillo et al., 2010; El-Remessy et al., 2006; Rosenberg et al., 2017).

Un hallazgo interesante fue el incremento en la expresión de claudina-5 en los animales con administración aguda (**grupo MP**) y subcrónica de cannabidiol (**grupo CBD-MP**). Este efecto podría estar favorecido por la menor actividad de las metaloproteinasas. Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos, ya que la proteína VE-cadherina es un modulador transcripcional de claudina-5 y la estimulación del receptor VEGF-R2 por el VEGF interfiere con este proceso (Gavard & Gutkind, 2008).

La combinación de fenobarbital con cannabidiol subcrónico evitó las crisis mayores y disminuyó la severidad de la actividad convulsiva

Debido a que a nivel clínico, los beneficios del tratamiento con cannabidiol se han observado en pacientes sometidos a politerapia, se decidió incluir el tratamiento combinado con otros fármacos anticonvulsivos. La modulación de la neurotransmisión GABAérgica mediada por antiepilépticos y fitocannabinoides es considerada un enfoque terapéutico para controlar la epilepsia (Brodie & Kwan, 2012; Cifelli et al., 2020). Algunos estudios indican que el cannabidiol modifica los efectos de antiepilépticos específicos en modelos de crisis convulsivas agudas parciales y generalizadas. En este trabajo encontramos que el fenobarbital no modifica

las crisis convulsivas menores, sin embargo, reduce la expresión de crisis convulsivas mayores en ratas sometidas a crisis convulsivas repetidas. Este efecto no fue modificado cuando fenobarbital fue combinado con cannabidiol en los grupos MP y CBD-MP. Estos hallazgos indican que el cannabidiol no modifica el efecto anticonvulsivo inducido por una dosis única de fenobarbital. De hecho estos resultados coinciden con la falta de efectividad de la administración aguda de fenobarbital en combinación con cannabidiol (50 mg/kg) para modificar la extensión de miembros superiores en un modelo experimental de crisis convulsivas generalizadas (Cherscher et al., 1975).

Por otra parte, la administración aguda de CBD-PB evitó el efecto protector en la severidad de la actividad convulsiva (estado epiléptico) inducido por cada fármaco por separado. Si bien la administración de fenobarbital solo reduce la prevalencia de estado epiléptico, es importante señalar que esto podría estar relacionado con la reducción en la prevalencia de crisis convulsivas mayores. Sin embargo, es posible que al administrar la combinación se favorezca la sincronización neuronal por un incremento de la neurotransmisión GABAérgica (Burman et al., 2019; Cock, 2015), ya que ambos fármacos son moduladores alostéricos del receptor GABA_A (Bakas et al., 2017). Por otra parte, es importante considerar las posibles interacciones farmacocinéticas entre ambos fármacos. El fenobarbital es metabolizado en el hígado por hidroxilación y glucoronidación principalmente por la enzima CYP2C9. Ya que el cannabidiol es un inhibidor de las enzimas responsables del metabolismo de fenobarbital (CYP2C9 y CYP2C19) (Kocis & Vrana, 2020), la combinación de ambos fármacos podría incrementar los niveles de fenobarbital y en consecuencia inducir efectos tóxicos que faciliten el estado epiléptico.

Un hallazgo relevante fue que la combinación aguda de cannabidiol con fenobarbital en animales pretratados subcrónicamente con cannabidiol evitó las crisis mayores y mantuvo baja la severidad (estado epiléptico). Esto sugiere que la administración subcrónica de cannabidiol podría generar cambios en la estructura, localización y función de receptores (Abbas,

Nogueira, & Azmitia, 2007; Kumar et al., 2019; Yu & Rasenick, 2012) que faciliten los efectos inhibitorios a largo plazo y reduzcan la excitabilidad neuronal. Al presente no hay información al respecto, por lo que es importante llevar a cabo estudios adicionales que nos permitan evaluar los efectos del cannabidiol a nivel cerebral.

La administración de cannabidiol en combinación con fenitoína mantuvo elevada la severidad de la actividad convulsiva

Algunos estudios indican que el cannabidiol incrementa el efecto de la fenitoína en el modelo de crisis inducidas por electroshock. En el presente estudio encontramos que la administración aguda o subcrónica de cannabidiol en combinación con fenitoína exacerba o mantiene elevada la prevalencia de estado epiléptico convulsivo. Algunas evidencias experimentales indican que la fenitoína puede exacerbar la expresión de las crisis, efectos que posiblemente dependan del estado neuronal previo y de la falla de mecanismos homeostáticos (Jurna, 1985; Wolfgang Löscher, Cramer, & Ebert, 1998; Thomas & Petrou, 2013). Por otra parte, es posible que el efecto de la combinación de cannabidiol con fenitoína se deba a la acción de ambos fármacos en la cinética de los canales de sodio dependientes de voltaje, puesto que comparten este mecanismo de acción (Ghovanloo et al., 2018). Sin embargo, en este caso tampoco podemos descartar la posibilidad de interacciones farmacocinéticas. Fenitoína también es metabolizada por las enzimas CYP2C9 y CYP2C19, adicionalmente tiene una alta unión a proteínas (90%) por lo que la administración conjunta con cannabidiol (unión a proteínas > 94%) podría incrementar la fracción libre del fármaco (Kocis & Vrana, 2020; Patsalos et al., 2020) y en consecuencia agravar las crisis convulsivas (Osorio, Burastine, Render, Manon-Espaillet, & Reed, 1989; Troupin & Ojemann, 1975).

8. Conclusiones

La disminución en la prevalencia de estado epiléptico inducida por el cannabidiol sugiere que este fitocannabinoide es capaz de modificar la severidad de las crisis convulsivas repetidas. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para sustentar que la administración de cannabidiol al inicio de las crisis convulsivas podría evitar el fenotipo farmacorresistente en pacientes con crisis convulsivas severas. Una limitación de nuestro estudio es la falta de evaluación del daño histológico por las crisis convulsivas repetidas inducidas con MP. Por otra parte, aunque el cannabidiol reduce la expresión de VEGF e incrementa la expresión de Claudina-5, se requieren estudios adicionales para identificar las consecuencias funcionales y su posible relación con la expresión/severidad de la actividad convulsiva.

9. Perspectivas y limitaciones

Aunque existen evidencias de las acciones del cannabidiol en múltiples blancos terapéuticos (receptores, canales iónicos, transportadores), al presente se desconoce cómo modifica la actividad convulsiva. Es indispensable llevar a cabo un análisis más detallado que permita determinar los mecanismos participantes en la reducción de la severidad de la actividad convulsiva. Para este propósito se puede hacer uso de antagonistas. Por ejemplo, dado el papel de la adenosina en la terminación de las crisis y la inhibición de su recaptura con el uso de cannabidiol, la administración de un antagonista de adenosina permitiría confirmar o descartar su participación.

Otro aspecto importante es el estudio de la combinación de cannabidiol con diferentes fármacos antiepilépticos para reducir la severidad de la actividad convulsiva. A nivel clínico la administración de cannabidiol puede realizarse en combinación con uno o más fármacos anticonvulsivantes. No es infrecuente que durante los ensayos clínicos algunos participantes se retiren del estudio por la aparición de efectos adversos. Esta situación, aunada a nuestros resultados destacan la importancia de identificar las combinaciones con mayores beneficios y el menor potencial de efectos adversos. Para este

propósito un análisis isoblográfico sería de gran utilidad, permitiendo determinar el tipo de interacción entre fármacos. Algunos de los efectos adversos, podrían requerir de la realización de un estudio farmacocinético con un perfil bioquímico que incluya enzimas hepáticas.

Por otro lado como se mencionó previamente, una de las limitaciones de nuestro estudio fue el análisis de la expresión de proteínas en un bloque de tejido. Debido a la participación de los mediadores inflamatorios en la disrupción de la barrera hematoencefálica, en una primera aproximación pensamos llevar a cabo la determinación de la expresión de IL-1 β y TNF- α . Este análisis resulta interesante, ya que su reducción ha sido vinculada con la disminución en la duración de las crisis convulsivas. Sin embargo, tanto para el estudio de los mediadores inflamatorios como para la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica, aportaría mayor información la determinación por estructura cerebral. Incluso, el análisis de la expresión de proteínas de la barrera hematoencefálica podría complementarse con estudios de inmunofluorescencia que permitan identificar la población celular que está participando.

Con respecto a los efectos del cannabidiol en la expresión proteica de VEGF-A, sería de gran utilidad un análisis con la técnica de ELISA que permita detectar los cambios en la concentración de isoformas específicas (Vernes & Meng, 2015). Este enfoque permitiría dilucidar las posibles consecuencias funcionales, ya que a pesar de tener afinidad similar por los receptores, las isoformas de VEGF-A pueden tener efectos opuestos en la señalización (por ejemplo, efecto angiogénico vs antiangiogénico) (Bates et al., 2013).

De igual manera, el efecto biológico de la sobreexpresión de claudina-5 a consecuencia de la inducción de crisis y el tratamiento con cannabidiol requiere de un estudio más profundo. El uso de trazadores como el azul de Evans (el cual tiene un peso molecular similar a la albúmina) puede ser de gran utilidad para evaluar la integridad de la barrera y determinar si efectivamente la sobreexpresión de claudina-5 podría tener un efecto

protector. Adicionalmente es indispensable el estudio de otras proteínas de las uniones estrechas como ZO-1 y occludina.

Finalmente, dadas las tendencias actuales para tomar en consideración el sexo en la investigación preclínica y las posibles diferencias farmacocinéticas que podrían presentarse con el uso del cannabidiol, sería de gran utilidad evaluar los efectos estudiados en ratas hembra.

10. Referencias

- Adams, R., Cain, C. K., McPhee, W. D., & Wearn, R. B. (1941). Structure of Cannabidiol. XII. Isomerization to Tetrahydrocannabinols 1. *Journal of the American Chemical Society*, 63(8), 2209–2213. <https://doi.org/10.1021/ja01853a052>
- Adams, R., Loewe, S., Jelinek, C., & Wolff, H. (1941). Tetrahydrocannabinol Homologs with Marihuana Activity. IX 1. *Journal of the American Chemical Society*, 63(7), 1971–1973. <https://doi.org/10.1021/ja01852a052>
- Adams, R., Pease, D. C., Cain, C. K., & Clark, J. H. (1940). Structure of Cannabidiol. VI. Isomerization of Cannabidiol to Tetrahydrocannabinol, a Physiologically Active Product. Conversion of Cannabidiol to Cannabinol 1. *Journal of the American Chemical Society*, 62(9), 2402–2405. <https://doi.org/10.1021/ja01866a040>
- Adams, R., Pease, D. C., & Clark, J. H. (1940). Isolation of Cannabinol, Cannabidiol and Quebrachitol from Red Oil of Minnesota Wild Hemp. *Journal of the American Chemical Society*, 62(8), 2194–2196. <https://doi.org/10.1021/ja01865a080>
- Al Saabi, A., Allorge, D., Sauvage, F.-L., Tournel, G., Gaulier, J., Marquet, P., & Picard, N. (2013). Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases UGT1A9 and UGT2B7 in Ethanol Glucuronidation, and Interactions with Common Drugs of Abuse. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(3), 568–574. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.047878>
- Amtul, Z., & Hepburn, J. D. (2014). Protein markers of cerebrovascular disruption of neurovascular unit: immunohistochemical and imaging approaches. *Reviews in the Neurosciences*, 25(4). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0041>
- Arango-Lievano, M., Boussadia, B., De Terdonck, L. D. T., Gault, C., Fontanaud, P., Lafont, C., ... Jeanneteau, F. (2018). Topographic Reorganization of Cerebrovascular Mural Cells under Seizure Conditions. *Cell Reports*, 23(4), 1045–1059. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.110>
- Atsmon, J., Heffetz, D., Deutsch, L., Deutsch, F., & Sacks, H. (2018). Single-Dose Pharmacokinetics of Oral Cannabidiol Following Administration of PTL101: A New Formulation Based on Gelatin Matrix Pellets Technology. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 7(7), 751–758. <https://doi.org/10.1002/cpdd.408>
- Australian Government, Department of Health, T. G. A. Guidance for the use of medicinal cannabis in the treatment of epilepsy in paediatric and young adult patients in Australia (2017). Australia. Retrieved from <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/guidance-use-medicinal-cannabis-treatment-epilepsy-paediatric-and-young-adult-patients-australia.pdf>
- Auzmendi, J, González, N., & Girardi, E. (2009). The NMDAR Subunit NR2B Expression is Modified in Hippocampus after Repetitive Seizures. *Neurochemical Research*, 34(5), 819–826. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9828-0>

- Auzmendi, Jerónimo, Merelli, A., Girardi, E., Orozco-Suarez, S., Rocha, L., & Lazarowski, A. (2014). Progressive heart P-glycoprotein (P-gp) overexpression after experimental repetitive seizures (ERS) associated with fatal status epilepticus (FSE). Is it related with SUDEP. *Molecular & Cellular Epilepsy*, *1*, 43–51. <https://doi.org/10.14800/mce.66>.
- Avsar, E., & Empson, R. M. (2004). Adenosine acting via A1 receptors, controls the transition to status epilepticus-like behaviour in an in vitro model of epilepsy. *Neuropharmacology*, *47*(3), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.015>
- Bakas, T., van Nieuwenhuijzen, P. S., Devenish, S. O., McGregor, I. S., Arnold, J. C., & Chebib, M. (2017). The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABA A receptors. *Pharmacological Research*, *119*, 358–370. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.022>
- Bates, D. O., Mavrou, A., Qiu, Y., Carter, J. G., Hamdollah-Zadeh, M., Barratt, S., ... Harper, S. J. (2013). Detection of VEGF-A(xxx)b isoforms in human tissues. *PLoS One*, *8*(7), e68399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068399>
- Beghi, E., Garattini, L., Ricci, E., Cornago, D., & Parazzini, F. (2004). Direct Cost of Medical Management of Epilepsy among Adults in Italy: A Prospective Cost-of-Illness Study (EPICOS). *Epilepsia*, *45*(2), 171–178. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.14103.x>
- Beniczky, S., Arbune, A. A., Jeppesen, J., & Ryvlin, P. (2020). Biomarkers of seizure severity derived from wearable devices. *Epilepsia*, *61*(S1). <https://doi.org/10.1111/epi.16492>
- Benini, R., Roth, R., Khoja, Z., Avoli, M., & Wintermark, P. (2016). Does angiogenesis play a role in the establishment of mesial temporal lobe epilepsy? *International Journal of Developmental Neuroscience*, *49*(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.01.001>
- Bennett, H. C., & Kim, Y. (2021). Pericytes Across the Lifetime in the Central Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.627291>
- Betjemann, J. P., & Lowenstein, D. H. (2015). Status epilepticus in adults. *The Lancet Neurology*, *14*(6), 615–624. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00042-3)
- Biosciences, G. (2022). Cannabidiol (Epidiolex). Full prescribing information. Retrieved from [https://www.epidiolex.com/sites/default/files/pdfs/0222/EPX-03645-0222-EPIDIOLEX_\(cannabidiol\)_USPI.pdf](https://www.epidiolex.com/sites/default/files/pdfs/0222/EPX-03645-0222-EPIDIOLEX_(cannabidiol)_USPI.pdf)
- Birnbaum, A. K., Karanam, A., Marino, S. E., Barkley, C. M., Rimmel, R. P., Roslawski, M., ... Leppik, I. E. (2019). Food effect on pharmacokinetics of cannabidiol oral capsules in adult patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, *60*(8), 1586–1592. <https://doi.org/10.1111/epi.16093>
- Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., ... Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic

- hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology*, 134(4), 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Blumenfeld, H., Rivera, M., Vasquez, J. G., Shah, A., Ismail, D., Enev, M., & Zaveri, H. P. (2007). Neocortical and Thalamic Spread of Amygdala Kindled Seizures. *Epilepsia*, 48(2), 254–262. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00934.x>
- Brodovskaya, A., & Kapur, J. (2019). Circuits generating secondarily generalized seizures. *Epilepsy & Behavior*, 101, 106474. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106474>
- Carlini, E. A., & Cunha, J. M. (1981). Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *Journal of Clinical Pharmacology*, 21(S1), 417S-427S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7028792>
- Carlini, E. A., Leite, J. R., Tannhauser, M., & Berardi, A. C. (1973). Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25(8), 664–665. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1973.tb10660.x>
- Castañeda-Cabral, J. L., Colunga-Durán, A., Ureña-Guerrero, M. E., Beas-Zárate, C., Nuñez-Lumbreras, M. de los A., Orozco-Suárez, S., ... Rocha, L. (2020). Expression of VEGF- and tight junction-related proteins in the neocortical microvasculature of patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Microvascular Research*, 132, 104059. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104059>
- Castillo, A., Tolón, M. R., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., & Martínez-Orgado, J. (2010). The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiology of Disease*, 37(2), 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.023>
- Chesher, G. B., & Jackson, D. M. (1974). Anticonvulsant effects of cannabinoids in mice: drug interactions within cannabinoids and cannabinoid interactions with phenytoin. *Psychopharmacologia*, 37(3), 255–264. <https://doi.org/10.1007/BF00421539>
- Chesher, G. B., Jackson, D. M., & Malor, R. M. (1975). Interaction of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol with phenobarbitone in protecting mice from electrically induced convulsions. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 27(8), 608–609. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1975.tb09515.x>
- Claassen, J., Lokin, J. K., Fitzsimmons, B.-F. M., Mendelsohn, F. A., & Mayer, S. A. (2002). Predictors of functional disability and mortality after status epilepticus. *Neurology*, 58(1), 139–142. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.1.139>
- Cole, A. J., Koh, S., & Zheng, Y. (2002). Are seizures harmful: What can we learn from animal models? *Progress in Brain Research*, 135, 13–23. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)35004-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)35004-0)
- Costa, B., Giagnoni, G., Franke, C., Trovato, A. E., & Colleoni, M. (2004). Vanilloid

- TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 143(2), 247–250. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705920>
- Cramer, J. A., & French, J. (2008). Quantitative Assessment of Seizure Severity for Clinical Trials: A Review of Approaches to Seizure Components. *Epilepsia*, 42(1), 119–129. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.19400.x>
- Crockett, J., Critchley, D., Tayo, B., Berwaerts, J., & Morrison, G. (2020). A phase 1, randomized, pharmacokinetic trial of the effect of different meal compositions, whole milk, and alcohol on cannabidiol exposure and safety in healthy subjects. *Epilepsia*, 61(2), 267–277. <https://doi.org/10.1111/epi.16419>
- Croll, S. D., Goodman, J. H., & Scharfman, H. E. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 548, 57–68. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6376-8_4
- Croll, S. D., Ransohoff, R. M., Cai, N., Zhang, Q., Martin, F. J., Wei, T., ... Wiegand, S. J. (2004). VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain. *Experimental Neurology*, 187(2), 388–402. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.02.010>
- Cunha, J. M., Carlini, E. A., Pereira, A. E., Ramos, O. L., Pimentel, C., Gagliardi, R., ... Mechoulam, R. (1980). Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 21(3), 175–185. <https://doi.org/10.1159/000137430>
- De Lores Arnaiz, G. R., De Canal, M. A., Robiolo, B., & De Pacheco, M. M. (1973). The effect of the convulsant 3-mercaptopropionic acid on enzymes of the gamma-aminobutyrate system in the rat cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry*, 21(3), 615–623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb06006.x>
- Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., ... Riedel, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive–compulsive behavior. *Psychopharmacology*, 219(3), 859–873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>
- Devinsky, O. (2022). Epilepsy Mortality. *Neurology*, 98(3), 93–94. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000013069>
- DeWolfe, J. L., Bebin, E. M., Cutter, G. R., Liu, Y., & Szaflarski, J. P. (2016). Effects of pharmaceutical grade Cannabidiol on seizure severity. In *American Epilepsy Society Annual Meeting* (p. Abst. 2.100). Retrieved from <https://www.aesnet.org/abstractslisting/effects-of-pharmaceutical-grade-cannabidiol-on-seizure-severity>
- Do Val-da Silva, R. A., Peixoto-Santos, J. E., Kandratavicius, L., de Ross, J. B., Esteves, I., de Martinis, B. S., ... Leite, J. P. (2017). Protective effects of cannabidiol against seizures and neuronal death in a rat model of mesial temporal

- lobe epilepsy. *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00131>
- Dobrogowska, D. H., Lossinsky, A. S., Tarnawski, M., & Vorbrodt, A. W. (1998). Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Neurocytology*, 27(3), 163–173. <https://doi.org/10.1023/a:1006907608230>
- El-Remessy, A. B., Al-Shabrawey, M., Khalifa, Y., Tsai, N.-T., Caldwell, R. B., & Liou, G. I. (2006). Neuroprotective and Blood-Retinal Barrier-Preserving Effects of Cannabidiol in Experimental Diabetes. *The American Journal of Pathology*, 168(1), 235–244. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050500>
- Elmes, M. W., Kaczocha, M., Berger, W. T., Leung, K., Ralph, B. P., Wang, L., ... Deutsch, D. G. (2015). Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *The Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 8711–8721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618447>
- EMA. (2020). Epidyolex. Retrieved from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/epidyolex#authorisation-details-section>
- Etemad, L., Karimi, G., Alavi, M. S., & Roohbakhsh, A. (2022). Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. *Life Sciences*, 300, 120582. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120582>
- Fang, M., Xi, Z.-Q., Wu, Y., & Wang, X.-F. (2011). A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis. *Medical Hypotheses*, 76(6), 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.02.039>
- Farrell, J. S., Colangeli, R., Wolff, M. D., Wall, A. K., Phillips, T. J., George, A., ... Teskey, G. C. (2017). Postictal hypoperfusion/hypoxia provides the foundation for a unified theory of seizure-induced brain abnormalities and behavioral dysfunction. *Epilepsia*, 58(9), 1493–1501. <https://doi.org/10.1111/epi.13827>
- Farrell, J. S., Gaxiola-Valdez, I., Wolff, M. D., David, L. S., Dika, H. I., Geeraert, B. L., ... Teskey, G. C. (2016). Postictal behavioural impairments are due to a severe prolonged hypoperfusion/hypoxia event that is COX-2 dependent. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19352>
- FDA. (2018). FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy. Retrieved September 28, 2020, from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms>
- FDA. (2020). FDA Approves New Indication for Drug Containing an Active Ingredient Derived from Cannabis to Treat Seizures in Rare Genetic Disease. Retrieved February 14, 2021, from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-indication-drug-containing-active-ingredient-derived-cannabis-treat-seizures-rare>
- Ferland, R. J., & Applegate, C. D. (1998). Decreased brainstem seizure thresholds

- and facilitated seizure propagation in mice exposed to repeated flurothyl-induced generalized forebrain seizures. *Epilepsy Research*, 30(1), 49–62. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(97\)00093-4](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(97)00093-4)
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... Wiebe, S. (2014). ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Folbergrová, J. (1977). Cerebral energy reserves of mice during seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. *Neuroscience*, 2(2), 315–319. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(77\)90098-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(77)90098-7)
- Friedman, A. (2011). Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia*, 52 Suppl 8, 19–20. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03227.x>
- Friedman, D., French, J. A., & Maccarrone, M. (2019). Safety, efficacy, and mechanisms of action of cannabinoids in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 18(5), 504–551. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30032-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30032-8)
- Gaston, T. E., Ampah, S. B., Martina Bebin, E., Grayson, L. P., Cutter, G. R., Hernando, K., & Szaflarski, J. P. (2021). Long-term safety and efficacy of highly purified cannabidiol for treatment refractory epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 117, 107862. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107862>
- Ghovanloo, M.-R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16546–16558. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004929>
- Giraldez, L., Zanetti, F., Antonelli, M. C., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., & Girardi, E. (1998). CNS adenosine A1 receptors are altered after the administration of convulsant 3-mercaptopropionic acid and cyclopentyladenosine: an autoradiographic study. *Neurochemical Research*, 23(2), 175–181. <https://doi.org/10.1023/a:1022428808451>
- Giraldez, L., Zanetti, F., & Girardi, E. (1999). Striatum adenosine A2 receptors are modified during seizure: effect of cyclopentyladenosine administration. *Neurochemical Research*, 24(10), 1217–1223. <https://doi.org/10.1023/a:1020964721242>
- Girardi, E., Perez, R., & Rodriguez de Lores, A. (1989). A study of 5'-nucleotidase activity in subcellular fractions of rat cerebellum after the administration of the convulsant 3-mercaptopropionic acid. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 11(2), 65–75. <https://doi.org/10.1007/BF03160041>
- Girardi, E., Schneider, P., & Rodriguez De Lores Arnaiz, G. (1994). Area-specific modification of acetylcholinesterase activity following 3-mercaptopropionic acid-induced seizures. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 21(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/BF03160081>
- Girardi, Elena, González, N. N., & Lazarowski, A. (2005). Refractory phenotype reversion by nimodipine administration in a model of epilepsy resistant to

phenytoin (PHT) treatment. *Epilepsia*, 46(Suppl 6), 212:606.

- Gobira, P. H., Vilela, L. R., Gonçalves, B. D. C., Santos, R. P. M., de Oliveira, A. C., Vieira, L. B., ... Moreira, F. A. (2015). Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. *Neurotoxicology*, 50, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.007>
- Gofshteyn, J. S., Wilfong, A., Devinsky, O., Bluvstein, J., Charuta, J., Ciliberto, M. A., ... Marsh, E. D. (2017). Cannabidiol as a potential treatment for febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES) in the acute and chronic phases. *Journal of Child Neurology*, 32(1), 35–40. <https://doi.org/10.1177/0883073816669450>
- Gori, M. B., & Girardi, E. (2013). 3-Mercaptopropionic acid-induced repetitive seizures increase GluN2A expression in rat hippocampus: a potential neuroprotective role of cyclopentyladenosine. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33(6), 803–813. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9947-2>
- Grabenstatter, H. L., & Dudek, F. E. (2008). A new potential AED, carisbamate, substantially reduces spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia*, 49(10), 1787–1794. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01657.x>
- Grabenstatter, H. L., & Dudek, F. E. (2019). Effect of carbamazepine on spontaneous recurrent seizures recorded from the dentate gyrus in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia*, 60(4), 636–647. <https://doi.org/10.1111/epi.14680>
- Grabenstatter, H. L., Ferraro, D. J., Williams, P. A., Chapman, P. L., & Dudek, F. E. (2005). Use of chronic epilepsy models in antiepileptic drug discovery: the effect of topiramate on spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia*, 46(1), 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.13404.x>
- Gray, R. A., & Whalley, B. J. (2020). The proposed mechanisms of action of CBD in epilepsy. *Epileptic Disorders: International Epilepsy Journal with Videotape*, 22(S1), 10–15. <https://doi.org/10.1684/epd.2020.1135>
- Greene, C., Hanley, N., & Campbell, M. (2019). Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids and Barriers of the CNS*, 16(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0123-z>
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173–185. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>
- Hedayat, A. S., & Yang, M. (2005). Optimal and efficient crossover designs for comparing test treatments with a control treatment. *The Annals of Statistics*, 33(2). <https://doi.org/10.1214/009053604000000887>
- Hesdorffer, D. C., Tomson, T., Benn, E., Sander, J. W., Nilsson, L., Langan, Y., ... Hauser, A. (2011). Combined analysis of risk factors for SUDEP. *Epilepsia*, 52(6), 1150–1159. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02952.x>

- Hind, W. H., England, T. J., & O'Sullivan, S. E. (2016). Cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR γ and 5-HT $_{1A}$ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 173(5), 815–825. <https://doi.org/10.1111/bph.13368>
- Holland, M. L., Panetta, J. A., Hoskins, J. M., Bebawy, M., Roufogalis, B. D., Allen, J. D., & Arnold, J. C. (2006). The effects of cannabinoids on P-glycoprotein transport and expression in multidrug resistant cells. *Biochemical Pharmacology*, 71(8), 1146–1154. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.033>
- Holland, Michelle L., Allen, J. D., & Arnold, J. C. (2008). Interaction of plant cannabinoids with the multidrug transporter ABCC1 (MRP1). *European Journal of Pharmacology*, 591(1–3), 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.079>
- Holmes, G. L., Gairsa, J.-L., Chevassus-Au-Louis, N., & Ben-Ari, Y. (1998). Consequences of neonatal seizures in the rat: Morphological and behavioral effects. *Annals of Neurology*, 44(6), 845–857. <https://doi.org/10.1002/ana.410440602>
- Hosseinzadeh, M., Nikseresht, S., Khodaghali, F., Naderi, N., & Maghsoudi, N. (2016). Cannabidiol Post-Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine-Induced Seizure. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 58(4), 432–440. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0703-6>
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Iannotti, F. A., Hill, C. L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzarella, E., ... Stephens, G. J. (2014). Nonpsychotropic Plant Cannabinoids, Cannabidivarin (CBDV) and Cannabidiol (CBD), Activate and Desensitize Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channels in Vitro: Potential for the Treatment of Neuronal Hyperexcitability. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(11), 1131–1141. <https://doi.org/10.1021/cn5000524>
- Itin, C., Barasch, D., Domb, A. J., & Hoffman, A. (2020). Prolonged oral transmucosal delivery of highly lipophilic drug cannabidiol. *International Journal of Pharmaceutics*, 581, 119276. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119276>
- Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L. P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., ... Friedman, A. (2007). TGF- receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain*, 130(2), 535–547. <https://doi.org/10.1093/brain/awl317>
- Izquierdo, I., Orsingher, O. A., & Berardi, A. C. (1973). Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. *Psychopharmacologia*, 28(1), 95–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4714680>
- Jacob, A., & Todd, A. R. (1940). Cannabidiol and Cannabiol, Constituents of Cannabis indica Resin. *Nature*, 145(3670), 350–350. <https://doi.org/10.1038/145350a0>

- Jakobsen, A. V., & Elklit, A. (2021). Self-control and coping responses are mediating factors between child behavior difficulties and parental stress and family impact in caregivers of children with severe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, *122*, 108224. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108224>
- Janković, S. M., & Đešević, M. (2022). Advancements in neuroactive peptides in seizures. *Expert Review of Neurotherapeutics*, *22*(2), 129–143. <https://doi.org/10.1080/14737175.2022.2031983>
- Jiang, R., Yamaori, S., Takeda, S., Yamamoto, I., & Watanabe, K. (2011). Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. *Life Sciences*, *89*(5–6), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.018>
- Jones, N. A., Glyn, S. E., Akiyama, S., Hill, T. D. M., Hill, A. J., Weston, S. E., ... Williams, C. M. (2012). Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure*, *21*(5), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.03.001>
- Jones, N. A., Hill, A. J., Smith, I., Bevan, S. A., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2010). Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *332*(2), 569–577. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159145>
- Kälviäinen, R., & Salmenperä, T. (2002). Do recurrent seizures cause neuronal damage? A series of studies with MRI volumetry in adults with partial epilepsy. *Progress in Brain Research*, *135*, 279–295. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)35026-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)35026-X)
- Kaplan, J. S., Stella, N., Catterall, W. A., & Westenbroek, R. E. (2017). Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of Dravet syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(42), 11229–11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711351114>
- Karlsson, A., Fonnum, F., Malthe-Sørensen, D., & Storm-Mathisen, J. (1974). Effect of the convulsive agent 3-mercaptopropionic acid on the levels of GABA, other amino acids and glutamate decarboxylase in different regions of the rat brain. *Biochemical Pharmacology*, *23*(21), 3053–3061. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90281-0)
- Kathmann, M., Flau, K., Redmer, A., Tränkle, C., & Schlicker, E. (2006). Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *372*(5), 354–361. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0033-x>
- Kim, J. Y., Ko, A.-R., Hyun, H.-W., & Kang, T.-C. (2015). ETB receptor-mediated MMP-9 activation induces vasogenic edema via ZO-1 protein degradation following status epilepticus. *Neuroscience*, *304*, 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.065>
- Knaub, K., Sartorius, T., Dharsono, T., Wacker, R., Wilhelm, M., & Schön, C. (2019). A Novel Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) Based on VESIsorb® Formulation Technology Improving the Oral Bioavailability of Cannabidiol in

- Healthy Subjects. *Molecules*, 24(16), 2967.
<https://doi.org/10.3390/molecules24162967>
- Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), a006502–a006502. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>
- Kocis, P. T., & Vrana, K. E. (2020). Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Drug-Drug Interactions. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 61–73. <https://doi.org/10.1159/000507998>
- Kothare, S. V., & Trevathan, E. (2018). Sudden death risk among children with epilepsy. *Neurology*, 91(2), 57–58. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005763>
- Kovács, R., Gerevich, Z., Friedman, A., Otáhal, J., Prager, O., Gabriel, S., & Berndt, N. (2018). Bioenergetic Mechanisms of Seizure Control. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00335>
- Kumar, P., Lim, A., Hazirah, S. N., Chua, C. J. H., Ngoh, A., Poh, S. L., ... Albani, S. (2022). Single-cell transcriptomics and surface epitope detection in human brain epileptic lesions identifies pro-inflammatory signaling. *Nature Neuroscience*, 25(7), 956–966. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01095-5>
- Lamar, C. (1970). Mercaptopropionic acid: A convulsant that inhibits glutamate decarboxylase. *Journal of Neurochemistry*, 17(2), 165–170. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1970.tb02197.x>
- Lambrechtsen, F. A. C. P., & Buchhalter, J. R. (2008). Aborted and refractory status epilepticus in children: A comparative analysis. *Epilepsia*, 49(4), 615–625. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01465.x>
- Lange, C., Storkebaum, E., de Almodóvar, C. R., Dewerchin, M., & Carmeliet, P. (2016). Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nature Reviews Neurology*, 12(8), 439–454. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.88>
- Lazarowski, A., Ramos, A. J., García-Rivello, H., Brusco, A., & Girardi, E. (2004). Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24(1), 77–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15049512>
- Leonoudakis, D., Braithwaite, S. p., Beattie, M. s., & Beattie, E. c. (2004). TNF α -induced AMPA-receptor trafficking in CNS neurons; relevance to excitotoxicity? *Neuron Glia Biology*, 1(3), 263–273. <https://doi.org/10.1017/S1740925X05000608>
- Liou, G. I., Auchampach, J. A., Hillard, C. J., Zhu, G., Yousufzai, B., Mian, S., ... Khalifa, Y. (2008). Mediation of Cannabidiol Anti-inflammation in the Retina by Equilibrative Nucleoside Transporter and A 2A Adenosine Receptor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(12), 5526. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2196>

- Lores Arnaiz, S., Travacio, M., Llesuy, S., & Rodríguez de Lores Arnaiz, G. (1998). Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. *Neurochemical Research*, 23(12), 1477–1483. <https://doi.org/10.1007/BF03177490>
- Löscher, W. (1979). 3-Mercaptopropionic acid: convulsant properties, effects on enzymes of the gamma-aminobutyrate system in mouse brain and antagonism by certain anticonvulsant drugs, aminooxyacetic acid and gabaculine. *Biochemical Pharmacology*, 28(8), 1397–1407. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(79\)90443-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(79)90443-x)
- Löscher, Wolfgang. (2002). Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(3), 113–118. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01974-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01974-X)
- Löscher, Wolfgang. (2020). Epilepsy and Alterations of the Blood–Brain Barrier: Cause or Consequence of Epileptic Seizures or Both? (pp. 331–350). https://doi.org/10.1007/164_2020_406
- Löscher, Wolfgang, & Friedman, A. (2020). Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 591. <https://doi.org/10.3390/ijms21020591>
- Löscher, Wolfgang, Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020). Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacological Reviews*, 72(3), 606–638. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019539>
- Mao, K., You, C., Lei, D., & Zhang, H. (2015). High dosage of cannabidiol (CBD) alleviates pentylentetrazole-induced epilepsy in rats by exerting an anticonvulsive effect. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(6), 8820–8827. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L605424241>
- Marchi, N., Banjara, M., & Janigro, D. (2016). Blood–brain barrier, bulk flow, and interstitial clearance in epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 260, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.06.011>
- Marchi, N., & Lerner-Natoli, M. (2013). Cerebrovascular Remodeling and Epilepsy. *The Neuroscientist*, 19(3), 304–312. <https://doi.org/10.1177/1073858412462747>
- Mazur, A., Lichti, C. F., Prather, P. L., Zielinska, A. K., Bratton, S. M., Gallus-Zawada, A., ... Moran, J. H. (2009). Characterization of human hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in the metabolism of classic cannabinoids. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 37(7), 1496–1504. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.026898>
- Mechoulam, R., & Shvo, Y. (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, 19(12), 2073–2078. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-x](https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-x)
- Meldrum, B. S. (2001). Why and when are seizures bad for the brain? *Trends in*

Pharmacological Sciences, 22(9), 445–446. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01813-7](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01813-7)

- Mijangos-Moreno, S., Poot-Aké, A., Arankowsky-Sandoval, G., & Murillo-Rodríguez, E. (2014). Intrahypothalamic injection of cannabidiol increases the extracellular levels of adenosine in nucleus accumbens in rats. *Neuroscience Research*, 84, 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.04.006>
- Millar, S. A., Stone, N. L., Yates, A. S., & O'Sullivan, S. E. (2018). A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01365>
- Mills, E. J., Chan, A.-W., Wu, P., Vail, A., Guyatt, G. H., & Altman, D. G. (2009). Design, analysis, and presentation of crossover trials. *Trials*, 10, 27. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-10-27>
- Morin-Brureau, M., Rigau, V., & Lerner-Natoli, M. (2012). Why and how to target angiogenesis in focal epilepsies. *Epilepsia*, 53, 64–68. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03705.x>
- Nelson, K. M., Bisson, J., Singh, G., Graham, J. G., Chen, S.-N., Friesen, J. B., ... Pauli, G. F. (2020). The Essential Medicinal Chemistry of Cannabidiol (CBD). *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(21), 12137–12155. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00724>
- Nichol, K., Stott, C., Jones, N., Gray, R. A., Bazelot, M., & Whalley, B. J. (2019). The proposed multimodal mechanism of action of cannabidiol (CBD) in epilepsy: modulation of intracellular calcium and adenosine-mediated signaling. *Neurology*, 92(15 Supplement), P5.5-007.
- Nikitidou, L., Kanter-Schlifke, I., Dhondt, J., Carmeliet, P., Lambrechts, D., & Kokaia, M. (2012). VEGF Receptor-2 (Flk-1) Overexpression in Mice Counteracts Focal Epileptic Seizures. *PLoS ONE*, 7(7), e40535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040535>
- Nitsch, C., & Klatzo, I. (1983). Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *Journal of the Neurological Sciences*, 59(3), 305–322. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(83\)90016-3](https://doi.org/10.1016/0022-510X(83)90016-3)
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., ... Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 161(3), 653–660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>
- Noumbissi, M. E., Galasso, B., & Stins, M. F. (2018). Brain vascular heterogeneity: implications for disease pathogenesis and design of in vitro blood-brain barrier models. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0097-2>
- O'Connell, B. K., Towfighi, J., Kofke, W. A., & Hawkins, R. A. (1988). Neuronal lesions in mercaptopropionic acid-induced status epilepticus. *Acta Neuropathologica*, 77(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/BF00688242>

- Odi, R., Bibi, D., Wager, T., & Bialer, M. (2020). A perspective on the physicochemical and biopharmaceutic properties of marketed antiseizure drugs—From phenobarbital to cenobamate and beyond. *Epilepsia*, *61*(8), 1543–1552. <https://doi.org/10.1111/epi.16597>
- Parfenova, H., Carratu, P., Tcheranova, D., Fedinec, A., Pourcyrus, M., & Leffler, C. W. (2005). Epileptic seizures cause extended postictal cerebral vascular dysfunction that is prevented by HO-1 overexpression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *288*(6), H2843–H2850. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01274.2004>
- Patra, P. H., Barker-Haliski, M., White, H. S., Whalley, B. J., Glyn, S., Sandhu, H., ... McNeish, A. J. (2019a). Cannabidiol reduces seizures and associated behavioral comorbidities in a range of animal seizure and epilepsy models. *Epilepsia*, *60*(2), 303–314. <https://doi.org/10.1111/epi.14629>
- Patra, P. H., Barker-Haliski, M., White, H. S., Whalley, B. J., Glyn, S., Sandhu, H., ... McNeish, A. J. (2019b). Cannabidiol reduces seizures and associated behavioral comorbidities in a range of animal seizure and epilepsy models. *Epilepsia*, *60*(2), 303–314. <https://doi.org/10.1111/epi.14629>
- Pertwee, R. G. (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *British Journal of Pharmacology*, *152*(7), 984–986. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707464>
- Pitkänen, A., & Sutula, T. P. (2002). Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet Neurology*, *1*(3), 173–181. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00073-X)
- Prager, O., Kamintsky, L., Hasam-Henderson, L. A., Schoknecht, K., Wuntke, V., Papageorgiou, I., ... Kovács, R. (2019). Seizure-induced microvascular injury is associated with impaired neurovascular coupling and blood–brain barrier dysfunction. *Epilepsia*, *60*(2), 322–336. <https://doi.org/10.1111/epi.14631>
- Purnell, B., Murugan, M., Jani, R., & Boison, D. (2021). The Good, the Bad, and the Deadly: Adenosinergic Mechanisms Underlying Sudden Unexpected Death in Epilepsy. *Frontiers in Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.708304>
- Rigau, V., Morin, M., Rousset, M.-C., de Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., ... Lerner-Natoli, M. (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain*, *130*(7), 1942–1956. <https://doi.org/10.1093/brain/awm118>
- Rocha, L., Frías-Soria, C. L., Ortiz, J. G., Auzmendi, J., & Lazarowski, A. (2020). Is Cannabidiol a drug acting on unconventional targets to control drug-resistant epilepsy? *Epilepsia Open*. <https://doi.org/10.1002/epi4.12376>
- Rogawski, M. A. (2013). The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, *54* Suppl 2, 33–40. <https://doi.org/10.1111/epi.12182>
- Rogawski, M. A., & Johnson, M. R. (2008). Intrinsic severity as a determinant of

- antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Currents*, 8(5), 127–130. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2008.00272.x>
- Rosenberg, E. C., Patra, P. H., & Whalley, B. J. (2017). Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 70(Pt B), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.006>
- Ross, H. R., Napier, I., & Connor, M. (2008). Inhibition of Recombinant Human T-type Calcium Channels by Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 16124–16134. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707104200>
- Sahin, D., Ilbay, G., & Ates, N. (2003). Changes in the blood–brain barrier permeability and in the brain tissue trace element concentrations after single and repeated pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Pharmacological Research*, 48(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00056-2)
- Sánchez Fernández, I., Klehm, J., An, S., Jillella, D., Kapur, K., Zelener, J., ... Loddenkemper, T. (2014). Comparison of risk factors for pediatric convulsive status epilepticus when defined as seizures ≥ 5 min versus seizures ≥ 30 min. *Seizure*, 23(9), 692–698. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.05.009>
- Seiffert, E. (2004). Lasting Blood-Brain Barrier Disruption Induces Epileptic Focus in the Rat Somatosensory Cortex. *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7829–7836. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1751-04.2004>
- Sokrab, T.-E. O., Kalimo, H., & Johansson, B. B. (1989). Endogenous serum albumin content in brain after short-lasting epileptic seizures. *Brain Research*, 489(2), 231–236. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90855-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90855-X)
- Storkebaum, E., & Carmeliet, P. (2004). VEGF: a critical player in neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 113(1), 14–18. <https://doi.org/10.1172/JCI20682>
- Szaflarski, J. P., Bebin, E. M., Cutter, G., DeWolfe, J., Dure, L. S., Gaston, T. E., ... UAB CBD Program. (2018). Cannabidiol improves frequency and severity of seizures and reduces adverse events in an open-label add-on prospective study. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 87, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.07.020>
- Szot, P., White, S. S., McCarthy, E. B., Turella, A., Rejniak, S. X., & Schwartzkroin, P. A. (2001). Behavioral and metabolic features of repetitive seizures in immature and mature rats. *Epilepsy Research*, 46(3), 191–203. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(01\)00285-6](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(01)00285-6)
- Taylor, L., Gidal, B., Blakey, G., Tayo, B., & Morrison, G. (2018). A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. *CNS Drugs*, 32(11), 1053–1067. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0578-5>
- Tetto, A., Manzoni, P., Millul, A., Beghi, E., Garattini, L., Tartara, A., & Avanzini, G. (2002). The costs of epilepsy in Italy. *Epilepsy Research*, 48(3), 207–216.

[https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00013-X)

- Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4), 493–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>
- Todorova, K. S., Velikova, V. S., Kaprelyan, A. G., & Tsekov, S. T. (2013). SEIZURE SEVERITY AS AN ALTERNATIVE MEASURE OF OUTCOME IN EPILEPSY. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*, 19(3), 433–437. <https://doi.org/10.5272/jimab.2013193.433>
- Towfighi, J., Kofke, W. A., O'Connell, B. K., Housman, C., & Graybeal, J. M. (1989). Substantia nigra lesions in mercaptopropionic acid induced status epilepticus: a light and electron microscopic study. *Acta Neuropathologica*, 77(6), 612–620. <https://doi.org/10.1007/BF00687889>
- Tran, C. H. T., George, A. G., Teskey, G. C., & Gordon, G. R. (2020). Seizures elevate gliovascular unit Ca²⁺ and cause sustained vasoconstriction. *JCI Insight*, 5(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.136469>
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A. O., Scheffer, I. E., Shinnar, S., ... Lowenstein, D. H. (2015). A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 56(10), 1515–1523. <https://doi.org/10.1111/epi.13121>
- Trinka, E., & Kälviäinen, R. (2017). 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure*, 44, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.001>
- Umans, R. A., Henson, H. E., Mu, F., Parupalli, C., Ju, B., Peters, J. L., ... Taylor, M. R. (2017). CNS angiogenesis and barrierogenesis occur simultaneously. *Developmental Biology*, 425(2), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.017>
- van Lanen, R. H., Melchers, S., Hoogland, G., Schijns, O. E., Zandvoort, M. A. van, Haeren, R. H., & Rijkers, K. (2021). Microvascular changes associated with epilepsy: A narrative review. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 41(10), 2492–2509. <https://doi.org/10.1177/0271678X211010388>
- van Vliet, E. A., Aronica, E., & Gorter, J. A. (2015). Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.10.003>
- Vanore, G., Giraldez, L., Rodríguez de Lores Arnaiz, G., & Girardi, E. (2001). Seizure activity produces differential changes in adenosine A1 receptors within rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 26(3), 225–230. <https://doi.org/10.1023/a:1010912516299>
- Velíšková, J., & Moshé, S. L. (2006). Update on the Role of Substantia Nigra Pars Reticulata in the Regulation of Seizures. *Epilepsy Currents*, 6(3), 83–87. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2006.00106.x>
- Vernes, J.-M., & Meng, Y. G. (2015). Detection and Quantification of VEGF Isoforms

- by ELISA (pp. 25–37). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2917-7_2
- Vezzani, A. (2005). VEGF and Seizures: Cross-talk between Endothelial and Neuronal Environments. *Epilepsy Currents*, 5(2), 72–74. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7597.2005.05209.x>
- Vezzani, A., Balosso, S., & Ravizza, T. (2008). The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(6), 797–803. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.03.009>
- Vezzani, A., Balosso, S., & Ravizza, T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 15(8), 459–472. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x>
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews. Neurology*, 7(1), 31–40. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178>
- Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia*, 46(11), 1724–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x>
- Vezzani, A., Ravizza, T., Balosso, S., & Aronica, E. (2008). Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia*, 49 Suppl 2, 24–32. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01490.x>
- Vilela, L. R., Lima, I. V., Kunsch, É. B., Pinto, H. P. P., de Miranda, A. S., Vieira, É. L. M., ... Moreira, F. A. (2017). Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylentetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 75, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.07.014>
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., ... Marinovich, M. (2003). Interleukin-1 β Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. *The Journal of Neuroscience*, 23(25), 8692–8700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>
- Walker, M. C. (2018). Pathophysiology of status epilepticus. *Neuroscience Letters*, 667, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.044>
- Wallace, M. J., Blair, R. E., Falenski, K. W., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2003). The Endogenous Cannabinoid System Regulates Seizure Frequency and Duration in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(1), 129–137. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051920>
- Wallace, M. J., Wiley, J. L., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2001). Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid anticonvulsant effects. *European Journal of Pharmacology*, 428(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01243-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01243-2)
- Watanabe, K., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Funae, Y., & Yoshimura, H. (1995).

- Involvement of CYP2C in the Metabolism of Cannabinoids by Human Hepatic Microsomes from an Old Woman. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(8), 1138–1141. <https://doi.org/10.1248/bpb.18.1138>
- Watanabe, K., Yamaori, S., Funahashi, T., Kimura, T., & Yamamoto, I. (2007). Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabiniol by human hepatic microsomes. *Life Sciences*, 80(15), 1415–1419. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.12.032>
- Wellek, S., & Blettner, M. (2012). On the proper use of the crossover design in clinical trials: part 18 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Arzteblatt International*, 109(15), 276–281. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0276>
- Whalley, B. J., Bazelot, M., Rosenberg, E., & Tsien, R. (2018). A role of GPR55 in the antiepileptic properties of cannabidiol (CBD). *Neurology*, 90(15 (Supplement)), P2.277.
- Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., ... Kleijnen, J. (2015). Cannabinoids for Medical Use. *JAMA*, 313(24), 2456. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.6358>
- Wilhelm, I., Nyúl-Tóth, Á., Suciú, M., Hermenean, A., & Krizbai, I. A. (2016). Heterogeneity of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers*, 4(1), e1143544. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1143544>
- Williams, N. N. B., Ewell, T. R., Abbotts, K. S. S., Harms, K. J., Woelfel, K. A., Dooley, G. P., ... Bell, C. (2021). Comparison of Five Oral Cannabidiol Preparations in Adult Humans: Pharmacokinetics, Body Composition, and Heart Rate Variability. *Pharmaceuticals*, 14(1), 35. <https://doi.org/10.3390/ph14010035>
- World Health Organization. (2019). *Epilepsy: a public health imperative. Summary*. Geneva.
- Xu, L., Nirwane, A., & Yao, Y. (2019). Basement membrane and blood–brain barrier. *Stroke and Vascular Neurology*, 4(2), 78–82. <https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198>
- Young, D., & Dragunow, M. (1994). Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience*, 58(2), 245–261. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90032-9)
- Yurchenco, P. D. (2011). Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), a004911–a004911. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004911>
- Zhu, H.-J., Wang, J.-S., Markowitz, J. S., Donovan, J. L., Gibson, B. B., Gefroh, H. a, & Devane, C. L. (2006). Characterization of P-glycoprotein inhibition by major cannabinoids from marijuana. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2), 850–857. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.098541>

