



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

**SEDE SUR**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**Estudio del efecto del cannabinoide en monoterapia o en combinación en la expresión de  
crisis convulsivas generalizadas recurrentes y farmacoresistencia en ratas**

**TESIS**

Que presenta

**MED. Daniel Felipe Ariza Salamanca**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

en

**Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directora de la tesis:

**Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta**

Ciudad de México

Enero, 2025

La presente investigación se realizó en el laboratorio No. 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV, Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta.

Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) a través de los proyectos A3-S-26782 y la beca de maestría número 1231535.

Se agradece a HempMeds PX, LLC, USA por la donación de Cannabinol para el desarrollo de este proyecto.

## **Agradecimientos**

### **A mis profesoras y profesores.**

Por ser faros de conocimiento y curiosidad que han iluminado mi camino académico y personal. Su guía y enseñanzas han sido fundamentales para mi formación.

### **A la Dra. Luisa Rocha.**

Mi admiración y gratitud infinitas por compartir conmigo su vasto conocimiento. Gracias por creer en este proyecto, por su apoyo constante y por ser fuente de inspiración y guía constante.

### **A mis sinodales, las Dras. Manola Cuéllar y Mónica Díaz.**

Gracias por su tiempo, sus valiosas observaciones y su retroalimentación, que enriquecieron esta tesis.

### **Al Laboratorio 8.**

Profunda gratitud a la Dra. María de Ángeles Núñez, al Lic. Francia Carmona, al Maestro Félix Preza y a la Maestra Monserrat Fuentes. Gracias por ser un gran equipo, por su apoyo constante y por crear un ambiente de colaboración y aprendizaje.

### **Al Dr. Christopher Martínez.**

Un agradecimiento especial por ser profesor y amigo, su apoyo y consejo han sido invaluable.

### **A mi familia.**

A mis padres Alexandra Salamanca y Jaime Ariza, que me enseñaron el valor del amor, el esfuerzo y la resiliencia. A mi hermana y mis sobrinos, gracias por caminar conmigo desde la distancia.

### **A mi familia mexicana, mi familia elegida.**

A la Lic. Rita Zavaleta, por su cariño incondicional y constante apoyo. Al Maestro Luis Chimal, por su camaradería y su inigualable sentido del humor. A Grecia y Chuy, por su creatividad y originalidad que iluminan cada día. Gracias a todos ustedes por llenar mi vida de risas, alegría y momentos inolvidables.

### **A mis profesores de antes.**

Al Dr. Mauricio Nava, al Dr. Andrés Isaza y al Dr. Carlos Calderón. Ustedes encendieron en mí la chispa de la curiosidad científica y me apoyaron para llegar hasta acá.

### **Finalmente, a la comunidad del Cinvestav.**

A todas las personas que, desde su lugar, hicieron posible que este proyecto llegara a su fin. Su apoyo, directa o indirectamente, me reafirma que hacer ciencia es un esfuerzo colectivo, y estoy profundamente agradecido por haber sido parte de esta comunidad.

“Los hombres son libres —es decir, algo más que meros poseedores del don de la libertad— mientras actúan, ni antes ni después, porque ser libre y actuar es la misma cosa.”

Hannah Arendt

## Resumen

La epilepsia farmacorresistente afecta aproximadamente a un tercio de los pacientes con diagnóstico de epilepsia. Las crisis convulsivas severas recurrentes, el estado epiléptico y el aumento extrasináptico de glutamato se asocian con el desarrollo de farmacorresistencia. Por ello, existe un interés creciente en identificar fármacos capaces de controlar la severidad de las crisis epilépticas y prevenir este fenómeno. Este estudio tuvo como objetivo evaluar las propiedades anticrisis del cannabinoil, tanto en monoterapia como en combinación con fenobarbital, así como su efecto sobre la liberación de glutamato en terminales sinápticas *in vitro* de pacientes con epilepsia farmacorresistente.

Resultados: En el modelo experimental, el pretratamiento con cannabinoil (200 mg/kg, vía intragástrica) disminuyó la prevalencia de crisis mayores en un 36.36 % en comparación con el grupo sham (59.26 %), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La combinación de cannabinoil (200 mg/kg) y fenobarbital (15 mg/kg, vía intraperitoneal) redujo significativamente la severidad de las crisis convulsivas mayores durante la inducción de crisis severas recurrentes ( $p < 0.0001$ ). Además, el pretratamiento con cannabinoil previno significativamente el desarrollo de farmacorresistencia a la fenitoína ( $p = 0.0019$ ).

En estudios *in vitro* en terminales sinápticas de pacientes con epilepsia farmacorresistente, se identificaron dos patrones de respuesta: un grupo con reducción de la liberación de glutamato independiente de la concentración y otro con respuesta bifásica. En el primer grupo, todas las concentraciones de cannabinoil probadas disminuyeron la liberación de glutamato, siendo 100  $\mu\text{M}$  la más efectiva ( $p = 0.0002$ ). En el segundo grupo, la concentración de 100 nM redujo significativamente la liberación de glutamato ( $p < 0.05$ ), mientras que concentraciones mayores no mostraron efecto.

Conclusión: El cannabinoil muestra un efecto protector frente al desarrollo de farmacorresistencia. En combinación con fenobarbital, reduce la severidad de las crisis convulsivas mayores. Además, a bajas concentraciones, disminuye la liberación de glutamato en terminales sinápticas de pacientes con epilepsia farmacorresistente, lo que sugiere su potencial terapéutico en esta condición.

## Abstract

Pharmacoresistant epilepsy affects approximately one-third of patients diagnosed with epilepsy. Recurrent severe seizures, status epilepticus, and extrasynaptic glutamate increase are associated with the development of pharmacoresistance. Therefore, there is growing interest in identifying drugs capable of controlling seizure severity and preventing this phenomenon. This study aimed to evaluate the anticonvulsant properties of cannabinal, both as monotherapy and in combination with phenobarbital, as well as its effect on glutamate release in synaptic terminals *in vitro* from patients with pharmacoresistant epilepsy.

Results: In the experimental model, pretreatment with cannabinal (200 mg/kg, intragastrically) reduced the prevalence of major seizures by 36.36 % compared to the sham group (59.26 %), although this difference was not statistically significant. The combination of cannabinal (200 mg/kg) and phenobarbital (15 mg/kg, intraperitoneally) significantly reduced the severity of major seizures during the induction of repeated severe seizures ( $p < 0.0001$ ). Additionally, pretreatment with cannabinal significantly prevented the development of pharmacoresistance to phenytoin ( $p = 0.0019$ ).

In *in vitro* studies on synaptic terminals from pharmacoresistant epilepsy patients, two response patterns were identified: a group with concentration-independent reduction of glutamate release and another with a biphasic response. In the first group, all tested cannabinal concentrations reduced glutamate release, with 100  $\mu\text{M}$  being the most effective ( $p = 0.0002$ ). In the second group, the 100 nM concentration significantly reduced glutamate release ( $p < 0.05$ ), whereas higher concentrations showed no effect.

Conclusion: Cannabinal exhibits a protective effect against the development of pharmacoresistance. When combined with phenobarbital, it reduces the severity of major seizures. Moreover, at low concentrations, glutamate release in synaptic terminals from pharmacoresistant epilepsy patients decreases, suggesting its therapeutic potential for this condition.

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Epilepsia .....	1
1.1.1. Epidemiología de la epilepsia.....	1
1.1.2 Neurobiología de las epilepsias: Alteraciones electrofisiológicas y neuroquímicas.....	2
1.1.3. Tratamiento de la epilepsia.....	5
1.2 Epilepsia farmacorresistente.....	7
1.2.1 Hipótesis neurobiológicas de la epilepsia farmacorresistente: la relevancia de la severidad intrínseca .....	7
1.2.2 Epidemiología de la epilepsia farmacorresistente .....	10
1.2.3 Tratamiento de la epilepsia farmacorresistente: tratamientos coadyuvantes .....	10
1.3 Generalidades de los fitocannabinoides .....	12
1.3.1 Cannabidiol.....	12
1.3.2 Uso del cannabidiol en crisis convulsivas y epilepsia farmacorresistente: Antecedentes clínicos y preclínicos.....	13
1.3.3 Uso conjunto de cannabidiol y fármacos anticrisis en crisis convulsivas farmacorresistentes .....	14
1.4. Cannabinol.....	15
1.4.1. Farmacodinámica y farmacocinética del cannabinol .....	16
1.4.2. El efecto anticrisis del cannabinol en relación con otros fitocannabinoides .....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS .....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general .....	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1. Animales.....	24
5.2. Habitación.....	24
5.3. Inducción de crisis convulsivas generalizadas severas y evaluación conductual.....	24
5.4. Preparación de fármacos.....	26
5.4.1. Cannabinol:.....	26
5.4.2. Ácido 3 mercaptopropiónico (MP) :.....	27

5.4.3. Fenitoína:.....	27
5.4.4. Fenobarbital:.....	27
6. EXPERIMENTO 1 .....	27
6.1. Materiales y métodos.....	28
6.2. Resultados experimento 1.....	28
6.3. Discusión del experimento 1 .....	30
7. EXPERIMENTO 2.....	32
7.1. Materiales y métodos.....	33
7.1.1. Habituaación: .....	33
7.1.2. Inducción del fenotipo de farmacorresistencia:.....	33
7.1.3. Identificación de animales con crisis convulsivas severas farmacorresistentes a fenitoína:.....	34
7.1.4. Protocolo de ensayo cruzado:.....	34
7.1.5. Grupos de tratamiento durante el ensayo cruzado.....	34
7.1.5. Análisis de datos.....	35
7.2. Resultados experimento 2.....	36
7.2.1. Resultados de la prueba de farmacorresistencia fenitoína:.....	36
7.2.2 Resultados del ensayo cruzado .....	36
7.2.2. Latencia y expresión de crisis mayores y estado epiléptico en animales identificados como farmacosensibles a fenitoína durante el ensayo cruzado .....	38
7.4. Discusión .....	40
8. EXPERIMENTO 3.....	42
8.1. Materiales y métodos.....	44
8.1.1. Habituaación: .....	44
8.1.2. Inducción del fenotipo de farmacorresistencia con tratamientos: .....	44
8.1.3. Análisis de datos.....	45
8.2. Resultados del experimento 3.....	46
8.2.1. Índice de severidad de crisis mayores durante la inducción repetida de crisis convulsivas .....	46
8.2.2. Índice de severidad de estado epiléptico durante la inducción repetida de crisis convulsivas: .....	46
8.3. Discusión .....	48
9.    EXPERIMENTO 4.....	54
9.1. Materiales y métodos.....	54
9.1.1. Obtención de tejido de pacientes.....	54

9.1.2. Aislamiento de sinaptosomas .....	56
9.1.3. Caracterización de sinaptosomas: expresión de sinaptofisina y proteína de densidad postsináptica 95 .....	57
9.1.4. Cuantificación de glutamato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	58
9.1.5. Análisis de datos .....	59
9.2. Resultados experimento 4.....	59
9.2.1. Caracterización de sinaptosomas obtenidos de pacientes llevados a cirugía de epilepsia.....	60
9.2.2. Liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con epilepsia farmacorresistente.....	60
9.2.3. Liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con respuesta independiente de la concentración de cannabinoles .....	61
9.2.4. Liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con respuesta bifásica al tratamiento con cannabinoles.....	60
9.3. Discusión .....	63
10. CONCLUSIONES GENERALES .....	66
11. PERSPECTIVAS .....	67
12. REFERENCIAS .....	69

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las principales hipótesis sobre la epilepsia resistente a los medicamentos y ejemplos de evidencia clínica y preclínica que las respaldan. ....	8
<b>Tabla 2.</b> Valores de $K_i$ para el cannabinoles en humanos y en rata.....	16
<b>Tabla 3.</b> Escala de Velísková 1990.....	26
<b>Tabla 4.</b> Evaluación de las crisis convulsivas menores y mayores inducidas por MP en ratas tratadas con diferentes dosis de cannabinoles.....	29
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la prueba de resistencia a fenitoína después de la inducción repetida de crisis convulsivas. ....	36
<b>Tabla 6.</b> Latencia y prevalencia de crisis convulsivas mayores en animales farmacorresistentes y farmacosensibles a fenitoína durante el ensayo cruzado.....	39
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los diferentes tratamientos en la prevalencia de farmacorresistencia a fenitoína.....	48
<b>Tabla 8.</b> Variables clínicas y caracterización de la respuesta a cannabinoles en pacientes con epilepsia farmacorresistente .....	59
<b>Tabla 9.</b> Correlación entre variables clínicas y la liberación de glutamato en presencia de diferentes concentraciones de cannabinoles en tejido de pacientes responsivos al tratamiento, independientemente de la concentración. ....	60

<b>Tabla 10.</b> Correlación entre variables clínicas y la liberación de glutamato en presencia de diferentes concentraciones de cannabinoles en tejido de pacientes con respuesta bifásica al tratamiento.....	62
---	----

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Epilepsia

La Liga Internacional Contra La Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) define a la epilepsia como una condición crónica caracterizada por una predisposición continua a la generación de crisis epilépticas (Fisher et al., 2014). Según la ILAE, se hace el diagnóstico de epilepsia con uno de los siguientes criterios: Dos o más crisis epilépticas sin causa aparente que ocurran con un intervalo de tiempo mayor a 24 horas, una crisis epiléptica sin causa aparente si el riesgo de recurrencia es alto (es decir >60% en los próximos 10 años) o un diagnóstico de síndrome epiléptico (Fisher et al., 2014)

### 1.1.1. Epidemiología de la epilepsia

Se estima que en el mundo 70 millones de personas padecen esta enfermedad, con una incidencia anual de aproximadamente 2.4 millones de casos (Saxena y Li, 2017; Singh y Trevick, 2016). De estos, al menos el 80% se encuentra en países en vías de desarrollo (Bell et al., 2014). La epilepsia tiene una distribución bimodal, viéndose que los niños menores de 1 año y adultos mayores de 50 años son los grupos poblacionales más afectados (Singh y Trevick, 2016). La incidencia anual de epilepsia en niños menores de un año se calcula en aproximadamente 140 casos por 100,000 niños; en el caso de los adultos mayores se estima que la incidencia anual varía entre 65 y 80 casos por 100,000 personas (Saxena y Li, 2017).

La epilepsia es un problema de salud global cuyo impacto va más allá de la enfermedad en sí, ya que los pacientes diagnosticados tienden a ser estigmatizados y restringidos en sus actividades de la vida diaria (Mao et al., 2022). Recientemente se reportó que los costos por persona en países de bajos ingresos asciende a 205 dólares y de altos ingresos hasta 11,432 dólares anuales (Begley et al., 2022). Según los mismos autores, el costo total de la epilepsia asciende a 119 mil millones de dólares anuales.

En el caso de América Latina, se estima que la prevalencia media de epilepsia se encuentra en 17.8 por cada 1000 habitantes, y reporta una incidencia de 0.77 a 1.90 por cada 1000 habitantes (Burneo et al., 2005). En el caso de México se reporta que la prevalencia combinada de epilepsia se calcula en 19.5 (IC 95% 8.5-34.8) por 1000 habitantes (Noriega-Morales y Shkurovich-Bialik, 2020).

### **1.1.2 Neurobiología de las epilepsias: Alteraciones electrofisiológicas y neuroquímicas**

La epilepsia puede surgir de causas estructurales, genéticas, infecciosas, metabólicas, inmunes, incluso idiopáticas (Falco-Walter, 2020). Se considera una etiología estructural cuando alguna alteración de la estructura del parénquima cerebral es observada a través de neuroimágenes, o bien cuando la presentación clínica del paciente apunta a una anomalía estructural, por ejemplo, la esclerosis mesial temporal. Las anomalías estructurales pueden ser genéticas, adquiridas, o ambas. Entre ellas se pueden encontrar el trauma, los tumores, malformaciones del desarrollo cortical, infecciones o eventos cerebrovasculares (Lucke-Wold et al., 2015).

Las infecciones representan uno de los factores de riesgo más comunes asociados con el desarrollo de crisis epilépticas y de epilepsia adquirida (Vezzani et al., 2016). Las infecciones más comunes incluyen neurocisticercosis, virus de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, toxoplasmosis cerebral, meningitis o encefalitis. Frecuentemente, los pacientes desarrollan epilepsia posterior a la infección y no durante la infección aguda. Las anomalías genéticas surgen de mutaciones presuntas o conocidas en las cuales las crisis epilépticas son un síntoma principal (Perucca et al., 2020). En general, la etiología genética se caracteriza por la presencia de una mutación identificada, una presentación clínica y antecedentes familiares relevantes, o un síndrome sustentado por estudios de investigación que sugieren un origen genético.

Por otra parte, los pacientes con alteraciones metabólicas, como las mucopolisacaridosis pueden presentar crisis epilépticas como síntoma de severidad (Reddy y Saini, 2021). Identificar una etiología de origen metabólico es fundamental ya que modificaciones en la dieta

o suplementación nutricional pueden impactar positivamente el curso natural de la enfermedad (Rho y Boison, 2022).

Las encefalitis tipo anti receptor N-metil-D-aspartato (rNMDA) o anticuerpos contra la proteína 1 inactivada por glioma rico en antileucina son ejemplos de epilepsia de etiología inmune. A pesar de los recursos que existen para el diagnóstico, hasta en un tercio de los pacientes no es posible determinar una etiología, por lo que se categorizará como desconocida o idiopática (Devinsky et al., 2024).

Los mecanismos que llevan a una crisis epiléptica focal o generalizada pueden ser abordados desde una perspectiva electrofisiológica y neuroquímica. Desde el enfoque electrofisiológico una crisis focal surge de la actividad eléctrica anormal de un grupo pequeño de neuronas, llamado foco epiléptico (Kandel et al., 2021). Dicho foco se caracteriza por unos cientos de neuronas altamente excitables y capaces de propagar su actividad a regiones adyacentes. Los caminos que llevan a la actividad eléctrica anormal del foco son tan variados como las etiologías de la epilepsia: las alteraciones metabólicas, genéticas, electroquímicas, o estructurales son algunos ejemplos.

El foco epiléptico se caracteriza por tener una respuesta eléctrica estereotípica y sincronizada, que consiste en una despolarización súbita, larga (20-40 mV) y duradera (50-200 ms) que en su punto máximo gatilla un tren de potenciales de acción. El comportamiento eléctrico característico de este grupo de neuronas es llamado cambio despolarizante paroxístico (Engel et al., 2022; Kandel et al., 2021). Como consecuencia de la activación de receptores ionotrópicos de glutamato como el  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y el rNMDA, se da la entrada masiva de iones de cargas positivas como calcio y sodio, generando despolarización neuronal. Normalmente, esta despolarización genera un potencial excitatorio postsináptico, seguido de uno inhibitorio y una hiperpolarización por la activación de canales de potasio dependientes de calcio. En caso del cambio despolarizante paroxístico, ocurre un aumento masivo en la despolarización e hiperpolarización de componentes sinápticos, además de la ruptura del circuito inhibitorio creado posterior a la despolarización (Goldensohn & Purpura, 1963; Matsumoto & Marsan, 1964). Esto genera

la propagación de la actividad eléctrica, aumentando la actividad sincrónica, arrítmica y anormal, lo que resulta en una crisis focal (Noebels et al., 2024).

Se han descrito cuatro fases en la progresión de una crisis focal: 1. Periodo interictal entre crisis, 2. Sincronización de la actividad dentro del foco epiléptico, 3. Expansión de la actividad eléctrica, 4. Generalización secundaria. Es distintivo de los mecanismos que llevan a crisis generalizadas que los circuitos afectados abarquen simultáneamente ambos hemisferios cerebrales. Sin embargo, no está dilucidado por completo cómo sucede (Blumenfeld, 2005; Engel et al., 2022).

Desde el punto de vista neuroquímico, hay evidencia consistente de que los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal presentan un aumento en las concentraciones extracelulares de glutamato (Albrecht & Zielínska, 2017). During y Spencer (During & Spencer, 1993) demostraron, a través de microdiálisis en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, que los niveles de glutamato comienzan a elevarse aproximadamente 1.5 minutos antes de una crisis epiléptica, y se mantienen elevados durante la crisis y varios minutos después de esta. Este aumento es específico del hipocampo epileptógeno y no se observa en las zonas adyacentes. Además, las concentraciones de glutamato en esta región alcanzan niveles entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ , que son neurotóxicos. El aumento de este neurotransmisor excitador no es contrarrestado adecuadamente por GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio.

Resalta la duda ¿qué provoca este incremento en los niveles de glutamato? Existen dos mecanismos principales: los relacionados con el ciclo glutamato-glutamina y los independientes de este ciclo. El glutamato liberado en las terminales sinápticas es captado por los astrocitos y convertido en glutamina gracias a la enzima glutamina sintetasa. Posteriormente, la glutamina regresa a las neuronas, donde es degradada a glutamato por la glutaminasa activada por fosfatos. Este proceso conforma el ciclo glutamato-glutamina (Schousboe et al., 2013). Las alteraciones en este ciclo pueden ser causadas por un aumento en la liberación de glutamato exógeno debido a estímulos eléctricos, químicos o mecánicos, así como por la astrogliosis derivada de la esclerosis hipocampal. Otros factores incluyen deficiencias en la glutamina sintetasa, disminución en la expresión del transportador de glutamato

GLT1, y un incremento en la activación de la glutaminasa activada por fosfatos, lo que también contribuye al aumento en las concentraciones extracelulares de glutamato (Eid et al., 2004; Tani et al., 2010).

Además, la concentración aumentada de glutamato puede estar relacionada con alteraciones en el volumen y en las concentraciones iónicas del espacio extracelular. La activación de los astrocitos puede comprometer su función como reguladores de los gradientes iónicos, debido al aumento en la expresión de acuaporina 4 y a la disminución de la expresión de transportadores de aminoácidos excitatorios 1, 2 y 3 y de canales rectificadores de potasio Kir 4.1 (Hubbard et al., 2016; Kucheryavykh et al., 2007; Proper et al., 2002). Los cambios en la expresión de diferentes canales/transportadores reorganiza los gradientes iónicos y reduce el volumen del espacio extracelular. La disminución de este espacio provoca un aumento en la concentración de glutamato, independiente del ciclo glutamato-glutamina, lo que a su vez potencia la excitabilidad neuronal al incrementar la cantidad de glutamato libre en el espacio extrasináptico y la cercanía entre neuronas (transmisión efáptica).

En conjunto, existe evidencia clara que relaciona el aumento patológico de glutamato con el inicio y la duración de las crisis epilépticas, así como con epilepsia farmacorresistente (Proper et al., 2002). El aumento de este neurotransmisor contribuye al aumento de la inflamación, el estrés oxidante, la excitotoxicidad, procesos que a su vez genera daño y eventual muerte celular (Das et al., 2012).

### **1.1.3. Tratamiento de la epilepsia**

El tratamiento de la epilepsia se enfoca en la supresión de las crisis epilépticas o la disminución de la frecuencia de estas con manejo farmacológico oral de largo plazo, a su vez que se evitan efectos adversos y se controlan comorbilidades (Smith, 2021). La elección del fármaco anticrisis apropiado dependerá de la clasificación respecto al tipo de crisis y de epilepsia. En el caso de las crisis focales, la carbamazepina, lamotrigina y la oxcarbazepina son de primera elección (Thijs et al., 2019). En el caso de las crisis generalizadas, el ácido valproico, la lamotrigina y el topiramato son de primera elección (Smith, 2021). Independen-

diente del tipo de crisis, el inicio de la terapia con fármacos debe ser progresivo y cuidadoso; el objetivo es lograr el control de las crisis en las dosis mínimas efectivas. En la mayoría de los casos se recomienda iniciar en monoterapia, pero si el riesgo calculado del paciente de presentar crisis severas y de difícil control es alto, se puede iniciar politerapia (Smith, 2021). Además, la politerapia está indicada cuando dos o tres fármacos en monoterapia, administrados en dosis adecuadas, no logran controlar de las crisis.

El estudio SANAD (Marson et al., 2007), no encontró diferencias significativas en la efectividad entre los fármacos antiepilépticos de primera y segunda generación. Estas generaciones se distinguen principalmente por su perfil farmacológico y el año en el que se fabricaron, y se lanzaron al mercado. Los fármacos de primera generación fenobarbital, primidona, fenitoína, etosuximida, etc) suelen tener mecanismos de acción más amplios, como el bloqueo de canales de sodio o la potenciación de la inhibición mediada por GABA, mientras que los de segunda generación (felbamato, gabapentina, lamotrigina, topiramato, etc) tienen mecanismos más específicos, como la modulación de la proteína vesicular sináptica SV2A. En cuanto a la farmacocinética, los fármacos de primera generación tienden a ser potentes inductores enzimáticos, lo que provoca mayores interacciones farmacológicas y requiere un monitoreo constante debido a su estrecho margen terapéutico. En contraste, los fármacos de segunda generación suelen tener menos interacciones y permiten mayor flexibilidad en el ajuste de dosis, lo que se traduce en un perfil de efectos adversos más favorable (French et al., 2004). La tercera generación de fármacos anticrisis (lacosamida, eslicarbazepina, rufinamida, bivaracetam, etc) se caracteriza por tener mecanismos de acción muy específicos, y en general un mejor perfil farmacocinético ya que suelen tener alta biodisponibilidad por vía oral, baja unión a proteínas plasmáticas, la mayoría no son metabolizados por el grupo de las CYP, y no son inductores enzimáticos (LaPenna & Tormoehlen, 2017).

Respecto, a no lograr el control total de las crisis epilépticas, el objetivo terapéutico se centra en reducir su frecuencia y severidad (Thijs et al., 2019). Entre las opciones terapéuticas, algunas aún emergentes se incluyen dieta cetogénica, estimulación cerebral profunda del tálamo, terapia magnética focal transcraneal y la estimulación de los nervios craneales

como el vago o el trigémino. Además, la farmacogenómica y la medicina de precisión están avanzando en la caracterización de mutaciones genéticas puntuales para ofrecer un manejo del paciente de manera particular y precisa (Perucca et al., 2018).

Dos terceras partes de los pacientes responden favorablemente a los medicamentos anticrisis. Sin embargo, alrededor de un tercio de los pacientes presenta resistencia a estos medicamentos (Kwan et al., 2010). Aunque es posible que la estimación de los pacientes refractarios al tratamiento esté sobreestimada, debido a diagnósticos erróneos o plan de tratamiento inadecuado, las cifras siguen siendo preocupantes.

## **1.2 Epilepsia farmacorresistente**

Según la ILAE, la epilepsia farmacorresistente se define como “... fracaso de ensayos adecuados de dos esquemas de medicamentos anticrisis tolerados, elegidos apropiadamente y usados (ya sea como monoterapia o en combinación) para lograr una ausencia sostenida de crisis epilépticas ...” (Kwan et al., 2010). La epilepsia farmacorresistente se asocia con una calidad de vida reducida, daño físico y psicológico, así como con comorbilidades psiquiátricas, somáticas y cognitivas (Perucca et al., 2023). Los pacientes con crisis recurrentes y severas tienen un mayor riesgo de accidentes relacionados con crisis epilépticas, estado epiléptico y muerte súbita relacionada a la epilepsia, lo que representa una alta carga a nivel individual, social y económica (Begley et al., 2022).

### **1.2.1 Hipótesis neurobiológicas de la epilepsia farmacorresistente: la relevancia de la severidad intrínseca**

Los mecanismos subyacentes a generar la epilepsia farmacorresistente sugeridos son: sobreexpresión de transportadores de eflujo de fármacos como la glicoproteína P (Wang et al., 2016), la alteración estructural del blanco del fármaco (Fonseca-Barriandos et al., 2022), las crisis severas y recurrentes o severidad intrínseca (Rogawski & Johnson, 2008), múltiples variantes genéticas (Löscher et al., 2020), y la alteración en las conexiones neurales (Fang et al., 2011). Las hipótesis, junto con su evidencia preclínica y clínica, así como las relaciones entre ellas, se resumen en la tabla 1. Cabe resaltar que los postulados propuestos por cada hipótesis no son excluyentes, sino complementarios. Sin embargo, aún

no es posible explicar por qué algunos pacientes son resistentes a múltiples fármacos anticrisis (Perucca et al., 2023; Tang et al., 2017).

**Tabla 1.** Resumen de las principales hipótesis sobre la epilepsia resistente a los medicamentos y ejemplos de evidencia clínica y preclínica que las respaldan.

Hipótesis	Fundamento	Evidencia preclínica	Evidencia clínica	Relación con otras hipótesis
<b>Transportador</b>	El aumento o la modificación de los transportadores de eflujo en la barrera hematoencefálica conduce a una reducción de las concentraciones de medicamentos anticrisis en su sitio de acción	Mayor expresión de glicoproteína P y otros transportadores en modelos de roedores; el aumento de la expresión de la glicoproteína P se asocia con la resistencia a la fenitoína y al fenobarbital en modelos de epilepsia en ratas y la inhibición de la glicoproteína P restaura la farmacosenibilidad	La expresión de la glicoproteína P y otros transportadores aumenta en las redes convulsivas de personas con epilepsia farmacorresistente; múltiples medicamentos anticrisis son sustratos de la glicoproteína P y otros transportadores; Algunos estudios encontraron una asociación de la epilepsia farmacorresistente con polimorfismos del gen ABCB1, que codifica la glicoproteína P, y del gen ABCC2, que codifica la proteína 2 de resistencia a múltiples medicamentos	Se superpone con las hipótesis de variantes genéticas y de severidad intrínseca
<b>Modificación del blanco farmacológico</b>	Las modificaciones genéticas o adquiridas en las proteínas diana de los medicamentos anticrisis contribuyen a una reducción de la respuesta al fármaco	Reducción de la eficacia de la carbamazepina en canales de sodio voltaje dependiente en el modelo de epilepsia del lóbulo temporal en ratas después de un estado epiléptico inducido por pilocarpina; capacidad de respuesta del receptor GABA <sub>A</sub> modificada en ratas epilépticas	Reducción de la eficacia de la carbamazepina en canales de sodio voltaje dependientes en personas con epilepsia resistente a los medicamentos; eficacia reducida del fenobarbital en los receptores GABA <sub>A</sub> en personas con epilepsia resistente a los medicamentos; Receptores GABA <sub>A</sub> modificados en la epilepsia del lóbulo temporal humano	Se superpone con la hipótesis de variantes genéticas

<b>Severidad intrínseca</b>	La modificación del entorno neuronal y de la red convulsiva relacionada con la epilepsia y las convulsiones contribuye al empeoramiento progresivo de las crisis y a la escasa eficacia de los medicamentos anticrisis	La alta frecuencia de crisis epilépticas y la carga de convulsiones en modelos de epilepsia crónica en roedores se asocian con una eficacia deficiente de los medicamentos anticrisis y resistencia a los medicamentos anticrisis	La alta frecuencia de convulsiones y las lesiones epileptogénicas extensas se asocian con una respuesta pobre a los medicamentos anticrisis	Se superpone con las hipótesis de la variante genética, la red neuronal y el transportador; es decir, el control deficiente de las convulsiones se asocia con una mayor expresión de los transportadores de eflujo y la reorganización de la red
<b>Variantes genéticas</b>	La variación en genes relacionados con epilepsia y en genes que codifican transportadores de medicamentos anticrisis puede contribuir a la resistencia a los medicamentos	Se han desarrollado modelos experimentales de epilepsias monogénicas graves que muestran resistencia a varios medicamentos anticrisis.	Variantes raras en genes asociados con síndromes de epilepsia graves resistentes a los medicamentos (p. ej., SCN1A, SCN2A) y polimorfismos en genes de resistencia a múltiples fármacos, que comprenden el miembro 1 de la subfamilia B de ABC (glicoproteína P o gen 1 de resistencia a múltiples fármacos) y el miembro 2 de la subfamilia C de ABC (proteína 2 de resistencia a múltiples fármacos)	Se superponen con las hipótesis de blanco farmacológico, transportador y de severidad intrínseca
<b>Alteraciones de redes neuronales</b>	La degeneración neuronal inducida por las convulsiones, el brote axonal, la gliosis, la neurogénesis aberrante y la remodelación conducen a redes neuronales anormales que pueden suprimir el sistema de control de las convulsiones del cerebro y pueden reducir la acción de los medicamentos anticrisis	Los brotes de fibras musgosas, la esclerosis del hipocampo y la reorganización celular se encuentran a menudo en modelos animales de epilepsia.	Las anomalías comunes asociadas con la epilepsia resistente a los medicamentos y varias comorbilidades neuropsiquiátricas incluyen brotes de fibras musgosas del hipocampo, malformaciones corticales y disfunciones de la red.	Se superpone con la hipótesis de la severidad intrínseca

Adaptada de: Perucca et al., 2023

Las hipótesis mencionadas anteriormente, es de interés particular la de severidad intrínseca. La hipótesis de la severidad intrínseca propone que "... La modificación del medio neuronal y de las redes relacionadas a crisis epilépticas contribuyen al

empeoramiento progresivo de las crisis y a la escasa eficacia de los medicamentos anticrisis ...” (Rogawski, 2013; Rogawski y Johnson, 2008). En otras palabras, esta hipótesis sostiene que existe una relación continua entre la severidad de las crisis epilépticas y la probabilidad que el paciente responda a fármacos anticrisis (Santana-Gómez et al., 2022). Por lo tanto, la farmacorresistencia es una condición relacionada a la severidad de las crisis epilépticas (Rogawski y Johnson, 2008).

Existen antecedentes clínicos y preclínicos que sostienen esta hipótesis. Por un lado, estudios en pacientes muestran que la demora en el inicio del tratamiento, tres o más crisis epilépticas en 24 horas o en racimos, más de 10 crisis epilépticas dentro de los seis meses una vez diagnosticada, entre otros, son factores predictores para farmacorresistencia (Chen et al., 2021; Hitiris et al., 2007). En estudios preclínicos, la inducción de estado epiléptico por estimulación eléctrica en la amígdala basolateral y su relación entre el número de crisis epilépticas hasta el primer tratamiento se relacionó con la aparición de farmacorresistencia (Bethmann et al., 2008).

### **1.2.2 Epidemiología de la epilepsia farmacorresistente**

La prevalencia de la epilepsia farmacorresistente en adultos se calcula entre 2.1 por cada 1000 habitantes (Farghaly et al., 2013) y 5.4 por cada 1000 habitantes dependiendo la región analizada, siendo mayor en hombres (7.8) que en mujeres (5.2) (Picot et al., 2008). La incidencia anual de epilepsia farmacorresistente en niños se calculó en 0.15 por cada 100 habitantes (95% IC 0.11-0.19) y en adultos 0.34 por cada 100 habitantes (95% CI 0.06-0.62) (Kalilani et al., 2018).

### **1.2.3 Tratamiento de la epilepsia farmacorresistente: tratamientos coadyuvantes**

Para alcanzar un control óptimo de las crisis epilépticas y prevenir la muerte prematura asociada a la epilepsia, el tratamiento de la epilepsia farmacorresistente debe adoptar un enfoque transdisciplinario (Perucca et al., 2023).

Después de ser diagnosticado con epilepsia farmacorresistente la terapia de primera elección es la cirugía. Los criterios para aplicar a esta son: haber probado dos fármacos anticrisis y no lograr la resolución de las crisis y presentar más de una crisis por mes. Si la epilepsia se desarrolla a raíz de un trauma o lesión, se puede considerar la cirugía antes de completar los criterios establecidos (Yoo y Panov, 2019). Sin embargo, aun cumpliendo los criterios establecidos, los pacientes deben someterse a una evaluación integral exhaustiva, que incluye pruebas neuropsicológicas y neuropsiquiátricas, estudios imagenológicos y de enfoque social, entre otros (Bingaman, 2004). El acceso a esta opción terapéutica enfrenta numerosas limitaciones y barreras, ya que requiere personal altamente especializado, infraestructura adecuada y recursos económicos considerable.

El panorama no es más alentador si se mantiene la terapia con fármacos. Después de instaurar un primer fármaco anticrisis que ha fracasado, la posibilidad de que las crisis epilépticas remitan es de 11%. Si el segundo fármaco anticrisis solo o en combinación también fracasa, la posibilidad de que remitan las crisis es del 3% (Kwan y Brodie, 2000). Estos datos corroboran la necesidad imperiosa de continuar en la búsqueda de fármacos más efectivos para el control de las crisis epilépticas, ya que la actual tasa de éxito es baja.

Aunque la probabilidad de remisión de las crisis epilépticas disminuye a medida que se prueban más medicamentos, algunas consideraciones etiológicas pueden contribuir a identificar combinaciones farmacológicas efectivas (Kwan et al., 2010). Además, dos o más fármacos que de forma individual, generan efectos similares, pueden mostrar efectos mayores cuando se administran en combinación. Cuando esto sucede, el efecto se considera sinérgico, es decir, que el efecto de los componentes combinados es mayor al previsto por sus potencias individuales (Tallarida, 2011).

En el caso de epilepsia, considerar la etiología y los fármacos disponibles pueden ayudar a determinar combinaciones de fármacos que sean efectivas y eviten efectos adversos. Los fitocannabinoides han sido explorados como fármacos adyuvantes par el control de la severidad de las crisis convulsivas (Kühne et al., 2023).

### **1.3 Generalidades de los fitocannabinoides**

Los fitocannabinoides son compuestos derivados de la planta *Cannabis sativa* L., conocida tanto por su uso medicinal en culturas ancestrales como por su uso recreativo, sus aplicaciones recientes como materia prima (cáñamo) y los fármacos derivados de ella. Durante los años 70 del siglo pasado, se publicaron múltiples estudios que demostraban los efectos terapéuticos del cannabidiol, fármaco abordado más adelante, así como del tetrahidrocannabinol, cannabigerol y otros fitocannabinoides en diferentes patologías (Lemberger y Rowe, 1975; McCallum, 1975; Perez-Reyes et al., 1973; Yamaori et al., 2010) Para entonces, se describieron derivados de esta planta como el cannabidiol, el ácido tetrahidrocannabinólico e incluso el cannabinol como potenciales fármacos anticrisis (Karler et al., 1973). Sin embargo, la investigación sobre estos compuestos se detuvo abruptamente debido a la llamada "guerra contra las drogas" y la consecuente satanización de esta planta. Tuvieron que pasar al menos dos décadas para que la investigación en este ámbito reiniciara. Nueva evidencia ha sido publicada mostrando que los derivados de cannabis tienen múltiples aplicaciones terapéuticas en epilepsia, en la enfermedad de Parkinson e incluso como moduladores del sistema inmune (Pattnaik et al., 2022).

#### **1.3.1 Cannabidiol**

El cannabidiol es un fitocannabinoides derivado de la planta *Cannabis sativa* L y constituye el 40% del su extracto. Este fármaco ha sido descrito por tener efecto analgésico, anticrisis, antiinflamatorio, de relajación muscular y antipsicótico, entre otros (Crippa et al., 2018).

El cannabidiol es agonista de receptores de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) (Costa et al., 2004) y TRPV2 (Pumroy et al., 2019). Es antagonista del receptor CB1 con una  $K_i$  de 4350 nM y es agonista inverso de CB2 con una  $K_i$  de 2860 nM. Aunque el cannabidiol tiene una afinidad baja por los receptores del sistema endocannabinoides, resulta interesante su capacidad para actuar como antagonista no competitivo de estos receptores. Esto se evidencia en un desplazamiento hacia la derecha de la curva de concentración-respuesta de agonistas sintéticos como el CP55940 y el R- (p)-WIN55212 en el rango nanomolar (Pertwee, 2008). Además, el cannabidiol modula la actividad de canales de sodio voltaje dependiente (Ghovanloo et al., 2018), GABA, y receptores opioides mu y delta

(Kathmann et al., 2006). El cannabidiol también modula la actividad de enzimas encargadas del metabolismo de otros fármacos. Por ejemplo, la modulación al alta de las enzimas CYP2C9 y CYP2C19, encargadas del metabolismo de la fenitoína y otros fármacos anticrisis (Klotz, 2007).

### **1.3.2 Uso del cannabidiol en crisis convulsivas y epilepsia farmacorresistente: Antecedentes clínicos y preclínicos**

Se ha demostrado que además de los blancos farmacológicos expuestos en la sección 1.3.1, el cannabidiol bloquea transportadores de eflujo como la glicoproteína P (Holland et al., 2006; Zhu et al., 2006) y modula indirectamente la actividad del receptor NMDA (Rodríguez-Muñoz et al., 2018). El efecto anticrisis del cannabidiol se debe a su capacidad para actuar sobre múltiples blancos farmacológicos (Rocha et al., 2020). Además, se ha propuesto que el cannabidiol pudiera influir en la farmacocinética de otros fármacos antiepilépticos coadministrados, mejorando su biodisponibilidad y potenciando sus efectos terapéuticos (Klotz, 2007).

El cannabidiol ha sido probado para padecimientos como el síndrome de Dravet. Esta enfermedad surge por una mutación de pérdida de función en el gen *SCN1A*, el cual codifica para el canal de sodio voltaje dependiente Nav 1.1, encargado de generar y propagar potenciales de acción (Engel et al., 2022). El síndrome de Dravet se asocia a la presentación de crisis epilépticas que pueden ser convulsivas tónico-clónicas, focales con alteración de conciencia, ausencias atípicas o convulsiones mioclónicas, que a menudo son resistentes a los fármacos anticrisis, configurándose como una forma de epilepsia farmacorresistente. Además, los pacientes con este síndrome suelen presentar discapacidad intelectual, que puede variar de leve a severa. La enfermedad se asocia con una alta mortalidad temprana, frecuentemente debido al desarrollo de edema cerebral por crisis convulsivas prolongadas (estado epiléptico) (Myers, 2022).

Devinsky y col. (Devinsky et al., 2017), realizaron un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en pacientes con síndrome de Dravet en múltiples países. En

este ensayo asignaron aleatoriamente a 120 pacientes cannabidiol vía oral (Epidolex®) a 20 mg/kg, o placebo, en conjunto con fármacos anticrisis estándar durante 14 semanas. Algunos de los hallazgos positivos importantes de este ensayo clínico en el grupo con cannabidiol respecto al placebo: la reducción de la frecuencia media de crisis convulsivas de 12.4 a 5.9 por mes, la reducción de más del 50% en la frecuencia de crisis epilépticas en el 43% de participantes, el 5% logró la remisión total de crisis epilépticas, y la mejora significativa en la condición general de los pacientes medida por la escala “Caregiver Global Impression of Change”. Otros hallazgos importantes en este grupo incluyeron la aparición de efectos adversos como diarrea, vómito, pirexia, somnolencia, alteraciones en enzimas hepáticas, y más abandonos del ensayo clínico.

A nivel neuroquímico es interesante que en terminales sinápticas *in vitro* de pacientes con epilepsia farmacorresistente el cannabidiol ha demostrado reducir la liberación de glutamato (Martínez-Aguirre et al., 2023). En el estudio se utilizaron sinaptosomas para evaluar la liberación de glutamato provocada por KCl en presencia de varias concentraciones de cannabidiol. Los resultados mostraron que el tejido de pacientes con epilepsia temporal y extratemporal puede ser subdividido en respondedores y no-respondedores. En los respondedores la liberación de glutamato disminuyó cuando los sinaptosomas se incubaron con bajas concentraciones de CBD (menos de 100uM). En el grupo de no-respondedores la liberación de glutamato se mantuvo alta independiente de la concentración de cannabidiol.

### **1.3.3 Uso conjunto de cannabidiol y fármacos anticrisis en crisis convulsivas farmacorresistentes**

Frías-Soria y col (Frías-Soria et al., 2021) encontraron que el cannabidiol por sí mismo puede reducir la frecuencia de las crisis convulsivas. Además, la combinación de cannabidiol con fenobarbital reduce la severidad de las crisis convulsivas, mientras que otras combinaciones, como con fenitoína, no tienen efectos aditivos. En línea con estos hallazgos, Monserrat-Fuentes ha descrito que el cannabidiol al ser combinado con fenobarbital y diazepam tiene mayor efectividad para reducir la expresión de crisis convulsivas que cuando se combina con oxcarbazepina, lamotrigina y ácido valproico. Los fármacos que parecen

ser efectivos, como el fenobarbital y el diazepam, comparten la característica de modular el sistema de neurotransmisión GABAérgico.

El fenobarbital es un barbitúrico incorporado al tratamiento de las epilepsias desde 1912 (Yasiry & Shorvon, 2012). Desde entonces se ha extendido su uso en todo el mundo gracias a su bajo costo y buen perfil de seguridad. Como características farmacológicas, el fenobarbital aumenta el tiempo de apertura de los receptores GABA<sub>A</sub>, siendo eficaz en el control de crisis espontáneas y de crisis inducidas eléctrica y químicamente en modelos experimentales (Mantovani-Guerreiro & Montovani-Guerreiro, 2014). Respecto a la farmacocinética, tiene alta biodisponibilidad, unión a proteínas de 45%, se metaboliza por glucoronidación y su eliminación es de orden 1. Su vida media es de 68 horas. Tiene algunas interacciones medicamentosas con fenitoína, vigabatrina, y topiramato. En general, el fenobarbital es altamente eficaz, seguro y rentable para el tratamiento de las epilepsias, especialmente en recién nacidos y niños (Yılmaz et al., 2014).

#### **1.4. Cannabinol**

El cannabinoide es un compuesto que se forma a través de la oxidación no enzimática del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol y del ácido tetrahidrocannabinólico (Maioli et al., 2022). Este cannabinoide es clasificado como "menor" debido a que carece de actividad psicotrópica y no altera parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca, la presión arterial o la temperatura corporal (Hollister, 1973; Karniol et al., 1974, 1975). Algunos estudios sugieren que el cannabinoide puede provocar efectos como ataxia, aumento del apetito y somnolencia; efectos que en investigaciones anteriores se agruparon bajo el término "marihuana-activity" (Loewe, 1945; Yamamoto et al., 1987)

Las investigaciones pioneras sobre el cannabinoide, realizadas en la década de 1970, revelaron que este compuesto posee propiedades anticrisis, inmunomoduladoras y reduce la presión intraocular (Baczynsky & Zimmerman, 1983; Colasanti et al., 1984; Zimmerman et al., 1977). En estudios más recientes, el cannabinoide ha sido investigado por su potencial como agente antimicrobiano, antioxidante y como analgésico para el tratamiento del dolor

muscular crónico, entre otros (Appendino et al., 2008; Weydt et al., 2005; Wong & Cairns, 2019).

#### 1.4.1. Farmacodinámica y farmacocinética del cannabinoide

El cannabinoide tiene múltiples blancos farmacológicos que pueden agruparse según sus efectos sobre la actividad neuronal, el sistema inmune y por su regulación en la señalización y el metabolismo celular.

Los efectos del cannabinoide sobre la actividad neuronal se relacionan con la modulación del sistema endocannabinoide. McPartland y colaboradores (McPartland et al., 2007) realizaron un metaanálisis en el que examinaron la evidencia disponible sobre la afinidad y la distribución de los receptores de diferentes cannabinoides entre distintas especies. Un aspecto notable de su trabajo es la síntesis de la evidencia sobre la afinidad del cannabinoide por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> en humanos y ratas, cuyos valores de K<sub>i</sub> se presentan en la Tabla 2. Sin embargo, según estos autores, la evidencia experimental disponible en el momento del estudio es poco confiable debido a que los estudios incluidos utilizaron muestras pequeñas y carecen de validación en el análisis de sensibilidad.

**Tabla 2.** Valores de K<sub>i</sub> para el cannabinoide en humanos y en rata

Ligando	K <sub>i</sub> ± EEM (nM)			
	HsCB <sub>1</sub>	RnCB <sub>1</sub>	HsCB <sub>2</sub>	RnCB <sub>2</sub>
<b>Cannabinoide</b>	525.3 ± 308.1 (n=3)	368 ± 121.1 (n=8)	168.2 ± 32.16 (n=7)	ND

Abreviaciones: CB<sub>1</sub>, receptor cannabinoide subtipo 1; CB<sub>2</sub>, receptor cannabinoide subtipo 2; Hs, *Homo sapiens*; Rn, *Rattus norvegicus*; K<sub>i</sub>, constante de inhibición; ND, no determinado. Los resultados en la tabla se expresan como K<sub>i</sub> ± EEM (nM) y el número de estudios extraídos para la determinación de medias agrupadas.

Tabla adaptada de (McPartland et al., 2007)

En coherencia con esta conclusión, existen reportes donde el cannabinoles es catalogado como un agonista no selectivo de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Petitet et al., 1998; Rhee et al., 1997; Showalter et al., 1996). Otros estudios muestran que tiene alta afinidad por receptores CB<sub>2</sub> pero no por CB<sub>1</sub> (Felder et al., 1995; Munro et al., 1993; Showalter et al., 1996) y otros afirman que el cannabinoles es un antagonista neutro o agonista inverso de los receptores CB<sub>2</sub> (Franklin & Stella, 2003; MacLennan et al., 1998).

Barnerjee y col., utilizando terminales sinápticas (sinaptosomas) de rata *in vitro* demostraron que el cannabinoles es un inhibidor débil de la recaptura de norepinefrina, serotonina y GABA. Aunque el cannabinoles exhibe una solubilidad y capacidad inhibitoria limitadas, sus características químicas podrían influir en la modulación no competitiva de los sistemas de recaptura de neurotransmisores, posiblemente debido a modificaciones en posiciones críticas del anillo A; lo que sugiere que este compuesto no compite directamente con los neurotransmisores por su sitio de unión en el transportador (Banerjee et al., 1975). Más adelante se demostró que el cannabinoles inhibe la recaptura de dopamina y norepinefrina solo en altas concentraciones ( $1 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-4}$  M) en sinaptosomas extraídos del cuerpo estriado e hipotálamo de ratas (Poddar & Dewey, 1980).

El cannabinoles modula canales iónicos pertenecientes a la familia de receptores TRP; específicamente, actúa como agonista del receptor TRPV1 y como antagonista del receptor TRPM8 (De Petrocellis et al., 2011; Morales et al., 2017). El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo y un receptor polimodal que se activa por estímulos como la capsaicina, lípidos endógenos, calor y un pH levemente ácido. La activación de TRPV1 aumenta la concentración intracelular de iones de calcio y sodio, lo que provoca despolarización, disparo neuronal y la liberación de moléculas relacionadas con el dolor, como glutamato, bradiquinina y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Este receptor se encuentra en el sistema nervioso central y periférico, incluyendo estructuras como el tálamo, el locus coeruleus, la sustancia gris periacueductal, la médula espinal y la corteza cerebral (Kort & Kym, 2012). El TRPM8 es un canal catiónico no selectivo permeable al calcio, perteneciente a la familia de receptores de melastatina. Está involucrado en el procesamiento de

estímulos como la temperatura, el gusto, la osmolalidad y el estrés oxidativo. Este canal se expresa principalmente en neuronas aferentes primarias de tejidos sensibles a estímulos fríos, como la piel, los dientes, la mucosa y la lengua (Palchevskyi et al., 2023).

El cannabinoles ha demostrado tener efectos significativos en diversas vías relacionadas con la inflamación y el sistema inmunológico. Un estudio realizado por Evans y colaboradores reveló que el cannabinoles modula de manera bifásica la actividad de la enzima fosfolipasa A2, crucial en el metabolismo del ácido araquidónico, cuyos productos desempeñan un papel central en las vías proinflamatorias en respuesta a lesiones agudas (Evans et al., 1987). Los valores de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> obtenidos se estimaron en 6.4 μM y 142 μM, respectivamente, subrayando la complejidad del efecto concentración-dependiente del cannabinoles sobre esta enzima.

Es bien conocido que los fitocannabinoides pueden suprimir las respuestas de diversas células del sistema inmune (Cabral & Griffin-Thomas, 2009). En el caso del cannabinoles, se estudió su efecto en células T derivadas de timoma de ratón (EL4.IL2) para evaluar cómo modula la actividad de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc. Los investigadores observaron que el cannabinoles actúa a través del receptor CB2 de manera dependiente de la concentración; a mayor concentración, la actividad de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc disminuyen en comparación con células estimuladas solo con forskolina (Condie et al., 1996). Estos resultados concuerdan con hallazgos de otros autores, que evidenciaron una disminución en la actividad de la adenilato ciclasa y AMPc en timocitos, esplenocitos de ratón (Herring et al., 1998, 2001). En contraste, el cannabinoles ha mostrado efectos bifásicos sobre la actividad del AMPc en otras células como fibroblastos, en membranas de células de neuroblastoma humanas y en la activación de la fosfolipasa A2 (Howlett, 1985; Kelly & Butcher, 1979).

En relación con la disminución de la actividad de la vía de adenilato ciclasa/AMPc, se ha demostrado que concentraciones elevadas de cannabinoles reducen significativamente los niveles de ARNm de IL-2 en células T murinas, con una inhibición transcripcional que varía entre un 20% y un 60%, dependiendo de las concentraciones, que van desde 3.2 hasta

32 mM (Condie et al., 1996). Estos hallazgos sugieren que la interferencia en la vía de señalización de adenilato ciclasa/AMPC conduce a una disfunción en las células T, disminuyendo la transcripción del gen que codifica para la IL-2. Cabe resaltar que el cannabinoide mostró ser más potente que el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol en la reducción tanto de la actividad de adenilato ciclasa como de la expresión de IL-2. Dado que la IL-2 es fundamental para la regulación de las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares, producida por células T en respuesta al reconocimiento de antígenos, su disminución afecta numerosos aspectos del sistema inmunológico, incluyendo la proliferación y función de las células T, así como la capacidad global del sistema inmune para responder a diferentes estímulos (Spolski et al., 2018).

En contraste, Jan y colaboradores encontraron que el cannabinoide puede aumentar la expresión de IL-2 en células T. Este aumento ocurre a través de la activación del factor nuclear activador de células T (NF-AT) y se vio inhibido por un bloqueador de la cinasa dependiente de calcio/calmodulina, pero no por un antagonista del receptor CB2, lo que indica que en este caso los efectos del cannabinoide no dependen del receptor CB2, sino de la señalización intracelular de calcio (Jan et al., 2002). A la luz de estos estudios, aunque los efectos parezcan opuestos, este fitocannabinoide a menudo presenta respuestas bifásicas en distintas propiedades evaluadas.

Otro efecto reportado del cannabinoide es la inhibición del factor NF-kappaB y la apoptosis en células neuronales cultivadas. Jüttler y colaboradores demostraron que cannabinoides como el cannabinoide, dexamabinol y el WIN 55,212-2 tienen efectos antiinflamatorios y anti-apoptóticos que son independientes de su acción sobre los receptores CB1 y CB2, y de su efecto antioxidante (Jüttler et al., 2004). Otros artículos han investigado sobre los mecanismos subyacentes a estos efectos. Rao y Kaminski demostraron que el cannabinoide incrementa los niveles de calcio intracelular en células T humanas y murinas a través de canales catiónicos operados por receptores (Rao & Kaminski, 2006). La elevación del calcio intracelular frecuentemente se relaciona con la activación de vías de señalización, plasticidad sináptica, entre otros.

En consonancia con estos resultados, se ha encontrado que en células mononucleares de sangre periférica humana (plasmocitos, monocitos, y células T CD3+ y CD8+) el cannabinoles disminuye la proliferación, la expresión de marcadores de activación y la producción de citocinas proinflamatorias. Dentro de los hallazgos más destacables, todos los cannabinoides disminuyeron la producción de interferón- $\gamma$  en células T en concentraciones de 10  $\mu$ M; Sin embargo, el cannabinoles, la cannabidivarina y el cannabigerol mostraron mayor potencia, logrando el mismo efecto en concentraciones entre 0.001 y 0.1  $\mu$ M. Además, los monocitos resultaron más susceptibles a los efectos del cannabinoles que las células T (Blevins et al., 2022).

En cuanto al efecto del cannabinoles en monocitos y macrófagos, Gojani y colaboradores demostraron que, en macrófagos THP-1 activados con lipopolisacárido y adenosintrifosfato, el cannabinoles inhibe el ensamblaje del inflammasoma NLRP3, lo cual se debe a una disminución en el clivaje de la proteína PANX1. Además, el cannabinoles inhibió el factor NF-kappaB fosforilado, reduciendo así la cascada proinflamatoria río abajo (Gojani et al., 2023).

Recientemente se publicó la farmacocinética del cannabinoles en ratas Sprague-Dawley adultas administradas de forma aguda y repetida por 14 días vía intragástrica (i.g). Una sola dosis de cannabinoles de 100 mg/kg muestra que la  $T_{m\acute{a}x}$  plasmática es de 1.5 h, la  $C_{m\acute{a}x}$  207.33 ng/ml, la  $C_{m\acute{a}x}/dosis$  es de 2,07 kg.ng/ml/mg, y el área bajo la curva de 1377.37 h.ng/ml. De manera similar, la administración repetida durante 14 días de 100 mg/kg i.g. en un volumen de 1 ml/kg de cannabinoles tiene una  $T_{m\acute{a}x}$  plasmática de 1.5 h,  $C_{m\acute{a}x}$  137.83 ng/ml,  $C_{m\acute{a}x}/dosis$  1.38 kg.ng/ml/mg, y área bajo la curva de 1017.35 h.ng/ml. Calcularon su  $t_{1/2}$  en 3.34 – 4.52 h. Los mismos autores registraron que la concentración cerebral media de cannabinoles después de la administración repetida es de 20,1 ng/g (Moore et al., 2023).

En el caso de los humanos, una sola dosis de 20 mg de cannabinoles administrado vía intravenosa muestra un área bajo la curva de  $15.1 \pm 2.74 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ min}$ , aclaramiento de  $19.1 \pm 2.58 \text{ ml min kg}^{-1}$ , volumen de distribución de  $50.5 \pm 23.1$ , y vida media ( $t_{1/2}$ ) de  $32 \pm 17 \text{ h}$

(Johansson et al., 1987). En este estudio el cannabinoles mostró un volumen de distribución y vida media mayores que el cannabidiol y al  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol.

#### **1.4.2. El efecto anticrisis del cannabinoles en relación con otros fitocannabinoides**

Con relación al efecto del cannabinoles como fármaco anticrisis, Karler y col. (Karler et al., 1973), estudiaron el efecto anticrisis de diferentes fitocannabinoides usando un modelo de crisis convulsivas inducidas por electroshock máximo en ratón sano. Se determinaron las dosis efectivas anticonvulsivantes (DE50) y sus intervalos de confianza al 95% como: cannabinoles 230 mg/kg (215-246),  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol 80 mg/kg (64-100) y cannabidiol 105 mg/kg (79-104), alcanzando su efecto máximo 2 horas después de su administración. Al comparar la potencia relativa, encontraron que no hay diferencias entre el  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol y el cannabidiol, sin embargo, ambos son más potentes que el cannabinoles.

Kollipara y col. (Kollipara et al., 2023) probaron el efecto anticrisis de  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol,  $\Delta 8$ -tetrahidrocannabinol, cannabinoles, cannabicromeno, y cannabigerol, en un modelo de pez cebra usando pentilene tetrazol como fármaco proconvulsivante. Entre los hallazgos más interesantes en relación con los efectos del cannabinoles en peces cebra silvestres, se evidenció una disminución significativa de la actividad basal en concentración de 1  $\mu\text{M}$  y un aumento significativo de la actividad basal en concentración de 4  $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, en la inducción química de crisis convulsivas con pentilene tetrazol el cannabinoles redujo significativamente la actividad anticonvulsiva en concentración de 2  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{M}$ .

Thornton y col (Thornton et al., 2020) probaron diferentes fitocannabinoides (cannabidiol,  $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol, cannabidivarina, cannabinoles y linalol) en peces cebra 5 días post-fertilización, los modelos tenían silenciamiento para *scn1Lab* homocigoto ( $^{-/-}$ ) o heterocigoto ( $^{+/-}$ ). En el primer caso, los peces cebra *scn1Lab* $^{-/-}$  replican la mutación más frecuente encontrada en pacientes con síndrome de Dravet. Se utilizaron peces *scn1Lab* $^{+/-}$  para evaluar si los fitocannabinoides producían efectos sedantes de manera independiente y en

un modelo de convulsiones inducidas químicamente con pentilinetetrazol (5 mM). La actividad convulsiva se midió mediante la distancia total recorrida durante un periodo de 15 minutos.

El hallazgo más significativo de este estudio es que el cannabinoles en concentraciones de 0.6 y 1  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la actividad convulsiva con mayor eficacia que otros cannabinoides en peces con la mutación homocigota *scn1Lab<sup>-/-</sup>*, es decir, en los peces con la mutación que replica el síndrome de Dravet. Otros hallazgos interesantes son que el cannabinoles en concentraciones de hasta 1  $\mu\text{M}$  no tuvo un efecto anticrisis en los peces heterocigotos inducidos químicamente con pentilinetetrazol. Además, el cannabinoles no altero la actividad basal en animales silvestres (Thornton et al., 2020).

En conclusión, aunque la evidencia disponible sobre el cannabinoles como fármaco anticonvulsivante es limitada, los hallazgos sugieren su potencial como agente adyuvante en el control de crisis convulsivas farmacorresistentes, además de su capacidad para modular los niveles extracelulares de glutamato a nivel neuroquímico.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La asociación de cannabidiol y fármacos anticrisis han mostrado resultados alentadores en crisis severas farmacorresistentes. La evidencia disponible del cannabinoles como fármaco anticrisis en modelos de ratón y pez cebra, tanto genéticos como inducidos química y eléctricamente, sugiere su potencial efecto terapéutico, tanto en monoterapia como en combinación, para reducir la expresión de crisis convulsivas severas y prevenir el desarrollo de farmacorresistencia. Además, los efectos favorables del fenobarbital en crisis severas y resistentes a fármacos sugieren que la combinación con cannabinoles podría ofrecer una terapia sinérgica prometedora para el manejo de crisis convulsivas severas. Por otro lado, los múltiples blancos farmacológicos y efectos bifásicos reportados del cannabinoles a nivel celular nos impulsan a indagar sobre el efecto que tiene el este fármaco sobre la liberación

de glutamato en terminales sinápticas *in vitro* en un modelo de crisis convulsivas farmacorresistentes y en pacientes con epilepsia farmacorresistente.

### **3. HIPÓTESIS**

La administración subcrónica de cannabinoles disminuye la expresión de crisis convulsivas y evita el desarrollo de farmacorresistencia. Estos efectos son más evidentes mientras se administra cannabinoles más fenobarbital.

El cannabinoles reduce la liberación de glutamato en terminales sinápticas *in vitro* en un modelo de crisis convulsivas farmacorresistentes y en terminales sinápticas de pacientes con epilepsia farmacorresistente.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la administración subcrónica de cannabinoles solo y combinado con fenobarbital en la expresión de crisis convulsivas y el desarrollo de farmacorresistencia.

#### **4.2 Objetivos específicos**

En ratas Wistar macho adultas (Obj. 1 - 4):

1. Determinar la DE<sub>50</sub> del cannabinoles que induce un efecto anticrisis en una crisis convulsiva generalizada.
2. Evaluar el efecto de diferentes dosis de cannabinoles en un modelo experimental de crisis convulsivas farmacorresistentes.
3. Caracterizar el efecto de la administración subcrónica de cannabinoles solo y combinado con fenobarbital durante el desarrollo de crisis convulsivas farmacorresistentes.

En humanos adultos con crisis farmacorresistentes

4. Evaluar el efecto del cannabinoide en la liberación de glutamato *in vitro* en terminales sinápticas de sujetos con crisis convulsivas farmacorresistentes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Animales

Se usaron ratas Wistar Macho con un peso inicial de 250 g, los cuales recibieron agua y alimentación *ad libitum*, 20 – 22 °C, y ciclos de luz oscuridad de 12 horas. Los animales se separaron por grupos experimentales en cajas de máximo cinco por cada una. Este proyecto se apegó a la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 y los comités de ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional (CICUAL 0394-24 No. proyecto: A3-5-26782 del CONAHCyT).

### 5.2. Habitación

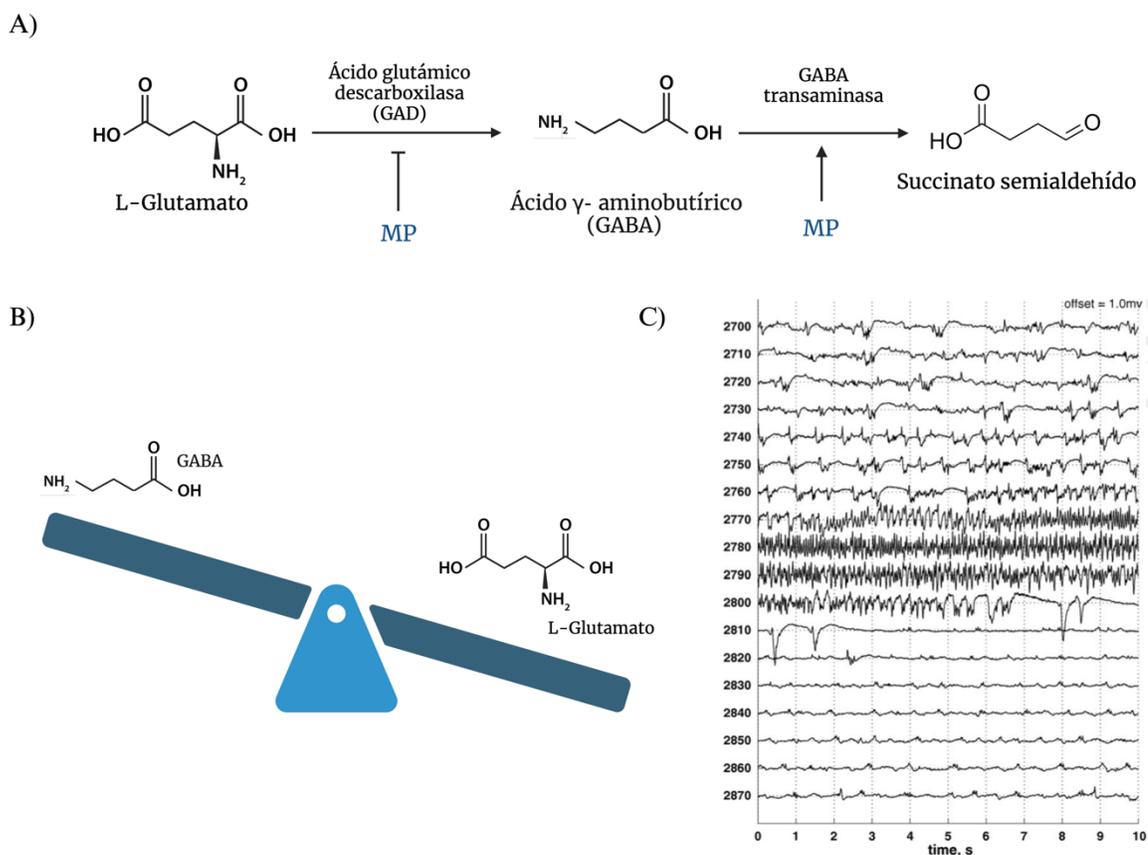
Para evitar el estrés por manipulación, los animales se habituaron con inyecciones diarias de solución salina 1 ml/kg i.p y agua vía intragástrica (i.g.) a 1 ml/kg durante cinco días anteriores al inicio de los experimentos.

### 5.3. Inducción de crisis convulsivas generalizadas severas y evaluación conductual

El ácido 3-mercaptopropiónico (MP) se utilizó para inducir crisis convulsivas generalizadas severas. Este compuesto actúa como un inhibidor de la enzima glutamato descarboxilasa y como un inductor de la GABA transaminasa (ver Figura 1). Como resultado de estos efectos, se incrementa la concentración de glutamato y se reduce la de GABA (Lamar, 1970). Las crisis convulsivas generalizadas y severas resultan de un aumento global de glutamato en el cerebro. En el electrocorticograma estas crisis se caracterizan por una actividad de alta frecuencia y baja amplitud (Crick et al., 2007).

En ratas Wistar adultas, los parámetros farmacocinéticos del MP obtenidos mediante microdiálisis cerebral tras la administración intraperitoneal en bolo de una dosis de 50 mg/kg fueron: Constante de eliminación ( $K_e$ )  $0.060 \pm 0.016 \text{ min}^{-1}$ ,  $T_{\text{máx}}$   $18.0 \pm 2.2 \text{ min}$ ,  $C_{\text{máx}}$   $10.8 \pm 5.9 \text{ } \mu\text{g/ml}$  y  $\text{ABC}_{\text{inf}}$   $353 \pm 178 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{min}/\mu\text{L}$  (Crick et al., 2007).

Para inducir crisis convulsivas generalizadas se utilizaron diferentes dosis de MP. Para la inducción única en el experimento 1 se usó 37.5 mg/kg vía i.p. en un volumen de 1 ml/kg. Para las inducciones recurrentes en los experimentos 2 y 3 se utilizaron dosis progresivas entre 30 - 37.5 mg/kg vía i.p. en un volumen de 1 ml/kg con incrementos entre dosis de 2.5 mg/kg dependiendo de la severidad de las crisis convulsivas (Ver sección 7.1.B.)



**Figura 1.** Inducción de crisis convulsivas generalizadas severas con ácido 3-mercaptopropiónico.

A) El ácido 3-mercaptopropiónico (MP) inhibe la actividad de la ácido glutámico descarboxilasa y estimula la GABA transaminasa; B) Esta modulación enzimática del metabolismo del glutamato provoca un desbalance entre las concentraciones de glutamato y GABA, resultando en un aumento de las concentraciones de glutamato; C) El incremento de glutamato desencadena una crisis convulsiva generalizada severa, que se manifiesta en un

patrón electrocorticográfico observado tras la administración aguda de MP (Tomada de: Crick et al., 2007).

Para la tipificación comportamental de la severidad de las crisis convulsivas inducidas por el MP se empleó la escala de Velísková (Velísková et al., 1990). En esta escala se consideran crisis convulsivas menores a las fases I-III y crisis mayores a las fases IV y V (Ver tabla 3). La evaluación se extendió por una hora después de la administración del fármaco proconvulsivante. Se determinó el tiempo de latencia a presentar las crisis, la expresión y la duración de estas. Se consideró que el sujeto presentaba estado epiléptico si la crisis convulsiva se mantenía por cinco minutos o más. Las crisis convulsivas mayores y el estado epiléptico se consideraron como marcadores de severidad.

**Tabla 3.** Escala de Velísková 1990

<b>Fases</b>	<b>Comportamiento</b>	<b>Clasificación</b>
I	Mioclónia	<b>Crisis menores</b>
II	Clonus unilateral	
III	Clonus bilateral	
IV	Salto salvaje o carrera	<b>Crisis mayores</b>
V	Convulsiones tónico-clónicas	

## 5.4. Preparación de fármacos

### 5.4.1. Cannabinol:

- Para los experimentos 1 a 3 el cannabinol se diluyó en aceite de coco 100%. Se administró vía i.g. a volumen de 1 ml/kg. Se emplearon dosis entre 50 y 400 mg/kg.
- Para el experimento 4 se disolvió el cannabinol en agua Mili-Q y dimetilsulfóxido en relación 1:1. Se preparó el stock de 10mM y se hicieron diluciones a partir de este: 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 100  $\mu$ M.

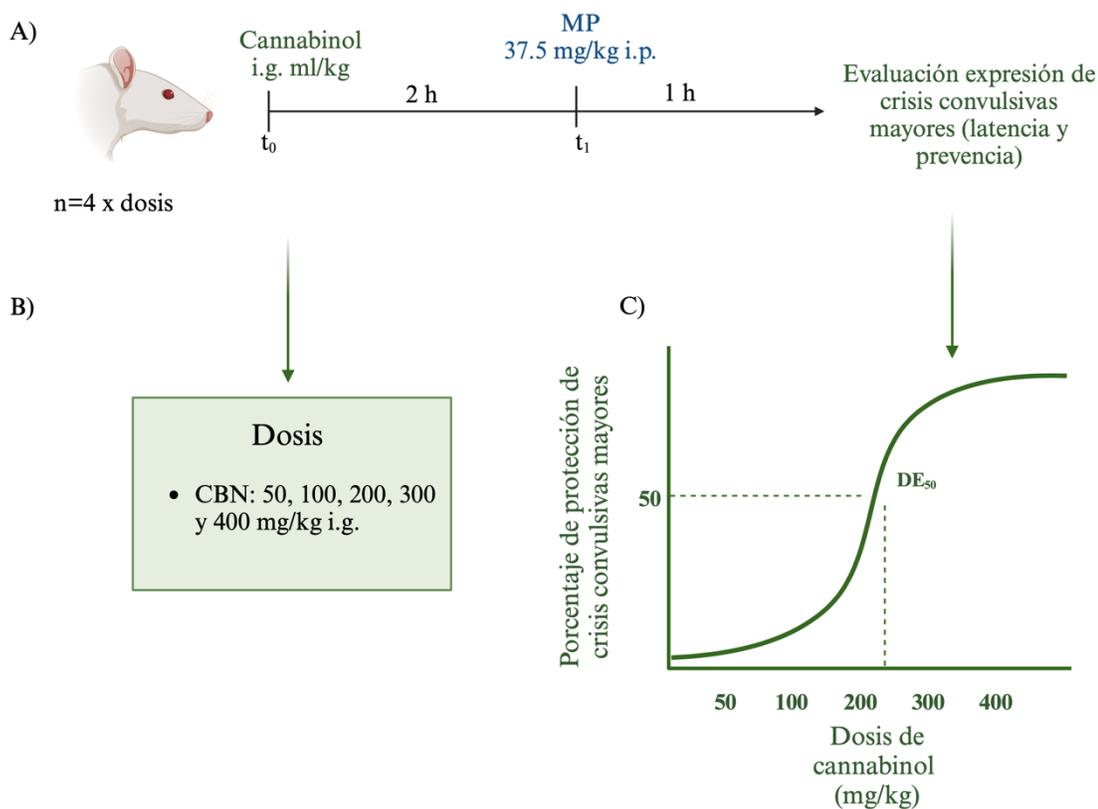
**5.4.2. Ácido 3 mercaptopropiónico (MP) :** Se diluyó en SSN (0,9% NaCl) y base Trizma (pH de  $7,4 \pm 0,5$ ). Se emplearon dosis entre 30 – 37.5 mg/kg vía i.p. en un volumen de 1 ml/kg. El protocolo de administración del MP dependió de cada experimento.

**5.4.3. Fenitoína:** Se diluyó en SSN (0.9% NaCl) y se ajustó el pH con NaOH 1N (pH  $\geq 11$ ). Se administró a dosis de 75 mg/kg vía i.p. en un volumen de 2 ml/kg.

**5.4.4. Fenobarbital:** Se diluyó en SSN (0,9% NaCl) y etanol al 12.5%. Se ajustó el pH con NaOH 1N (pH  $\geq 10$ ). Se administró a dosis de 15 mg/kg vía i.p. en un volumen de 1 ml/kg.

## 6. EXPERIMENTO 1

Este experimento se diseñó para determinar la dosis de cannabinoles que protege al 50 % de los sujetos ( $DE_{50}$ ) de presentar una crisis convulsiva mayor severa, aguda y única en animales sanos (Ver figura 2).



**Figura 2.** Evaluación del efecto del cannabinoles en sujetos experimentales sanos. A) Cuatro sujetos experimentales por dosis recibieron tratamiento intragástrico con cannabinoles (i.g.) a una dosis de 1 ml/kg ( $t_0$ ). Dos horas después, se administró ácido 3-mercaptopropiónico a 37.5 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1 ml/kg ( $t_1$ ). Se evaluó la latencia y la expresión de crisis convulsivas durante una hora; B) Se emplearon las siguientes dosis de cannabinoles: 50, 100, 200, 300 y 400 mg/kg; C) Se determinó la  $DE_{50}$  de cannabinoles calculando la prevalencia de crisis convulsivas mayores, lo que permitió identificar la dosis que protege a los sujetos experimentales contra la aparición de crisis.

## 6.1. Materiales y métodos

Todos los sujetos experimentales se habituaron durante cinco días antes del inicio del experimento (Ver sección 5.2.). Se administró una dosis de cannabinoles como tratamiento (50, 100, 200, 300 o 400 mg/kg, i.g.,  $n = 4$  por grupo) (Ver figura 2A). Dos horas después, se administró una dosis de 37.5 mg/kg de MP por vía i.p. para inducir crisis convulsivas severas. El comportamiento de los animales se evaluó durante una hora (Ver figura 2B).

Se registraron la latencia, duración y expresión de crisis convulsivas durante 60 minutos de acuerdo con la escala de Velísková. Las crisis convulsivas sostenidas en el tiempo (cinco minutos o más) se consideraron como estado epiléptico. Los animales que no presentaron crisis convulsivas mayores fueron considerados protegidos. Con base en el porcentaje de animales protegidos por cada dosis, se construyó una curva dosis-respuesta de cuatro parámetros, que permitió determinar la protección en función de la dosis administrada. Los datos se ajustaron al mejor modelo, y se calculó  $DE_{50}$  que protegió al 50% de la población experimental de desarrollar crisis convulsivas mayores (ver Figura 2C).

## 6.2. Resultados experimento 1

En la dosis de 50 mg/kg de cannabinoles, se observó la latencia promedio a las crisis menores de  $287.5 \pm 51.11$  s y para las crisis mayores de  $335.5 \pm 95.69$  s. A medida que se incrementó la dosis, la latencia de ambos tipos de crisis tiende a aumentar, aunque se observa fluctuaciones en las dosis intermedias (100, 200 y 300 mg/kg). En crisis menores, la latencia alcanzó su valor máximo de  $492.6 \pm 141.2$  s con 400 mg/kg, mientras que en crisis

mayores, el valor más alto de latencia ( $631 \pm 267$  s) se presentó con 100 mg/kg. Es notable que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Ver tabla 4).

En cuanto a la prevalencia, en crisis menores se mantiene en 100% con 50 mg/kg, pero disminuye al 50% con 400 mg/kg, con fluctuaciones en las dosis intermedias. En crisis mayores, la prevalencia baja al 50% con 100 mg/kg, aumenta al 75% en dosis intermedias y nuevamente desciende al 50% con 400 mg/kg. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dosis de cannabinoil. Las fluctuaciones en las respuestas entre las dosis impidieron la construcción de una curva dosis-respuesta y la identificación de un efecto dependiente de la dosis, lo que imposibilitó el cálculo de la  $DE_{50}$ .

**Tabla 4.** Evaluación de las crisis convulsivas menores y mayores inducidas por MP en ratas tratadas con diferentes dosis de cannabinoil.

Tratamiento CBN (mg/kg i.g.)	Crisis menores			Crisis mayores		
	Latencia (s)		Prevalencia (%)	Latencia (s)		Prevalencia (%)
	Promedio	EEM		Promedio	EEM	
<b>50 + MP</b>	287.5	51.11	100	335.5	95.69	100
<b>100 + MP</b>	383.6	34.76	75	631	267	50
<b>200 + MP</b>	458	39.45	100	581	185.7	75
<b>300 + MP</b>	416	35	75	512.3	126.3	75
<b>400 + MP</b>	492.6	141.2	50	435.5	216.5	50

n=4 x dosis; CBN: cannabinoil, EEM: error estándar de la media. MP: ácido 3 mercapto-propiónico. ANOVA de 1 vía (latencia). Prueba de Fischer (prevalencia).

### 6.3. Discusión del experimento 1

Nuestros hallazgos indican que, bajo las condiciones experimentales de este estudio, el cannabinoil en administración aguda no tiene efecto protector significativo en la prevención de crisis convulsivas menores y mayores ni modifica la latencia de su aparición en ratas sanas. La ausencia de efecto del cannabinoil podría deberse a múltiples factores.

El cannabinoil actúa sobre múltiples blancos farmacológicos, lo que contribuye a la complejidad de su farmacodinámica (Morales et al., 2017). La evidencia de estudios sugiere que el cannabinoil tiene baja afinidad por sus blancos farmacológicos, como por ejemplo, receptores del sistema endocannabinoide (ver Tabla 3) (McPartland et al., 2007). Es posible sugerir que una única administración de cannabinoil no sea suficiente para estimular cascadas de señalización necesarias para prevenir una crisis convulsiva. Otra posibilidad es que los efectos protectores del cannabinoil dependan de un régimen de administración subagudo o crónico; por ejemplo, el cannabidiol ha demostrado efectividad en el control de crisis epilépticas en humanos cuando se administra durante al menos 14 días (Devinsky et al., 2017). Finalmente, se ha reportado en otros estudios que la eficacia de fármacos anti-crisis debe ser contextualizada según el modelo experimental utilizado (Löscher & White, 2023), el uso de animales sanos en este estudio sugiere que el cannabinoil podría requerir un modelo de epilepsia o patología preexistente para mostrar efectos protectores.

Thornton y colaboradores, encontraron que el cannabinoil, hasta en concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ , no modificó la expresión de crisis convulsivas inducidas por pentilinetetrazol en peces cebra *scn1Lab<sup>+/-</sup>* (Thornton et al., 2020). Esto refuerza la idea de que el cannabinoil carece de eficacia anticrisis en las concentraciones evaluadas en sujetos experimentales sanos y concuerda con nuestros hallazgos, donde el cannabinoil no modificó significativamente la aparición de crisis convulsivas.

En contraste, Karler et al. reportaron que el cannabinoil redujo la actividad convulsiva, medida a través de un índice de contraflexión de extremidades, en un modelo de electroshock máximo en ratones sanos, con una  $\text{DE}_{50}$  calculada en 230 mg/kg (IC 95%:

215-246 mg/kg) (Karler et al., 1973). Sin embargo, al analizar la metodología empleada, este estudio presenta limitaciones importantes para una comparación rigurosa con nuestros resultados. Por ejemplo, la curva dosis-respuesta para cannabinoil se ajustó "a ojo", según lo declarado por los autores, y está basada en solo tres puntos experimentales. Aunque los autores reportaron una  $DE_{50}$ , no incluyeron otros parámetros clave de una curva dosis-respuesta completa, como el efecto mínimo, el efecto máximo y la pendiente de Hill (Tallarida & S. Jacob, 1979). Además el rango de dosis evaluado es limitado, en un rango de 200 y 250 mg/kg según los datos disponibles. Este enfoque metodológico no cumple con la rigurosidad de la farmacología moderna, haciendo que los resultados obtenidos nos sean completamente comparables con nuestros datos.

Kollipara y colaboradores evaluaron el cannabinoil en un modelo de pez cebra silvestre con crisis inducidas por pentileneotetrazol y encontraron que concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{M}$  redujeron significativamente la actividad convulsiva (Kollipara et al., 2023). Estos resultados contrastan con la falta de eficacia que muestran nuestros resultados. Las principales diferencias entre ambos estudios radican en: 1) El modelo experimental utilizado, 2) El fármaco proconvulsivante empleado y 3) La naturaleza distinta entre concentración y dosis de cannabinoil. La principal dificultad para comparar los resultados radica en la extrapolación del efecto de una concentración de cannabinoil en peces cebra a una dosis en ratas. Para establecer una homología entre especies, sería necesario contar con parámetros como la concentración cerebral y plasmática de cannabinoil, así como con datos sobre los parámetros farmacocinéticos como absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco en cada especie, además de realizar cálculos de escalamiento alométrico, entre otros (Boxenbaum, 1982; Gabrielsson & Weiner, 2000; Stewart et al., 2014). Actualmente no hay datos disponibles que permitan calcular esta equivalencia.

Con base en esto, es posible que se requieran dosis más altas de cannabinoil para inducir efectos significativos en ratas. Sin embargo, un estudio realizado por Chousidis y colaboradores describió los efectos tóxicos del cannabinoil en larvas de peces cebra. En dicho estudio, encontraron que la mortalidad aumentaba de manera dependiente de la concentración. La dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ), definida como la concentración que provoca la muerte del

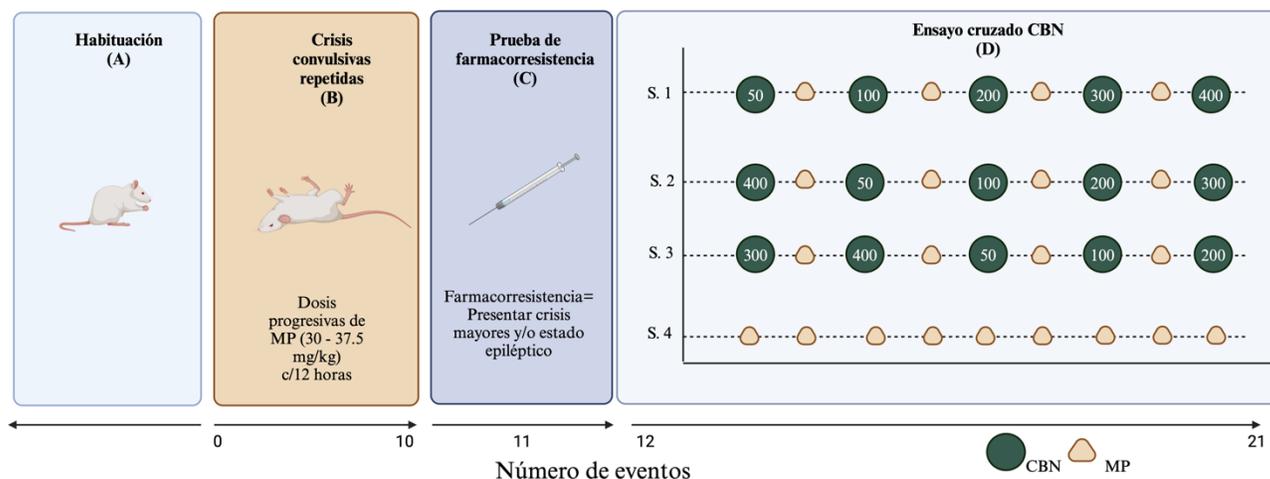
50% de los animales, se estimó en 1.12 mg/L (equivalente a 3.84  $\mu$ M). Además, las dosis letales 25 (DL<sub>25</sub>) y 75 (DL<sub>75</sub>) fueron de 1.02 mg/L (3.24  $\mu$ M) y 1.23 mg/L (3.91  $\mu$ M), respectivamente (Chousidis et al., 2020). Esto indica que las concentraciones evaluadas por Kollipara caen dentro del rango de toxicidad reportado por Chousidis, lo que sugiere que las dosis anticrisis de cannabinoles aquí descritas podrían ser tóxicas.

Una limitación del modelo experimental del presente estudio es que la inducción aguda de crisis convulsivas con MP altera los sistemas enzimáticos que regulan el balance entre glutamato y GABA (Lamar, 1970). Sin embargo, se desconoce si el protocolo utilizado en este modelo experimental reproduce los cambios neurofisiológicos asociados con la epileptogénesis o el desarrollo de una condición epiléptica crónica. Lo que limita trasladar los hallazgos a la clínica.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el cannabinoles no tiene un efecto protector en crisis convulsivas agudas en animales sanos. No obstante, es posible que el cannabinoles muestre un efecto protector en condiciones patológicas establecidas, razón por la cual decidimos probar las mismas dosis de cannabinoles en animales con crisis convulsivas severas farmacorresistentes fenitoína.

## **7. EXPERIMENTO 2**

Este experimento se diseñó para evaluar el posible efecto de diferentes dosis de cannabinoles en la expresión de crisis convulsivas severas en animales farmacorresistentes en comparación con animales farmacosensibles (Ver figura 3).



**Figura 3.** Evaluación de diferentes dosis de cannabinoles en un modelo experimental de crisis convulsivas farmacorresistentes. A) Los sujetos experimentales se habituaron durante 5 días antes del inicio del experimento. B) La administración recurrente de ácido 3-mercaptopropiónico (MP) en dosis progresivas cada 12 horas durante 5 días genera farmacorresistencia a fármacos anticrisis. C) Identificación de animales con crisis convulsivas severas farmacorresistentes: los sujetos experimentales recibieron fenitoína a 75 mg/kg vía i.p., y, una hora más tarde, MP en dosis de 37.5 mg/kg vía i.p. Aquellos sujetos con crisis convulsivas mayores y/o estado epiléptico se clasificaron como farmacorresistentes. D) Protocolo de ensayo cruzado para evaluar el efecto del tratamiento con cannabinoles sobre la expresión de crisis convulsivas severas farmacorresistentes.

## 7.1. Materiales y métodos

**7.1.1. Habitación:** los sujetos experimentales (n= 34) se habituaron por 5 días antes del inicio del experimento (Ver sección 5.2).

**7.1.2. Inducción del fenotipo de farmacorresistencia:** En los sujetos experimentales se administró una dosis de MP en dosis de 30 mg/kg. Se evaluó el cambio conductual durante una hora, se determinó la expresión de crisis convulsivas según la escala de Velísková, y se registraron las latencias a las crisis y la duración de estas (Ver sección 5.3.). Doce horas más tarde los sujetos experimentales recibieron otra dosis de MP. La dosis de 30 mg/kg se mantuvo si los animales presentaron crisis convulsivas mayores en la administración anterior; en caso de presentar crisis convulsivas menores en la inducción anterior se incrementó

la dosis 2.5 mg/kg. Este procedimiento se repitió cada 12 horas por 10 ensayos con una dosis máxima de 37.5 mg/kg de MP. La administración repetida de MP resulta en la resistencia a fármacos anticrisis como la fenitoína (Enrique et al., 2017).

**7.1.3. Identificación de animales con crisis convulsivas severas farmacorresistentes a fenitoína:** Veinticuatro horas después de completar las 10 administraciones de MP en dosis progresivas, los sujetos experimentales (n=19) se trataron con fenitoína a 75 mg/kg vía i.p., y una hora más tarde, se les administró MP en dosis de 37.5 mg/kg vía i.p. Aquellos sujetos que experimentaron crisis convulsivas mayores y/o estado epiléptico se clasificaron como farmacorresistentes a la fenitoína, mientras que aquellos que presentaron crisis convulsivas menores o no presentaron crisis convulsivas ni estado epiléptico se consideraron como farmacosensibles a la fenitoína.

**7.1.4. Protocolo de ensayo cruzado:** El ensayo cruzado inició veinticuatro horas después de la clasificación de los animales en farmacorresistentes o farmacosensibles a fenitoína. El objetivo del ensayo cruzado consistió en evaluar el efecto del cannabinoil en la expresión de crisis convulsivas farmacorresistentes, latencia y estado epiléptico en sujetos farmacorresistentes y farmacosensibles. En este diseño, cada sujeto experimental actuó como su propio control, optimizando la variabilidad intraindividual y reduciendo el número de sujetos necesarios, lo que aumentó la potencia estadística del estudio.

#### **7.1.5. Grupos de tratamiento durante el ensayo cruzado**

**7.1.5.1. Grupo de farmacorresistentes a fenitoína expuestos a cannabinoil:** Los animales clasificados como farmacorresistentes (n=13) a la fenitoína recibieron una de las dosis de cannabinoil de forma aleatoria (50, 100, 200, 300 o 400 mg/kg, i.g.), dos horas después se administró MP en dosis de 37.5 mg/kg. Posteriormente, se evaluaron los cambios conductuales durante una hora, registrando la expresión de crisis convulsivas según la escala de Velísková, así como las latencias y la duración.

Transcurridas 24 horas, se administró el vehículo de cannabinoil (aceite de coco), seguido de MP en dosis de 37.5 mg/kg. Este intervalo permitió la eliminación de la dosis previa de cannabinoil, preservando el estado de hiperexcitabilidad y evitando interacciones farmacológicas entre dosis. Veinticuatro horas después los animales recibieron otra dosis de cannabinoil y se repitió este protocolo. En el final del experimento todos los sujetos experimentales recibieron las cinco dosis de cannabinoil establecidas.

**7.1.5.2. Grupo farmacosenibles a fenitoína expuestos a cannabinoil:** Este grupo se manipuló igual que el grupo de farmacorresistentes a fenitoína expuestos a cannabinoil excepto que durante la prueba de farmacorresistencia a fenitoína fueron clasificados como farmacosenibles (n=6).

**7.1.5.3. Grupo MP:** Este grupo de animales clasificados como farmacorresistentes a la fenitoína (n=6) fue tratado como el grupo de animales farmacorresistentes expuestos a cannabinoil excepto que no se les administró cannabinoil ni vehículo, únicamente recibieron MP en dosis de 37.5 mg/kg durante la extensión del ensayo cruzado. Este grupo sirvió para comparar las latencias, la prevalencia de crisis convulsivas a lo largo del protocolo con los sujetos que sí recibieron cannabinoil.

### **7.1.5. Análisis de datos**

El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 9.5.1 para MacOS). Para identificar valores atípicos (outliers), se aplicó el método ROUT, que clasifica como atípicos aquellos puntos con una baja probabilidad de pertenecer a la distribución del conjunto de datos, considerando la mediana y la dispersión relativa. La distribución de las latencias a las crisis convulsivas se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, para determinar si seguían una distribución paramétrica. Las diferencias de las latencias en función de las dosis de cannabinoil dentro de cada grupo de tratamiento se analizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, mientras que las comparaciones entre los animales farmacorresistentes, farmacosenibles y el grupo MP se realizaron mediante

un ANOVA de dos vías. La prevalencia de crisis convulsivas se determinó mediante la prueba exacta de Fisher, comparando las distintas dosis de cannabinoles dentro de cada grupo y entre los diferentes grupos de tratamiento.

## 7.2. Resultados experimento 2

**7.2.1. Resultados de la prueba de farmacoresistencia fenitoína:** Los resultados obtenidos tras la prueba de resistencia a fenitoína se resumen en la tabla 5. Este protocolo muestra que la inducción repetida de crisis convulsivas con dosis crecientes de MP induce farmacoresistencia a fenitoína en el 64.29% de los casos (n=13), mientras que el 35.71% (n=6) son farmacosensibles.

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de resistencia a fenitoína después de la inducción repetida de crisis convulsivas.

<b>Grupo experimental</b>	<b>Farmacoresistente</b>	<b>Farmacosensible</b>
MP (n=19)	64.29%	35.71%

MP: ácido 3 mercaptopropiónico

## 7.2.2 Resultados del ensayo cruzado

A continuación se describen los resultados del ensayo cruzado según el grupo de tratamiento

### **7.2.2.1 Latencia y prevalencia de crisis mayores y estado epiléptico en animales identificados como farmacorresistentes a fenitoína durante el ensayo cruzado**

En el grupo MP, la latencia a las crisis convulsivas mayores se registró en  $525.3 \pm 20.7$  s, y en el grupo vehículo, en  $536.5 \pm 35.9$  s. En el grupo de animales farmacorresistentes a la fenitoína, las latencias promedio a las crisis convulsivas mayores mostraron una tendencia a aumentar con las dosis más bajas sin observar diferencias significativas con el grupo MP. En el grupo tratado con a dosis de 50 mg/kg de cannabino, la latencia fue de  $659.3 \pm 129.4$  s ( $p > 0.9999$  vs MP), en el grupo tratado con 100 mg/kg de  $639.4 \pm 53.9$  s ( $p = 0.2154$  vs MP), y en el grupo tratado con a 200 mg/kg se registró un valor de  $599 \pm 80.34$  s ( $p > 0.9999$  vs MP). Sin embargo, Las dosis de 300 y 400 mg/kg no mostraron esta tendencia de incrementarse como se observó con las dosis descritas arriba, las latencias a las crisis respecto al grupo MP y al vehículo, con valores de  $536.7 \pm 40.27$  s y  $539.1 \pm 51.02$  s, respectivamente.

Respecto a la prevalencia de crisis convulsivas mayores, el grupo MP presentó una prevalencia del 59.36%. En los animales farmacorresistentes a fenitoína, el tratamiento con cannabino en diferentes dosis mostró los siguientes resultados: con 50 mg/kg, la prevalencia alcanzó el 66.67% ( $p = 0.4473$  vs MP); con 100 mg/kg, la prevalencia alcanzó el 63.64% ( $p = 0.5329$  vs MP); con 200 mg/kg, la prevalencia disminuyó al 36.36% ( $p = 0.1448$  vs MP); con 300 mg/kg, la prevalencia se mantuvo en 63.64% ( $p = 0.5329$  vs MP); y con 400 mg/kg, la prevalencia alcanzó el 53.85% ( $p = 0.4790$  vs MP).

En el grupo MP, la prevalencia de estado epiléptico fue del 20.37%. En el grupo tratado con vehículo más MP, esta prevalencia fue ligeramente mayor, alcanzando el 25%. Los animales tratados con cannabino mostraron variaciones en la prevalencia del estado epiléptico dependiendo de la dosis administrada. A la dosis de 50 mg/kg de cannabino, la prevalencia fue del 23.53%. En el grupo tratado con 100 mg/kg, la prevalencia aumentó al 27.27%. Sin embargo, en el grupo tratado con 200 mg/kg, la prevalencia disminuyó hasta

el 9.09%. Con las dosis de 300 mg/kg y 400 mg/kg, las prevalencias fueron del 16.67% y 21.43%, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos

### **7.2.2. Latencia y expresión de crisis mayores y estado epiléptico en animales identificados como farmacosenesibles a fenitoína durante el ensayo cruzado**

En el grupo de animales farmacosenesibles a la fenitoína no se aprecia un efecto dosis-respuesta en la latencia a las crisis convulsivas mayores. En el grupo tratado con 50 mg/kg de cannabino, la latencia se calculó en  $563.7 \pm 163$  s ( $p > 0.9999$  vs MP); en el grupo tratado con 100 mg/kg, la latencia alcanzó  $341.3 \pm 16.29$  s ( $p = 0.0830$  vs MP); la dosis de 200 mg/kg mostró un valor de  $531 \pm 131.2$  s ( $p > 0.9999$  vs MP); y las dosis de 300 y 400 mg/kg presentaron valores de  $612.3 \pm 62.8$  s y  $481.3 \pm 83.35$  s, respectivamente. Cuando se compararon los diferentes tratamientos de cannabino entre los animales farmacoresistentes y farmacosenesibles a la fenitoína, no se encontraron diferencias entre la latencia a crisis convulsivas ( $p = 0.1982$ ).

En los animales farmacosenesibles a la fenitoína, en las inducciones en presencia de solamente el vehículo de cannabino, la prevalencia de crisis mayores se calculó en un 60%. El tratamiento con cannabino a 50 mg/kg mostró una prevalencia del 60% ( $p = 0.6767$  vs MP). Con la dosis de 100 mg/kg, la prevalencia se redujo a un 40% ( $p = 0.3543$  vs MP). Con 200 mg/kg, la prevalencia disminuyó al 33.33% ( $p = 0.2168$  vs MP). Con 300 mg/kg, la prevalencia aumentó al 83.33% ( $p = 0.2467$  vs MP). Finalmente, con 400 mg/kg, la prevalencia se calculó en 66.67% ( $p = 0.5444$  vs MP).

En el grupo MP, la prevalencia de estado epiléptico fue del 20.37%, mientras que en el grupo tratado con vehículo más MP, esta prevalencia aumentó al 25%. Los animales tratados con cannabino mostraron un patrón de disminución en la prevalencia de estado epiléptico en la mayoría de las dosis evaluadas. En los grupos tratados con 50 mg/kg, 300 mg/kg y 400 mg/kg de cannabino, no se observó ningún caso de estado epiléptico.. En

contraste, las dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg presentaron prevalencias del 25% y 50%, respectivamente, sin observarse diferencias significativas respecto al grupo MP o vehículo.

Destacan los resultados que la dosis de 200 mg/kg de cannabinoles que aumentó la latencia y disminuyó la prevalencia a las crisis convulsivas mayores en animales farmacorresistentes y farmacosensibles cuando se comparan contra el grupo MP y vehículo. Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística (Ver tabla 6).

**Tabla 6.** Latencia y prevalencia de crisis convulsivas mayores en animales farmacorresistentes y farmacosensibles a fenitoína durante el ensayo cruzado

Tratamiento (mg/kg, i.g.)	Farmacorresistentes			Farmacosensibles		
	Crisis mayores		Prevalencia de estado epiléptico (%)	Crisis mayores		Prevalencia de estado epiléptico (%)
	Latencia (s)	Prevalencia (%)		Latencia (s)	Prevalencia (%)	
<b>MP</b>	525.3 ± 20.7	59.26	20.37	525.3 ± 20.7	59.26	20.37
<b>Vehículo + MP</b>	536.5 ± 35.9	58.33	25	536.5 ± 35.9	60	25
<b>50 + MP</b>	659.3 ± 129.4	66.67	23.53	563.7 ± 163	60	0
<b>100 + MP</b>	639.4 ± 53.09	63.64	27.27	341.3 ± 16.23	40	25
<b>200 + MP</b>	599 ± 80.34	36.36	9.09	531.3 ± 131.2	33.33	50
<b>300 + MP</b>	536.7 ± 40.27	63.64	16.67	612.3 ± 62.28	83.33	0
<b>400 + MP</b>	539.1 ± 51.02	53.85	21.43	481.3 ± 83.35	66.67	0

MP: ácido 3 mercaptopropiónico; i.g.: intragástrica; Vehículo: aceite de coco; Los valores representan la latencia en segundos ± error estándar de la media y la prevalencia en porcentaje. ANOVA. Prueba de Fischer.  $p < 0.05^*$

#### 7.4. Discusión

Nuestros resultados muestran que las diferentes dosis de cannabinoles probadas en animales farmacorresistentes y farmacosensibles a la fenitoína no tuvieron efectos estadísticamente significativos en la disminución de la prevalencia de crisis convulsivas mayores, de estado epiléptico, ni en la latencia de estas crisis durante el ensayo cruzado. Entre las dosis evaluadas, la administración de 200 mg/kg de cannabinoles generó la mayor reducción en la prevalencia de crisis convulsivas mayores durante el ensayo cruzado, tanto en animales farmacorresistentes como en farmacosensibles. Sin embargo, esta reducción no alcanzó significancia estadística. La falta de efectos estadísticamente significativos del cannabinoles en ambos grupos podría atribuirse a múltiples factores.

En este experimento, los sujetos se sometieron a la inducción recurrente de crisis convulsivas mediante MP, lo que genera hiperexcitabilidad neuronal acompañada de cambios tanto a nivel celular, como la sobreexpresión de glicoproteína P, como a nivel estructural, incluyendo la formación de redes neuronales aberrantes (Höcht et al., 2009; Pérez-Pérez et al., 2021). Aunque se observó una discreta reducción en la prevalencia de crisis convulsivas mayores tras el tratamiento con cannabinoles, este efecto parece estar mediado por su acción sobre sistemas receptores alterados por las crisis recurrentes. No obstante, su capacidad moduladora de la excitabilidad neuronal bajo estas condiciones es relativamente débil y no alcanza un efecto anticrisis robusto.

El protocolo de ensayo cruzado ha sido ampliamente utilizado en farmacología clínica y experimental (Gundogdu Celebi et al., 2023; Verdijk et al., 2022). Este diseño metodológico permite, entre otras ventajas, reducir la variabilidad interindividual y el sesgo asociado a las diferencias entre sujetos, lo que aumenta la precisión en la estimación del efecto del tratamiento y garantiza una evaluación más estricta y confiable (Jones & Kenward, 2014; Senn, 2002). El protocolo experimental de ensayo cruzado empleado en este estudio sometió a los sujetos experimentales a distintas dosis de cannabinoles de manera subcrónica, lo cual significa que cada animal recibió varias dosis del fármaco, aunque no la misma dosis. La exposición repetida a una molécula puede inducir modificaciones como el

aumento o disminución de la expresión de receptores o modificaciones de vías de señalización celular (Ver sección 1.4.1) generando un ajuste en la respuesta del organismo y, posiblemente, favorecer el efecto del cannabinoide (Berridge, 2014). Sin embargo, en estas condiciones experimentales la reducción que generó la dosis de 200 mg/kg de cannabinoide no alcanzó la significancia estadística. Lo que sugiere que además de la exposición subcrónica a una molécula, podría ser necesaria la administración crónica de 200 mg/kg para lograr una reducción estadísticamente significativa. Así, los efectos beneficiosos observados podrían depender no solo de la dosis administrada, sino también de la naturaleza repetitiva de la exposición (Pertwee, 2008b).

Thornton y colaboradores (Thornton et al., 2020) evaluaron los efectos de varios fitocannabinoides (cannabidiol,  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, cannabidivarina, cannabinoide y linalol) en modelos de pez cebra a los 5 días post-fertilización. Los peces tenían la mutación homocigota *scn1Lab<sup>-/-</sup>*, que replica características del síndrome de Dravet. El cannabinoide produjo la reducción de la actividad convulsiva en concentraciones de 0.6 y 1  $\mu$ M, mostrando una eficacia superior en comparación con otros cannabinoides en peces con la mutación *scn1Lab<sup>-/-</sup>*. Los autores sugieren que el cannabinoide es efectivo en modelos de crisis convulsivas resistentes a fármacos, como en el modelo de mutación en *scn1Lab<sup>-/-</sup>*, el cual codifica para el canal de sodio voltaje dependiente Nav 1.1 expresado en interneuronas.

Esta evidencia contrasta con la nuestra, ya que, aunque en nuestro experimento hubo una reducción discreta de la prevalencia, esta no fue estadísticamente significativa. Aunque ambos modelos experimentales muestran resistencia a fármacos anticrisis, los mecanismos que llevan a esta resistencia son diferentes (Ver tabla 1). En nuestro modelo, las crisis convulsivas farmacorresistentes se desarrollan a partir de mecanismos desencadenados por la inducción repetida de crisis convulsivas severas, mientras que en el caso de Thornton y colaboradores, surge de una mutación puntual en un canal de sodio voltaje dependiente. Esto sugiere que la efectividad del fármaco depende del modelo experimental utilizado y de los mecanismos biológicos que determinan el fenotipo de farmacorresistencia.

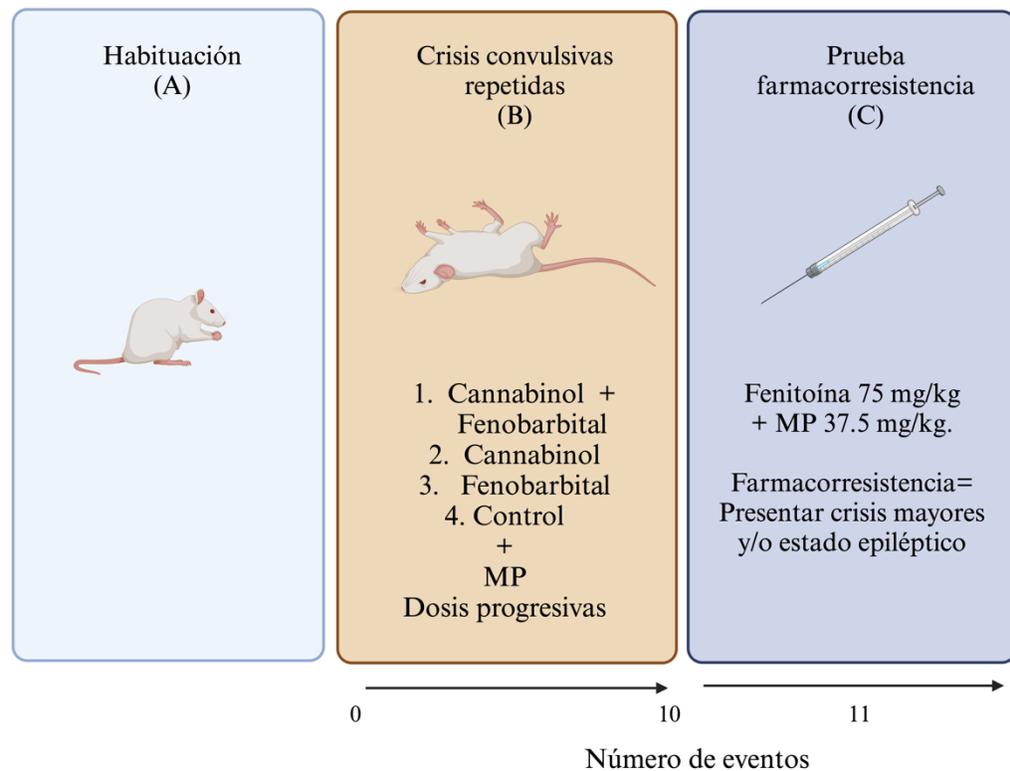
Las implicaciones de nuestros hallazgos son importantes. La discrepancia de efectividad entre modelos experimentales de farmacoresistencia sugiere que el cannabinoles es efectivo para la reducción de crisis epilépticas en humanos con etiologías genéticas, pero no es clara su aplicabilidad en otros tipos de epilepsias. Respecto a limitaciones de nuestro estudio, se debe considerar que en el protocolo de ensayo cruzado los animales estuvieron expuestos de manera frecuente al cannabinoles, sin embargo, no a la misma dosis. Esto significa que nuestros resultados muestran la efectividad de una sola dosis en un sistema biológico previamente expuesto de manera recurrente a la molécula, lo cual podría haber influido en la respuesta del organismo y en su sensibilidad a la dosis de 200 mg/kg. Este diseño experimental no permite evaluar con precisión el efecto de una dosis terapéutica sostenida en el tiempo, lo que es relevante porque, en contextos clínicos, el tratamiento con agentes anti-crisis generalmente implica una administración prolongada y estable para lograr una disminución en la frecuencia y severidad de las crisis epilépticas.

En conclusión, la dosis de cannabinoles de 200 mg/kg redujo la expresión de crisis convulsivas mayores en animales farmacoresistentes y farmacosensibles, aunque sin alcanzar la significancia estadística. Este efecto discreto en la reducción de la prevalencia de crisis convulsivas mayores lo convierte en un posible agente adyuvante para combinarse con fármacos anticrisis establecidos. Este enfoque podría permitir investigar si combinaciones de fármacos anticrisis generan efectos aditivos al ser administrados conjuntamente, abriendo nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas en el tratamiento de la epilepsia farmacoresistente.

## **8. EXPERIMENTO 3**

Este experimento se diseñó para caracterizar el efecto de la administración subcrónica de cannabinoles solo y en combinación con fenobarbital en: A) la inducción de crisis convulsivas repetidas; B) En el desarrollo de farmacoresistencia a fenitoína (Ver figura 4).

El fenobarbital es un fármaco anticrisis de primera generación que ha demostrado ser eficaz en diversos tipos de epilepsia, incluso en casos de farmacoresistencia (Yasiry & Shorvon, 2012). Su amplia disponibilidad, bajo costo y buen perfil farmacológico lo convierten en un candidato ideal para evaluar la combinación con cannabinoles (Mantovani-Guerreiro & Montovani-Guerreiro, 2014). La dosis de 15 mg/kg i.p. de fenobarbital ha sido ampliamente usada en estudios preclínicos de farmacoresistencia (Bethmann et al., 2008). El cannabinoles en dosis de 200 mg/kg de cannabinoles tuvo el mayor efecto en reducir la expresión de crisis mayores en el ensayo cruzado y por eso se escogió para probar su efecto en monoterapia y en combinación con fenobarbital (Ver sección 7.2).



**Figura 4.** Evaluación del efecto del cannabinoles en monoterapia y en combinación con fenobarbital durante la inducción de crisis convulsivas generalizadas severas recurrentes. A) Todos los sujetos experimentales se habituaron durante 5 días antes del inicio del experimento; B) Se emplearon 4 tratamientos durante la inducción de crisis convulsivas generalizadas severas recurrentes, 1. Cannabinoles 200 mg/kg más fenobarbital 15 mg/kg, 2. Can-

nabinol 200 mg/kg, 3. Fenobarbital 15 mg/kg, 4. Ácido 3 mercaptopropiónico en dosis progresivas. C) Identificación de animales con crisis convulsivas severas farmacorresistentes, los sujetos experimentales se trataron con fenitoína a 75 mg/kg vía i.p., y una hora más tarde, se les administró ácido 3 mercaptopropiónico en dosis de 37.5 mg/kg vía i.p. Aquellos sujetos que expresaron crisis convulsivas mayores y/o estado epiléptico se clasificaron como farmacorresistentes.

## **8.1. Materiales y métodos**

**8.1.1. Habitación:** los sujetos experimentales (n=55) se habituaron por 5 días antes del inicio del experimento (Ver sección 5.2).

**8.1.2. Inducción del fenotipo de farmacorresistencia con tratamientos:** El protocolo de inducción de fenotipo de farmacorresistencia se explicó en la sección 7.1.2. Para este experimento los animales recibieron uno de los siguientes tratamientos:

**8.1.2.1. Cannabinol + Fenobarbital (CBN+FB) (n=15):** El cannabinol se administró en dosis de 200 mg/kg vía i.g. en un volumen de 1 ml/kg, una hora después el fenobarbital se administró en dosis de 15 mg/kg vía i.p. en volumen de 1 ml/kg y una hora más tarde se administró MP. Se evaluó el comportamiento durante una hora y se registraron la latencia y la expresión de crisis convulsivas mayores y menores de acuerdo con la escala de Velísková, así como la presencia de estado epiléptico y la mortalidad. Este procedimiento experimental se repitió cada 12 horas durante 10 administraciones. Veinticuatro horas más tarde los animales se identificaron como farmacorresistentes y farmacosensibles según lo expuesto en la sección 7.1.3. Veinticuatro horas después de la última administración de MP se sacrificaron los sujetos experimentales bajo anestesia con pentobarbital sódico en dosis de 80 mg/kg en volumen de 2 ml/kg.

Con el propósito de evaluar el efecto global de los tratamientos durante la inducción recurrente de crisis convulsivas con MP, se utilizó un índice que considera tanto la frecuencia de las crisis mayores y el estado epiléptico como el aumento progresivo de la dosis de MP. Este enfoque permite evaluar de manera integral cómo la elevación gradual de la dosis de MP influye en la expresión de crisis mayores y estado epiléptico,

proporcionando una medida global de la respuesta al tratamiento a lo largo del protocolo experimental.

Índice de expresión de crisis mayores:

$$\text{Índice de crisis} = \left( \frac{\Sigma(\text{Número de crisis mayores})}{\Sigma(\text{Dosis acumuladas de MP})} \right) \times 100$$

Índice de expresión de estado epiléptico:

$$\text{Índice de estado epiléptico} = \left( \frac{\Sigma(\text{Número de veces que presentó estado epiléptico})}{\Sigma(\text{Dosis acumuladas de MP})} \right) \times 100$$

**8.1.2.2. Cannabinol (CBN) (n=15):** Los animales se manipularon igual que el grupo de tratamiento de cannabinol + fenobarbital excepto que solo se administró cannabinol a 200 mg/kg vía i.g.

**8.1.2.3. Fenobarbital (FB) (n=18):** Los animales se manipularon igual que el grupo de tratamiento cannabinol + fenobarbital excepto que solo se administró fenobarbital 15 mg/kg vía i.p.

**8.1.2.4. MP (n=8):** Los sujetos experimentales se manejaron igual que el grupo cannabinol + fenobarbital excepto que solo se administró MP en dosis progresivas.

### **8.1.3. Análisis de datos**

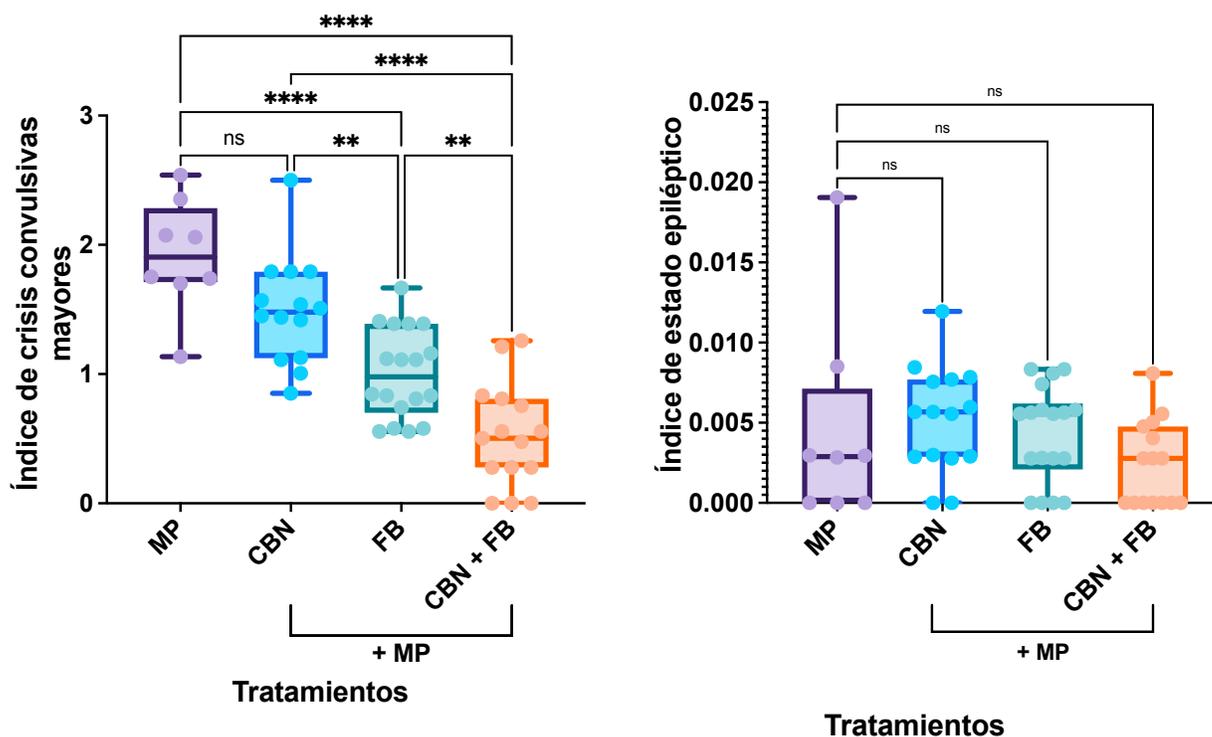
Se empleó el software GraphPad Prism Versión 9.5.1 para MacOS. Para el análisis de los índices de severidad, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si seguían una distribución paramétrica. Luego ANOVA de 1-vía y Pos hoc Tuckey. La prevalencia de farmacoresistencia se calculó con la prueba exacta de Fischer. Se consideró significativa una  $p < 0.05$ .

## 8.2. Resultados del experimento 3

A continuación, se muestran los resultados de los diferentes tratamientos en la reducción de los índices de severidad de crisis mayores y estado epiléptico durante la inducción repetida de crisis convulsivas, y en la prevalencia de farmacoresistencia a fenitoína.

**8.2.1. Índice de severidad de crisis mayores durante la inducción repetida de crisis convulsivas:** El grupo MP (n=8) mostró un índice promedio de crisis convulsivas mayores de  $1.919 \pm 0.1547$ . El grupo tratado con CBN presentó un índice de  $1.492 \pm 0.1106$  ( $p = 0.0804$  vs. MP). El tratamiento FB tuvo un índice de  $1.004 \pm 0.0820$  ( $p < 0.0001$  vs. MP), es decir, el fenobarbital tuvo efecto anticrisis en nuestro modelo experimental. Finalmente, el grupo de CBN + FB mostró la mayor reducción en la expresión de crisis convulsivas mayores, con un índice de  $0.5193 \pm 0.1035$  ( $p < 0.0001$  vs. MP). Además, esta combinación mostró ser significativamente más efectiva que el fenobarbital para disminuir la severidad de las crisis convulsivas mayores ( $p = 0.0048$ ). Los resultados se muestran en la figura 5A.

**8.2.2. Índice de severidad de estado epiléptico durante la inducción repetida de crisis convulsivas:** Respecto al índice de severidad de estado epiléptico los valores promedio se calcularon así:  $0.004 \pm 0.002$  para MP,  $0.005 \pm 0.0008$  para CBN,  $0.004 \pm 0.0007$  para FB y  $0.002 \pm 0.0006$  para CBN+FB. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según la prueba de Kruskal-Wallis ( $p = 0.0580$ ). Los resultados se muestran en la figura 5B.



A)

B)

**Figura 5.** Representación del efecto de diferentes tratamientos en la expresión de crisis mayores y estado epiléptico. A) La combinación de cannabino 200 mg/kg más fenobarbital 15 mg/kg mostró la mayor efectividad para disminuir la expresión de crisis mayores entre los grupos de tratamiento. Los puntos representan los valores individuales para cada grupo; ANOVA de 1-vía; Pos hoc Tuckey. B) No hay diferencia en la expresión de estado epiléptico entre los grupos experimentales; Test de Kruskal-Wallis. Control (n=8) Cannabino 200 mg/kg (n=14) i.g., fenobarbital 15 mg/kg i.p (n=18); CBN + FB (n=15).  $p < 0.05^*$ ;  $** 0.0021$ ;  $**** < 0.0001$ .

**8.2.2. Prueba de farmacoresistencia a fenitoína:** Durante la prueba de farmacoresistencia a fenitoína el grupo MP mostró una prevalencia de farmacoresistencia del 87.5%. El tratamiento con cannabino (CBN, n=10) redujo la prevalencia de farmacoresistencia a 10% ( $p = 0.0019$  vs. MP). El tratamiento en monoterapia con fenobarbital (FB, n=11) mostró farmacoresistencia en el 72.73% de los casos ( $p = 0.4257$  vs. MP). La combinación de cannabino y fenobarbital (CBN + FB, n=8) mostró una prevalencia de 77.78% ( $p = 0.6593$  vs. MP). Los datos se resumen en la tabla 7.

Durante la prueba de farmacorresistencia, se apreció que los grupos de tratamiento de MP, FB y CBN + FB presentaron estado epiléptico en el 87.5%, 45.45% ( $p = 0.3043$  vs. MP) y 77.78% ( $p > 0.9999$  vs. MP) de los casos, respectivamente. Mientras que el tratamiento con CBN presentó estado epiléptico en solo el 10% de los casos ( $p = 0.0019$  vs. MP).

**Tabla 7.** Efecto de los diferentes tratamientos en la prevalencia de farmacorresistencia a fenitoína

<b>Grupo experimental</b>	<b>Prevalencia farmacorresistencia a fenitoína (%)</b>	<b>Prevalencia estado epiléptico (%)</b>
<b>MP (n=8)</b>	87.5	87.5
<b>CBN (n=10)</b>	10**	10**
<b>FB (n=11)</b>	72.73	45.45
<b>CBN+FB (n=8)</b>	77.78	77.78

Prueba de Fischer. \*\*  $p < 0.0332$ \*\*

En conclusión, durante la inducción de crisis convulsivas repetidas los tratamientos FB y CBN+FB modificaron el índice de severidad de crisis mayores. El tratamiento de CBN+FB mostró la mayor efectividad para reducir la severidad de las crisis convulsivas mayores. Además, el grupo de tratamiento CBN mostró la mayor reducción en la prevalencia de farmacorresistencia y estado epiléptica durante la prueba con fenitoína.

### **8.3. Discusión**

Nuestros resultados indican que, durante la inducción de crisis convulsivas repetidas, los tratamientos FB y la combinación de CBN+FB modificaron el índice de severidad de las crisis convulsivas mayores. En particular, el tratamiento con CBN+FB fue el más efectivo

para reducir la severidad de estas crisis. Además, el grupo tratado con CBN mostró la mayor reducción en la prevalencia de crisis y del estado epiléptico durante la prueba de farmacoresistencia a la fenitoína. Estos hallazgos respaldan la hipótesis propuesta: la administración subcrónica de cannabinoles y fenobarbital disminuye la expresión de crisis convulsivas durante la inducción recurrente de crisis convulsivas severas. Sin embargo, el tratamiento con CBN en monoterapia no redujo significativamente los índices de severidad.

El efecto protector de la combinación de cannabinoles y fenobarbital podría estar relacionado con interacciones farmacodinámicas. El fenobarbital, un agonista del receptor GABA<sub>A</sub>, aumenta el tiempo de apertura de los canales de cloro, lo que provoca la hiperpolarización de las neuronas y reduce su excitabilidad (Kwan & Brodie, 2004). Aunque el cannabinoles en monoterapia no mostró una reducción significativa en la severidad de las crisis convulsivas mayores, su combinación con fenobarbital resultó ser más efectiva que el tratamiento con fenobarbital en monoterapia, lo que sugiere una posible modulación alostérica positiva del receptor GABA<sub>A</sub> por parte del cannabinoles.

Datos reportados por Bakas y colaboradores, muestran que el cannabidiol es un modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub> ( $\alpha 1-6\beta\gamma 2$ ) (Bakas et al., 2017). Aunque existen diferencias estructurales entre el cannabidiol y el cannabinoles, por ejemplo, un grupo hidroxilo en la posición 1, la homología química podría ser suficiente para modular el receptor GABA<sub>A</sub>. Es decir, en presencia de un agonista de GABA<sub>A</sub> como el fenobarbital, el cannabinoles podría incrementar la conductancia de cloro, potenciando el efecto inhibitorio del GABA (M. Zhang et al., 2024). Este posible efecto alostérico explicaría la falta de eficacia del cannabinoles en monoterapia, y su efecto complementario cuando se administra con fenobarbital. Para confirmar esta interacción, serían necesarios estudios adicionales que determinen el papel del cannabinoles como modulador alostérico en el receptor GABA<sub>A</sub>.

Otra posible explicación para la reducción de la expresión de crisis mayores en el grupo tratado con fenobarbital y cannabinoles es que ambos fármacos ejerzan efectos complementarios, pero independientes. El cannabinoles podría inhibir la recaptura de neurotransmisores

como serotonina, noradrenalina y GABA, modulando así la actividad neuronal (Banerjee et al., 1975). Este efecto, combinado con la acción del fenobarbital como agonista del receptor GABA<sub>A</sub> podría potenciar la inhibición del sistema nervioso central, lo que en conjunto contribuiría a la disminución en la expresión de las crisis.

Se ha documentado que otros sistemas de neurotransmisión, además de GABA y glutamato, también ejercen un control moderado pero significativo sobre la expresión de crisis convulsivas (Weinshenker & Szot, 2002). El cannabinoide, aunque es un modulador relativamente débil de la recaptura de diversas aminas endógenas (Banerjee et al., 1975), podría influir en la susceptibilidad a las crisis convulsivas a través de su acción sobre los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico y GABAérgico. Estos sistemas han demostrado tener efectos moduladores sobre la excitabilidad neuronal, por lo que la acción del cannabinoide en estas vías podría contribuir a una reducción de la susceptibilidad a tener crisis convulsivas en los animales de este estudio (Bagdy et al., 2007; Bozzi & Borrelli, 2013; Weinshenker & Szot, 2002).

Es interesante notar que algunas publicaciones han reportado efectos beneficiosos del cannabinoide en el tratamiento de trastornos del sueño (Lavender et al., 2023). Aunque estos estudios presentan limitaciones metodológicas, el efecto positivo del cannabinoide en mejorar el sueño podría estar relacionado con su capacidad para inducir sedación. Este efecto sedante podría tener como sustrato una potenciación del sistema GABAérgico, ya sea a través de una posible modulación alostérica del receptor GABA<sub>A</sub> o mediante la inhibición de la recaptura de GABA, incrementando así la disponibilidad de este neurotransmisor en la sinapsis.

Algunos estudios preclínicos han demostrado que la coadministración de un fármaco GABAérgico con un cannabinoide puede aumentar su efectividad. En un modelo de crisis convulsivas generalizadas severas inducidas por MP, Frías-Soria encontró que la combinación de fenobarbital (15 mg/kg) y cannabidiol (200 mg/kg) mostró ser la más efectiva para reducir tanto la expresión de crisis convulsivas mayores como el estado epiléptico en com-

paración con el fenobarbital en monoterapia. También es interesante que la combinación del cannabidiol con fenitoína no redujo la expresión de crisis convulsivas ni de estado epiléptico (Frías-Soria et al., 2021). Datos no publicados de Monserrat-Fuentes muestran que el cannabidiol aumenta el efecto anticrisis del diazepam y el fenobarbital, efecto no observado con oxcarbazepina, lamotrigina y ácido valproico.

De forma similar, otro estudio en ratones inducidos químicamente con pentilene-tetrazol demostró que la anandamida, un cannabinoide endógeno, así como los inhibidores de su transporte (URB597 y AM404), potenciaron el efecto anticrisis del diazepam, otro fármaco GABAérgico (Manna, 2022). Estos hallazgos refuerzan la posibilidad de que los cannabinoide puedan modular el sistema GABAérgico, incrementando la eficacia de los tratamientos anticrisis y sugiriendo un posible efecto aditivo en el manejo de crisis convulsivas.

Retomando los hallazgos principales de este experimento, observamos que el tratamiento subcrónico con cannabinoide a una dosis de 200 mg/kg redujo significativamente la prevalencia de farmacoresistencia a la fenitoína. Esta disminución en la resistencia podría deberse a varios mecanismos. Sabemos que la farmacoresistencia a menudo se asocia con procesos inflamatorios que afectan la estructura y función de las células del sistema nervioso central. Específicamente, moléculas proinflamatorias como las interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL6), el factor de necrosis tumoral (TNF), la proteína de caja de alta movilidad 1 (HMGB1), quimioquinas, moléculas de adhesión y la activación del complemento, están involucradas en el aumento de la excitabilidad celular y en la epileptogénesis (Löscher et al., 2020b; Vezzani et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que el cannabinoide regula la inflamación a través de varios mecanismos de señalización. Primero, inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, lo que disminuye la producción de AMPc en células EL4.IL2 y timocitos, reduciendo la secreción de interleucina-2 (IL-2), un factor clave en la respuesta inmune (Condie et al., 1996). Además, inhibe el factor de transcripción NF-kappaB y la actividad del inflammasoma NLRP3, lo que contribuye a la reducción de citoquinas inflamatorias, como las interleucinas proinflamatorias en timocitos activados (Herring & Kaminski, 1999; Jüttler et al.,

2004). Por último, aumenta la concentración de calcio intracelular, lo que activa el factor nuclear de células T activadas (NFAT), involucrado en la activación y diferenciación de las células T, y la regulación de factores de transcripción esenciales en la respuesta inmune (Jan et al., 2002; Macian, 2005).

Las implicaciones de estos hallazgos son diversas. El fenobarbital es un fármaco ampliamente accesible, aunque sus efectos adversos, como la sedación, pueden limitar su uso prolongado (Kwan & Brodie, 2004). La disminución de las crisis convulsivas al combinar cannabinoles y fenobarbital destaca como una estrategia farmacológica efectiva, ya que podría permitir reducir la dosis de fenobarbital requerida para el control óptimo de las crisis convulsivas y así minimizar estos efectos adversos.

Por otro lado, cabe destacar que el cannabinoles en monoterapia redujo de manera discreta la expresión de crisis convulsivas, sin embargo, y no alcanzó significancia estadística. Este resultado confirma observaciones de experimentos anteriores donde los datos muestran que el cannabinoles, por sí mismo en modelo por inducción de crisis a través de pentileno-tetrazol, no protege contra la aparición de crisis convulsivas (Thornton et al., 2020). Por otro lado, este tratamiento mostró una disminución de farmacoresistencia a la fenitoína en comparación con el grupo control. Esto sugiere que el cannabinoles podría ejercer un efecto protector contra la farmacoresistencia, independientemente de su impacto sobre la excitabilidad celular.

Las limitaciones de este experimento incluyen: el uso de un modelo experimental de crisis convulsivas farmacoresistencia y no de epilepsia. Desde un punto de vista mecanístico, el MP induce crisis convulsivas alterando el ciclo glutamato-GABA (Lamar, 1970). Una posible explicación del efecto protector de la combinación de fenobarbital y cannabinoles es la potenciación del sistema GABAérgico por parte del cannabinoles. Sin embargo, en este modelo se inhibe la producción de GABA y se aumenta su metabolismo, lo que podría explicar la falta de efectividad del cannabinoles en monoterapia, ya que, sin un agonista ortostérico del receptor GABA<sub>A</sub>, el cannabinoles no podría modular su conductancia.

En este sentido, sería necesario evaluar los efectos del cannabinoide en un modelo alternativo que no afecte directamente el sistema de neurotransmisión GABAérgico. Modelos como los de administración de ácido kainico, litio-pilocarpina o kindling podrían ser adecuados para este propósito, al permitir el estudio de la actividad anticonvulsiva del cannabinoide bajo condiciones fisiopatológicas distintas (Löscher & White, 2023).

Otra limitación de este experimento es que dentro de los parámetros evaluados ninguno involucra al sistema inmune y cómo el cannabinoide podría modular la respuesta inflamatoria en nuestras condiciones experimentales. Más estudios son necesarios para determinar con certeza si el efecto protector en el desarrollo de farmacoresistencia del cannabinoide en monoterapia es producto de la modulación del sistema inmune o depende de otros factores, como por ejemplo, factores farmacocinéticos relacionados a la metodología experimental.

En conclusión, este experimento mostró que el cannabinoide en monoterapia reduce la prevalencia de farmacoresistencia a fenitoína, y combinado con fenobarbital, disminuye significativamente la expresión de crisis mayores. Esto sugiere que el cannabinoide puede actuar sobre dianas farmacológicas relacionadas con la modulación de sistemas de neurotransmisión y posiblemente en el sistema inmune. Los resultados apuntan al cannabinoide como un fármaco coadyuvante en el tratamiento de crisis convulsivas farmacoresistentes, con un posible efecto protector contra el desarrollo de farmacoresistencia. Sin embargo, se requieren más estudios para comprender los mecanismos implicados en este efecto protector.

Hasta el momento, el estudio del efecto del cannabinoide se ha centrado principalmente en modelos preclínicos de farmacoresistencia, lo que, aunque valioso para la farmacología experimental, restringe su aplicabilidad clínica. Por lo tanto, es fundamental investigar el efecto del cannabinoide en pacientes con epilepsia farmacoresistente, con el fin de ampliar nuestro conocimiento sobre su impacto en contextos patológicos ya establecidos, adoptando un enfoque traslacional que permita aplicar los hallazgos experimentales a la práctica clínica.

## 9. EXPERIMENTO 4

Este experimento se diseñó para evaluar el efecto del cannabinoide en la liberación de glutamato en terminales sinápticas *in vitro* (sinaptosomas) obtenidas de pacientes con epilepsia farmacorresistente y sometidos a cirugía de epilepsia. Los sinaptosomas son terminales sinápticas funcionales que conservan la capacidad de generar ATP, liberar y reciclar neurotransmisores. Además, poseen en sus membranas plasmáticas canales iónicos, transportadores y receptores que les permiten mantener el potencial de membrana y la homeostasis iónica. También contienen proteínas y enzimas funcionales presentes en las terminales nerviosas (Dunkley et al., 2008; Whittaker, 1993). Estas propiedades hacen de los sinaptosomas un modelo adecuado para evaluar el efecto de tratamientos sobre la liberación de neurotransmisores en terminales sinápticas aisladas.

### 9.1. Materiales y métodos

#### 9.1.1. Obtención de tejido de pacientes

El tejido estudiado provino de pacientes con epilepsia farmacorresistentes que se sometieron a cirugía de epilepsia (n=12) (HUM-206, 208-211, 213, 214, 219-222) del Centro Internacional de Cirugía de Epilepsia, Hospital HMG-Coyoacán). Todos los pacientes llevaron una evaluación prequirúrgica que incluye evaluación electroencefalográfica, imágenes diagnósticas como resonancia magnética. Los datos clínicos de los pacientes se resumen en la tabla 9.

Los comités científicos y de ética de las instituciones involucradas en este estudio aprobaron el protocolo (055/2018). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes. Los candidatos a la cirugía cumplieron con los siguientes requisitos:

#### Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de epilepsia farmacorresistente.
- Sexo masculino o femenino, con edad entre 1 y 40 años.
- Que contaran con un calendario de crisis detallado de al menos 3 meses previos a la cirugía con la finalidad de confirmar la presencia de por lo menos dos crisis al mes.
- Con estudios de resonancia magnética.
- Con registro de 4 electroencefalogramas seriados que indiquen la presencia de actividad epileptiforme.
- Con valoración preoperatoria completa.
- Antecedente de haber sido tratados adecuadamente con politerapia farmacológica por un espacio ininterrumpido de 2 años, con seguimiento de niveles séricos de fármacos antiepilépticos y sin haber mostrado mejoría.
- Que su epilepsia sea considerada un impedimento para realizar sus actividades cotidianas, asociándose a un deterioro en la calidad de vida.
- Con datos de las pruebas neuropsicológicas para determinar la condición cognitiva basal e identificar los desórdenes de comportamiento o memoria relacionados con las crisis epilépticas.
- Que se mantengan libres de fármacos antiepilépticos por lo menos 24 h antes de efectuarse el procedimiento neuroquirúrgico.

#### Criterios de exclusión

- Padecimiento de enfermedades sistémicas graves que contraindiquen una neurocirugía mayor.
- Diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa.
- Falta de cooperación con el tratamiento.
- Presencia de implantes, prótesis metálicas y claustrofobia.
- Pacientes previamente sometidos a cirugía resectiva por cualquier indicación.
- Pacientes que no hayan sido valorados adecuadamente.

#### Criterios de eliminación

- Pacientes que retiren su consentimiento para utilizar el tejido cerebral obtenido durante la cirugía.

El tejido neocortical con actividad epileptiforme se recolectó durante la cirugía de epilepsia. Inmediatamente después de la resección, el tejido se sumergió en una solución amortiguadora isotónica fría (Solución A) (sacarosa 0.32 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.4) y se oxigenó mediante burbujeo (0.5 L/h). Luego, las muestras se transportaron del quirófano al laboratorio en menos de 45 minutos para asegurar la viabilidad del tejido. Lo anterior de acuerdo con lo reportado por el estudio de Martínez-Aguirre et al., 2023.

### **9.1.2. Aislamiento de sinaptosomas**

Se empleó aproximadamente 1 g de tejido obtenido en las cirugías, el cual se colocó en 2 mL de solución A dentro de un homogeneizador vidrio-teflón. El tejido se homogeneizó mediante 10 golpes girando el pistón. La suspensión se centrifugó a 3,600 r.p.m. ( $1,000 \times g$ ) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se conservó y se colocó cuidadosamente sobre la capa al 3 % del gradiente de Percoll. Posteriormente, se centrifugó a 20,000 r.p.m. ( $31,000 \times g$ ) durante 5 minutos a 4 °C.

Se recolectó la fracción ubicada entre las capas de Percoll al 3 % y al 23 %, la cual se resuspendió en 2 mL de solución A. Esta muestra se centrifugó nuevamente a 16,000 r.p.m. ( $20,000 \times g$ ) durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado, y la pastilla obtenida se resuspendió en 3.5 mL de líquido cefalorraquídeo artificial (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM ácido ascórbico, 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pH 7.4).

Los sinaptosomas aislados se distribuyeron en fracciones de 450  $\mu\text{L}$  en siete tubos: uno basal, uno con KCl 33mM, cinco con diferentes concentraciones de cannabinoles (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM) y un tubo adicional para la cuantificación de proteínas. El cannabinoles fue preparado en DMSO y agua Mili-Q. A los tubos basal y KCl 33mM se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de líquido cefalorraquídeo artificial para completar un volumen final de

500  $\mu\text{L}$ . A los 5 tubos designados a cannabinoil se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la concentración correspondiente del fármaco. Posteriormente, se agregaron 5.5  $\mu\text{L}$  de KCl 3 M a los tubos de KCl y a los que contenían cannabinoil, obteniendo una concentración final de 33 mM de KCl.

Tras la aplicación de los tratamientos, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se separaron la pastilla (fracción sinaptosomal) y el sobrenadante (fracción extrasinaptosomal), los cuales se almacenaron por separado a -80 °C hasta la cuantificación de glutamato en la fracción extrasinaptosomal mediante HPLC (véase protocolo detallado más adelante), la fracción sinaptosomal se almacenó a -80 °C.

### **9.1.3. Caracterización de sinaptosomas: expresión de sinaptofisina y proteína de densidad postsináptica 95**

La cuantificación de la expresión de las proteínas sinaptofisina y densidad postsináptica 95 (PSD-95) utilizando la técnica de Western Blot, se realizó con el objetivo de evaluar la eficacia del protocolo de aislamiento de sinaptosomas. La sinaptofisina es una proteína ubicua en la presinapsis y participa, junto con otras proteínas como la sinapsina 1, en los procesos de liberación de neurotransmisores (van Oostrum et al., 2023). Por su parte, la PSD-95 es una proteína de andamiaje que interactúa con receptores NMDA y AMPA, asegurando su localización y funcionalidad en la membrana postsináptica. Además, está implicada en la regulación de la señalización y la plasticidad sináptica (Sheng & Kim, 2011).

De la fracción de proteínas aislada en el protocolo de extracción de sinaptosomas (Ver sección 9.1.2.) se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford. Una vez cuantificada, se inició el protocolo para Western Blot. Para esto, de la fracción correspondiente a sinaptosomas se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína por carril en una solución de Laemmle (número de catálogo 1610737, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). La separación de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al entre 8

y 10 %, aplicando 85 V durante los primeros 30 minutos y luego 100 V por 2 horas. Para el proceso de corrida, se utilizó una solución compuesta de Tris 25 mM, glicina 192 mM y 0.1 % de SDS, con un pH de 8.3 (número de catálogo 1610723, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

Luego de la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF; Immun-blot, cat. 1620264, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo al 5 % (BlotQuickBlocker, cat. WB57, EMD Millipore, Burlington, MA, EE. UU.) disuelta en solución amortiguadora TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 0.1 %, pH 7.5). Posteriormente, se incubaron a 4 °C durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente (Sinaptofisina, Abcam, Waltham, MA, EE. UU., Cat. AB8049; PSD-95, Invitrogen, Rockford, IL, EE. UU., Cat. 7E3-1B8, ThermoFisher). Tras esta incubación, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron por 2 horas con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. La detección de las señales de proteínas se realizó mediante el sistema Clarity Western (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas correspondientes a los pesos moleculares específicos se cuantificaron mediante densitometría utilizando el software de análisis de imágenes (Image Lab Versión 5.2.1, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

#### **9.1.4. Cuantificación de glutamato por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Para la cuantificación del glutamato liberado de las terminales sinápticas, se tomaron 20  $\mu$ L de los sobrenadantes resultantes de la última centrifugación de las muestras de sinaptosomas se mezclaron con 30  $\mu$ L de una solución OPA-NAC (0.01 M de oftalaldehído y 0.01 M de N-acetilcisteína, en una base de metanol-tetraborato de sodio 0.1 M en proporción 1:5, con un pH final de  $9.3 \pm 0.05$ ). Esta preparación se inyectó en un cromatógrafo con detector de fluorescencia (excitación a 250 nm y emisión a 395 nm), utilizando el modelo Waters® 474 y una columna Nova-Pack de 3.9 x 150 mm (C18, 4  $\mu$ m, Waters, Milford, MA, EE. UU.) de fase inversa para separación y cuantificación. La

fase móvil se compuso de: solución A (concentrado de amortiguador de acetato y agua HPLC, en proporción 1:10, incluyendo acetato de sodio 1.4 M, EDTA disódico 10 mM y trietilamina, ajustada a pH 5.05 con ácido fosfórico), solución B (acetonitrilo grado HPLC) y solución C (agua grado HPLC), aplicada a un flujo de gradiente de 1.0 ml/min.

Para cuantificar el glutamato, se generó una curva estándar usando L-glutamato a 1 mg/ml, diluido en líquido cefalorraquídeo artificial en concentraciones de 10, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml. El tiempo de retención del estándar en la columna se usó para identificar el pico de glutamato en el cromatograma, y el área bajo la curva de este pico se integro y sus valores interpolados en la curva estándar para obtener la cuantificación. Con base en esto se cuantificaron las nmol de glutamato liberadas y se dividieron entre la cantidad de proteínas cuantificada en mg/ml.

#### **9.1.5. Análisis de datos**

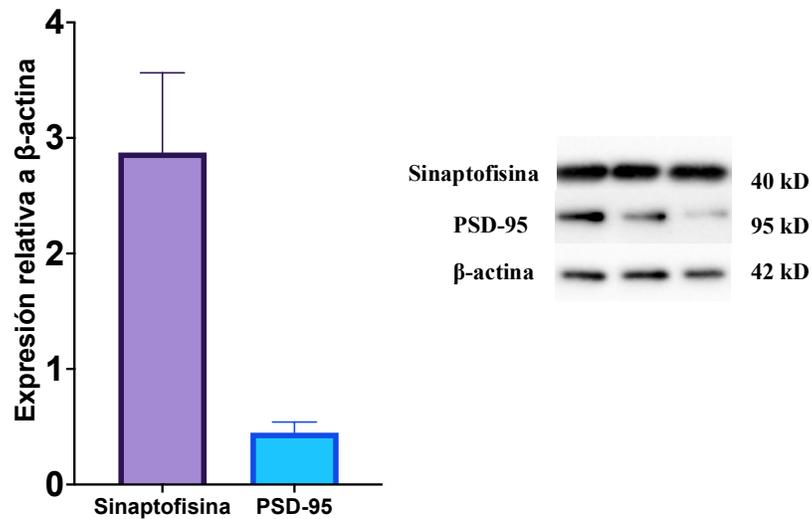
Los datos fueron analizados para identificar valores atípicos (outliers) utilizando el método ROUT, que define como atípicos aquellos puntos con baja probabilidad de pertenecer a la distribución subyacente del conjunto de datos, considerando la mediana y la dispersión relativa. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos con distribución normal, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Dunnett. En caso de que los datos no presentaran una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de Dunn. Las correlaciones entre las variables clínicas y la liberación de glutamato se analizaron mediante la prueba de Spearman. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$ .

#### **9.2. Resultados experimento 4**

Las características clínicas de los pacientes de los que se empleó tejido cerebral se presentan en la tabla 8.

### 9.2.1. Caracterización de sinaptosomas obtenidos de pacientes llevados a cirugía de epilepsia

El análisis mediante Western blot de proteínas específicas de las terminales sinápticas permitió identificar la presencia de sinaptofisina y PSD-95 en las preparaciones purificadas obtenidas del tejido de pacientes con epilepsia farmacorresistente (Figura 7). La sinaptofisina, una proteína asociada a la presinapsis, mostró niveles de expresión más altos en comparación con la PSD-95, proteína postsináptica. Estos resultados confirman que las muestras estudiadas contenían sinaptosomas.



**Figura 7.** Representación de la expresión de sinaptofisina y PSD-95 relativa a  $\beta$ -actina en terminales sinápticas aisladas de la neocorteza de pacientes con epilepsia farmacorresistente. La gráfica muestra la densidad óptica normalizada contra  $\beta$ -actina, mientras que el panel presenta Western blots representativos de tres muestras. Se observa que la sinaptofisina presenta una expresión más marcada en comparación con la PSD-95.

### 9.2.2. Liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con epilepsia farmacorresistente

En todas las muestras de sinaptosomas estudiados la liberación de glutamato inducida por alto potasio (KCl 33 mM) aumentó significativamente respecto a glutamato basal (~ 258%,  $p=0.0002$ ). Con base en la liberación de glutamato en presencia de cannabinoles, se caracterizaron 2 grupos: respuesta independiente de la concentración y respuesta bifásica.

### **9.2.3. Liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con respuesta independiente de la concentración de cannabinoles**

En este grupo, la liberación de glutamato en presencia de diferentes concentraciones no siguió un comportamiento dependiente de la concentración ( $n=7$ ). En el 57.14% de los sinaptosomas provenían de mujeres y el 42.85% de hombres sometidos a cirugía de epilepsia. La liberación basal promedio de glutamato fue de  $44.40 \pm 5.186$  nmol/mg, mientras que el estímulo con KCl 33 mM aumentó significativamente esta liberación a  $179.2 \pm 38.90$  nmol/mg (~ 224%,  $p=0.0003$  vs basal).

La incubación con cannabinoles redujo la liberación de glutamato inducida por alto KCl de manera independiente de la concentración. Con 100 nM, la liberación disminuyó a  $71.57 \pm 13.82$  nmol/mg (~ 42%,  $p=0.0025$  vs KCl 33 mM); con 1  $\mu$ M, a  $70.52 \pm 16.77$  nmol/mg (~ 41%,  $p=0.0022$  vs KCl 33 mM); y con 10  $\mu$ M, a  $70.28 \pm 15.72$  nmol/mg (~ 44%,  $p=0.0022$  vs KCl 33 mM). La mayor reducción se observó con 100  $\mu$ M, con un valor de  $48.90 \pm 8.33$  nmol/mg (~ 30%,  $p=0.0002$  vs KCl 33 mM). Finalmente, con 1 mM, la liberación se calculó en  $79.96 \pm 20.24$  nmol/mg (~ 46%,  $p=0.0058$  vs KCl 33 mM).

El análisis de correlación de Spearman permitió evaluar la relación entre las variables clínicas de los pacientes y la liberación de glutamato bajo distintas condiciones experimentales. Las correlaciones observadas fueron débiles y no significativas en su mayoría. Por ejemplo, la edad de los pacientes mostró una correlación moderada con la liberación de glutamato a 1  $\mu$ M de cannabinoles ( $r=0.5225$ ,  $p=0.1175$ ) y con 100  $\mu$ M ( $r=0.4505$ ,  $p=0.1579$ ), pero sin alcanzar significancia estadística. De manera similar, la edad de inicio de las crisis epilépticas presentó una correlación positiva con 100  $\mu$ M ( $r=0.6429$ ,

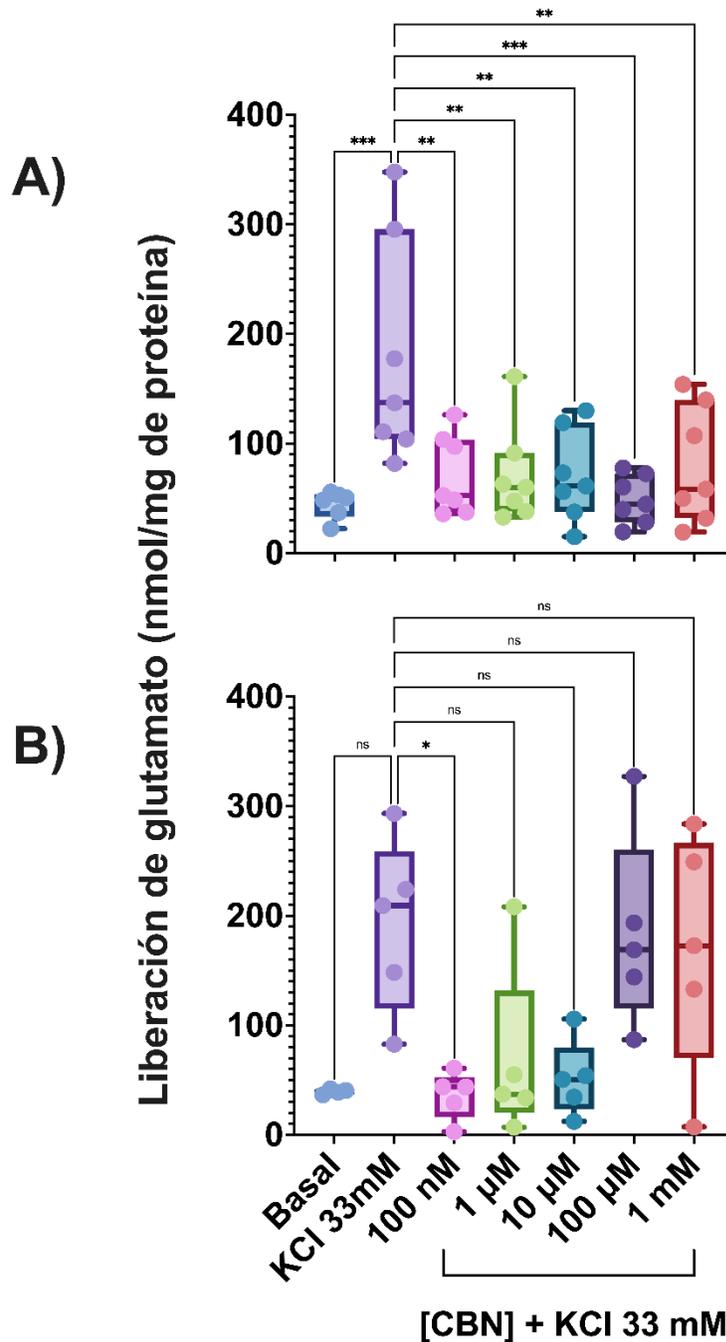
$p = 0.0694$ ), aunque también no significativa. Variables como la frecuencia de crisis epilépticas por mes, la duración de la epilepsia y el uso de medicamentos anticrisis no mostraron asociaciones relevantes ni significativas bajo ninguna de las condiciones analizadas. Esto sugiere que las características clínicas evaluadas no están relacionadas directamente con los cambios en la liberación de glutamato inducida por el cannabinoide en este modelo experimental (Ver tabla 9).

Estos hallazgos resaltan que, independientemente de la concentración, el cannabinoide reduce la liberación de glutamato en los sinaptosomas, destacándose su efecto más pronunciado con 100  $\mu\text{M}$

**Tabla 8.** Variables clínicas y caracterización de la respuesta a cannabinoil en pacientes con epilepsia farmacorresistente

HUM	Sexo	Edad (Años)	Edad de inicio de las crisis epilépticas (Años)	Duración de epilepsia (Años)	Frecuencia de crisis epilépticas (por mes)	Localización del foco	Medicamentos anti-crisis antes de la cirugía	Tipo de respuesta al CBN
HUM-206	M	11	5	6	5	Lóbulo parietal izquierdo	LEV, CBZ, OXC	Independiente de la concentración
HUM-208	H	1.9	0	1.9	150	Lóbulo temporal izquierdo	CLB, VPA, BRI, LEV, TOP, VIG	Bifásica
HUM-209	M	21	10	11	7	Lóbulo temporal izquierdo	LEV, OXC, NMP	Independiente de la concentración
HUM-210	M	30	13	17	20	Lóbulo temporal derecho	OXC, LEV, TOP	Bifásica
HUM-211	H	21	13	8	12	Lóbulo temporal derecho	LEV, VPA, PAL, OXC, ZSM	Independiente de la concentración
HUM-213	H	18	2.5	15.5	4	Lóbulo frontal izquierdo	LEV, OXC, VPA, LAC, PRG	Independiente de la concentración
HUM-214	H	2.6	1.2	1.4	10	Lóbulo frontal derecho	LEV, LAC	Independiente de la concentración
HUM-219	H	4	2.75	1.25	1	Lóbulo parietal derecho	VPA	Bifásica
HUM-220	H	27	?	?	?	Lóbulo temporal derecho	OXC, LEV, PAL, LAM	Bifásica
HUM-220	M	17	13	4	12	Lóbulo temporal derecho	LEV, OXC, CBZ,	Independiente de la concentración
HUM-221	M	23	9	9	?	Lóbulo temporal derecho	LAM, LEV	Bifásica
HUM-222	M	32	3	29	6	Lóbulo temporal derecho	LAM, LAC, BRI	Independiente de la concentración

BRI, brivaracetam; CBN, cannabinoil; CBZ, carbamazepina; CLB, clobazam; CPM, citalopram; GAB, gabapentina; H, hombre; LAC, lacosamida; LAM, lamotrigina; LEV, levetiracetam; LZM, lorazepam; M, mujer; NMP, nimodipino; OXC, oxcarbazepina; PAL, perampanel; PRG, pregabalina; TOP, topiramato; VPA, ácido valproico; VIG, vigabatrina; ZSM, zonisamida.



**Figura 7.** Representación de la liberación evocada de glutamato de sinaptosomas de pacientes llevados a cirugía de epilepsia (n=12). Las barras muestran la liberación basal de glutamato, inducida por KCl (33 mM) y modulada por distintas concentraciones de cannabinoil (CBN): 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM y 1 mM. Los datos representan la media ± error estándar de la media. La respuesta evocada se tipificó según la respuesta al tratamiento con cannabinoil. A) Respuesta independiente de la concentración de cannabinoil (n=7), Shapiro Wilk, ANOVA, pos hoc Dunnett. B) Respuesta bifásica (n=5). Shapiro Wilk, test de Kruskal Wallis, pos hoc Dunn. (\*) p < 0.05 (\*\*\*) p < 0.001, (\*\*) p < 0.01.

**Tabla 9.** Correlación entre variables clínicas y la liberación de glutamato en presencia de diferentes concentraciones de cannabinoles en tejido de pacientes responsivos al tratamiento, independientemente de la concentración.

Pacientes con respuesta independiente de la concentración								
Variable clínica		Liberación de glutamato						
		Basal	KCl 33 mM	CBN				
				100nM	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 mM
				+ KCl 33 mM				
Edad (Años)	<i>r</i> :	0.3243	0.09009	0.2703	0.5225	0.4505	0.2883	0.5406
	<i>p</i> :	0.2385	0.4298	0.2794	0.1175	0.1579	0.2687	0.1067
Duración de epilepsia (Años)	<i>r</i> :	0.07143	-0.25	0.2143	0.2857	0.4286	0.1071	0.4286
	<i>p</i> :	0.4532	0.2974	0.3308	0.278	0.1768	0.4198	0.1768
Edad de inicio de las crisis epilépticas (Años)	<i>r</i> :	0.3214	0.5357	0.4286	0.5714	0.3571	0.6429	0.3214
	<i>p</i> :	0.2488	0.1179	0.1768	0.1	0.2222	0.0694	0.2488
Frecuencia de crisis epilépticas (por mes)	<i>r</i> :	0.2703	-0.1441	-0.1081	0.03604	0.2523	-0.01802	-0.07207
	<i>p</i> :	0.2754	0.3786	0.4111	0.4746	0.2913	0.494	0.4437
Medicamentos anticrisis antes de la cirugía	<i>r</i> :	0.4009	0.2673	0.4009	0.1336	0.2673	0.5345	0.4009
	<i>p</i> :	0.2381	0.3571	0.2381	0.5	0.3571	0.1429	0.2381

Correlación de Spearman. CBN, cannabinoles; KCl, cloruro de potasio; *r*, coeficiente de correlación de Spearman; *p*, probabilidad.

#### **9.2.4. Liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con respuesta bifásica al tratamiento con cannabinoles**

En este grupo ( $n = 5$ ), el 60 % de los sinaptosomas provenían de mujeres y el 40 % de hombres sometidos a cirugía por epilepsia. La liberación basal promedio de glutamato fue de  $39.55 \pm 1.188$  nmol/mg, mientras que el estímulo con KCl 33 mM incrementó esta liberación a  $191 \pm 35.65$  nmol/mg ( $\sim 305\%$ ,  $p = 0.0730$  vs basal). La exposición al cannabinoles moduló la liberación de glutamato inducida por KCl de forma bifásica. A una concentración de 100 nM, la liberación disminuyó significativamente a  $36.13 \pm 9.695$  nmol/mg ( $\sim 24\%$ ,  $p = 0.0459$  vs KCl 33 mM). Con 1  $\mu$ M, la liberación se redujo a  $68.28 \pm 35.83$  nmol/mg ( $\sim 31\%$ ,  $p = 0.1226$  vs KCl 33 mM). La liberación de glutamato con 10  $\mu$ M de cannabinoles fue de  $51.47 \pm 15.45$  nmol/mg ( $\sim 28\%$ ,  $p = 0.1334$  vs KCl 33 mM). Por otro lado, con concentraciones de 100  $\mu$ M y 1 mM, la liberación de glutamato se mantuvo elevada, alcanzando  $184 \pm 39.90$  nmol/mg ( $\sim 98\%$ ,  $p > 0.9999$  vs KCl 33 mM) y  $169.2 \pm 48.50$  nmol/mg ( $\sim 102\%$ ,  $p > 0.9999$  vs KCl 33 mM), respectivamente. De todas las concentraciones analizadas, solo la de 100 nM alcanzó significancia estadística. Estos resultados se presentan en la Figura 7B.

El análisis de correlación de Spearman reveló asociaciones importantes entre las características clínicas de los pacientes y la liberación de glutamato. El efecto del estímulo con KCl 33 mM mostró una correlación inversa significativa con el número de medicamentos anticrisis administrados antes de la cirugía ( $r = -0.9747$ ,  $p = 0.0167$ ), lo que sugiere que un mayor número de medicamentos previos se asocia con una menor liberación de glutamato en respuesta al KCl (ver Tabla 11). Además, la liberación de glutamato en presencia de 1  $\mu$ M de cannabinoles presentó correlaciones negativas significativas con la edad de los pacientes al momento de la cirugía ( $r = -1$ ,  $p = 0.0083$ ) y con la duración de la enfermedad ( $r = -1$ ,  $p = 0.0417$ ). Estos resultados reflejan un patrón común: la disminución en la liberación de glutamato está influenciada por factores como la edad, la duración de la enfermedad y los tratamientos previos, lo que podría ser indicativo de disfunción sináptica progresiva o de adaptación farmacológica en pacientes con epilepsia refractaria al tratamiento.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el impacto del cannabinoide en la liberación de glutamato está condicionado por las características clínicas de los pacientes, subrayando la importancia de considerar factores individuales al evaluar nuevos tratamientos..

**Tabla 10.** Correlación entre variables clínicas y la liberación de glutamato en presencia de diferentes concentraciones de cannabinoil en tejido de pacientes con respuesta bifásica al tratamiento.

Pacientes con respuesta bifásica								
Variables clínicas		Liberación de glutamato						
		Basal	KCl 33 mM	CBN				
				100nM	1 μM	10 μM	100 μM	1 mM
				+ KCl 33 mM				
Edad (Años)	r:	0.5	-0.8	0.2	-1	-0.3	-0.3	-0.3
	p:	0.225	<b>0.0667</b>	0.3917	<b>0.0083</b>	0.3417	0.3417	0.3417
Duración de epilepsia (Años)	r:	0.6	-0.8	0	-1	-0.4	-0.2	-0.4
	p:	0.2083	0.1667	0.5417	<b>0.0417</b>	0.375	0.4583	0.375
Edad de inicio de las crisis epiléticas (Años)	r:	0.8	-0.4	-0.4	-0.8	0.2	0.4	0
	p:	0.1667	0.375	0.375	0.1667	0.4583	0.375	0.5417
Frecuencia de crisis epiléticas (por mes)	r:	0.5	0.5	-1	0.5	1	1	1
	p:	0.5	0.5	0.1667	0.5	0.1667	0.1667	0.1667
Medicamentos anticrisis antes de la cirugía	r:	0.0513	-0.9747	0.5643	-0.7182	-0.6669	-0.6156	-0.1026
	p:	0.5	<b>0.0167</b>	0.2	0.0833	0.1333	0.15	0.45

Correlación de Spearman. CBN, cannabinoil; KCl, cloruro de potasio; *r*, coeficiente de correlación de Spearman; *p*, probabilidad

### 9.3. Discusión

Los hallazgos más relevantes de este experimento indican que las terminales sinápticas aisladas de la neocorteza de pacientes con epilepsia farmacorresistente son susceptibles al cannabinoil. Se observaron dos tipos de respuesta. En el primer grupo, todas las concentraciones de cannabinoil redujeron significativamente la liberación de glutamato. En el segundo grupo, se evidenció una respuesta bifásica al cannabinoil: las concentraciones más bajas (100 nM – 10  $\mu$ M) disminuyeron la liberación de glutamato, mientras que las concentraciones más altas (100  $\mu$ M y 1 mM) no la modificaron. En este último grupo, los análisis de correlación revelaron tres factores se asociaron con menor liberación de glutamato: mayor ingesta en el número de medicamentos anticrisis, mayor edad y duración de la epilepsia. Estos resultados están en línea con la hipótesis propuesta y confirman que el cannabinoil reduce la liberación de glutamato en terminales sinápticas in vitro de pacientes con epilepsia farmacorresistente.

Existen diversos mecanismos a través de los cuales el cannabinoil podría reducir la liberación de glutamato. Una posibilidad es que el cannabinoil actúe sobre los receptores del sistema endocannabinoide, como el receptor CB1, que está acoplado a proteínas Gi, responsables de modular la liberación de neurotransmisores. Como se detalló en secciones previas, el Ki del cannabinoil para el receptor CB1 se ha calculado en  $168.2 \pm 32.16$  nM, lo que indica una afinidad moderada por este receptor (McPartland et al., 2007). La activación de este receptor produce una disminución en la liberación de neurotransmisores, un efecto que puede ser transitorio o prolongado en el tiempo (Kano et al., 2009).

Otra posibilidad es que el cannabinoil module la actividad mitocondrial en términos energéticos. Se ha demostrado que las mitocondrias expresan receptores CB1 (mtCB1) (Djeungoue-Petga & Hebert-Chatelain, 2017). La activación del mtCB1 desencadena una cascada de señalización intramitocondrial que inhibe la adenilil ciclasa soluble, lo que a su vez reduce la fosforilación de la proteína cinasa A, culminando en una disminución de la respiración celular, menor producción de ATP y por lo tanto menor liberación de neurotransmisores (Djeungoue-Petga & Hebert-Chatelain, 2017; Hebert-Chatelain et al., 2016). Además, hallazgos adicionales respaldan

esta hipótesis, como el aumento de aminoácidos libres tras la administración de altas concentraciones de cannabinoles. Estos aminoácidos suelen asociarse con la producción energética derivada del catabolismo proteico, en lugar de la glicólisis aeróbica que depende de la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Chousidis et al., 2020).

El cannabidiol ha demostrado su capacidad para modular canales iónicos dependientes de voltaje (Ghovanloo et al., 2018b; H.-X. B. Zhang et al., 2022). Es posible que el cannabinoles también regule estos canales, los cuales desempeñan un papel crucial en la regulación de la excitabilidad sináptica. Sin embargo, hasta la fecha, no existe evidencia experimental que respalde esta hipótesis en el caso específico del cannabinoles.

La investigación de Martínez-Aguirre y colaboradores analizó el efecto del cannabidiol en la liberación de glutamato en terminales sinápticas de pacientes con epilepsia farmacorresistente sometidos a cirugía. Entre sus hallazgos más relevantes, identificaron que el tejido de pacientes con epilepsia temporal y extratemporal puede subdividirse en dos grupos: respondedores y no respondedores al cannabidiol. En los pacientes respondedores, la liberación de glutamato disminuyó al incubarse los sinaptosomas con bajas concentraciones de cannabidiol (menos de 100  $\mu\text{M}$ ). Por el contrario, en el grupo de no respondedores, la liberación de glutamato se mantuvo alta, independientemente de la concentración de cannabidiol utilizada (Martínez-Aguirre et al., 2023).

Estos hallazgos son similares a los obtenidos en nuestro estudio, ya que también identificamos grupos diferenciados de respuesta al cannabinoles. Sin embargo, una diferencia importante radica en que, en nuestros pacientes, no se observaron terminales sinápticas que no respondieran al cannabinoles, lo que contrasta con los resultados reportados para el cannabidiol.

Otro hallazgo relevante de este experimento es que, en el grupo con respuesta bifásica al cannabinoles, se identificaron correlaciones negativas significativas entre la liberación de glutamato y variables clínicas, como la cantidad de fármacos utilizados antes de la cirugía, la edad y la duración de la enfermedad. Específicamente, una menor liberación de glutamato se asoció con un mayor uso previo de medicamentos anticrisis cuando los sinaptosomas fueron

estimulados con potasio alto. Por otro lado, la edad del paciente y una mayor duración de la enfermedad se relacionaron con una menor liberación de glutamato cuando los sinaptosomas fueron tratados con cannabino1 a una concentración de 1  $\mu$ M.

Se ha descrito que en pacientes con epilepsia existen modificaciones estructurales, como la reorganización de la arborización sináptica y el reajuste de contactos perisinápticos excitatorios e inhibitorios. No está claro si estos cambios se relacionan específicamente con la frecuencia de las crisis o con el daño causado por el estímulo epileptógeno inicial (Rossini et al., 2017, 2021). Nuestros hallazgos sugieren que la magnitud de la liberación de glutamato está en relación con características clínicas y tratamientos previos. Esto podría deberse a una disfunción sináptica progresiva, una adaptación del sistema nervioso al uso prolongado de fármacos anticrisis o el desarrollo de mecanismos compensatorios que regulan la liberación de neurotransmisores. Estudios adicionales son necesarios para determinar si las adaptaciones neurofisiológicas que ocurren con el tiempo en pacientes con epilepsia contribuyen a diferentes tipos de respuesta a fármacos, como en este caso al cannabino1.

Las implicaciones de los hallazgos obtenidos en este estudio son relevantes. En términos generales, el cannabino1 demostró ser eficaz para reducir la liberación de glutamato en concentraciones bajas. Como se discutió previamente, el aumento de la liberación de este neurotransmisor está relacionado con el inicio de las crisis epilépticas y con procesos patológicos como la excitotoxicidad y la alteración de las redes neuronales. Esto posiciona al cannabino1 como un posible agente terapéutico para prevenir dichos fenómenos. Además, la tipificación del comportamiento de la liberación de glutamato en presencia de cannabino1 (independiente de la concentración y bifásica) sugiere la existencia de fenotipos de pacientes con farmacoresistencia. Esto implica que, mientras algunos individuos podrían responder favorablemente al cannabino1, en otros podría observarse un efecto contrario. En consecuencia, se hace evidente la necesidad de profundizar en los mecanismos que determinan las diferencias fenotípicas y, a su vez, de continuar la búsqueda de tratamientos que resulten efectivos en diversas poblaciones.

Entre las limitaciones de este estudio, cabe destacar la metodología se centró en determinar el efecto neto sobre la liberación del neurotransmisor, sin examinar los mecanismos subyacentes

que podrían explicar dicho efecto. Además, no se consideró el papel de las células gliales, las cuales son fundamentales en la homeostasis de la neurotransmisión. Finalmente, los ensayos *in vitro* reflejan el impacto de una concentración específica de cannabinoles, sin embargo, desconocemos la concentración cerebral de este fármaco tras su administración en un modelo animal completo.

En conclusión, el cannabinoles resultó eficaz para disminuir la liberación de glutamato en concentraciones bajas, lo cual podría representar un efecto terapéutico potencialmente beneficioso. Se identificaron dos tipos de respuesta: independiente de la concentración y bifásica, lo que sugiere que el cannabinoles podría tener efectos positivos en algunos sujetos y efectos opuestos en otros. Por último, los análisis de correlación indicaron que las características clínicas podrían ser factores relevantes al momento de seleccionar una terapia adecuada.

## **10. CONCLUSIONES GENERALES**

Esta tesis evaluó los efectos del cannabinoles en monoterapia y en combinación en un modelo experimental de crisis convulsivas severas agudas, farmacorresistentes y en el desarrollo de farmacorresistencia. Además, determinó el efecto que tiene en la liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con epilepsia farmacorresistente. El cannabinoles en monoterapia administrado de manera subcrónica mostró una reducción significativa en el desarrollo de farmacorresistencia y una disminución discreta, pero no significativa, en la expresión de crisis convulsivas severas farmacorresistentes. Cuando se combinó con fenobarbital se aumentó el efecto anticrisis del fenobarbital en monoterapia. Además, el cannabinoles fue efectivo para reducir la liberación de glutamato en sinaptosomas de pacientes con epilepsia farmacorresistente, efecto que se relacionó con características clínicas. La variabilidad en la respuesta, especialmente con efectos bifásicos, resalta la necesidad de personalizar los tratamientos en pacientes con epilepsia farmacorresistente.

Con estos hallazgos podemos concluir que el cannabinoil puede ser un potencial fármaco para la prevención del desarrollo de farmacoresistencia, y como terapia adyuvante para el control de las crisis convulsivas severas farmacoresistentes. Sin embargo, se requieren más estudios preclínicos y clínicos para comprender mejor los mecanismos de acción del cannabinoil y su impacto sobre la función sináptica.

## 11. PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta los hallazgos previos se postulan algunas perspectivas que surgen de este trabajo:

- **Evaluar los efectos del cannabinoil en otros modelos experimentales de epilepsia y farmacoresistencia:** Ampliar la investigación hacia otros modelos experimentales de epilepsia permitirá evaluar su efectividad en un rango más amplio de condiciones. Esto también podría aportar información clave sobre su capacidad para combatir la farmacoresistencia en modelos inducidos por distintos mecanismos patológicos, ofreciendo una visión más integral de su potencial terapéutico.
- **Determinar combinaciones farmacológicas con efectos aditivos y sinérgicos:** Probar el cannabinoil en combinación con diferentes fármacos antiepilépticos permitirá identificar cuáles son susceptibles de ser potenciados en términos de eficacia. Esto podría mejorar el control de las crisis epilépticas y, al mismo tiempo, minimizar los efectos adversos asociados a los tratamientos actuales.
- **Realizar estudios clínicos en humanos:** Aunque los resultados preclínicos son prometedores, es imprescindible llevar a cabo ensayos clínicos controlados en humanos para confirmar tanto la eficacia como la seguridad del cannabinoil. Además, investigar su combinación con otros antiepilépticos, como el fenobarbital, en ensayos de fase avanzada, podría validar su uso como terapia adyuvante en epilepsia farmacoresistente.

- **Investigar mecanismos de acción específicos:** Explorar los mecanismos moleculares subyacentes al efecto del cannabinoide sobre la liberación de glutamato y su interacción con sistemas neuroquímicos clave en la epilepsia es fundamental. Estos estudios podrían identificar nuevas dianas terapéuticas y explicar los efectos bifásicos observados en algunos pacientes, facilitando un enfoque más personalizado en los tratamientos.

## 12. REFERENCIAS

- Albrecht, J., & Zielińska, M. (2017). Mechanisms of Excessive Extracellular Glutamate Accumulation in Temporal Lobe Epilepsy. *Neurochemical Research*, *42*(6), 1724–1734. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2105-8>
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., & Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *Journal of Natural Products*, *71*(8), 1427–1430. <https://doi.org/10.1021/np8002673>
- Baczynsky, W. O., & Zimmerman, A. M. (1983). Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol on the immune system in mice. I. In vivo investigation of the primary and secondary immune response. *Pharmacology*, *26*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1159/000137763>
- Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., & Jakus, R. (2007). Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, *100*(4), 857–873. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04277.x>
- 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>
- Banerjee, S. P., Snyder, S. H., & Mechoulam, R. (1975). Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *194*(1), 74–81.
- Begley, C., Wagner, R. G., Abraham, A., Beghi, E., Newton, C., Kwon, C., Labiner, D., & Winkler, A. S. (2022). The global cost of epilepsy: A systematic review and extrapolation. *Epilepsia*, *63*(4), 892–903. <https://doi.org/10.1111/epi.17165>
- Bell, G. S., Neligan, A., & Sander, J. W. (2014). An unknown quantity—the worldwide prevalence of epilepsy. *Epilepsia*, *55*(7), 958–962. <https://doi.org/10.1111/epi.12605>
- Berridge, M. J. (2014). Module 1: Introduction. *Cell Signalling Biology*, *6*, csb0001001. <https://doi.org/10.1042/csb0001001>
- Bethmann, K., Fritschy, J.-M., Brandt, C., & Löscher, W. (2008). Antiepileptic drug resistant rats differ from drug responsive rats in GABAA receptor subunit expression in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, *31*(2), 169–187. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.01.005>
- Bingaman, W. E. (2004). Surgery for focal cortical dysplasia. *Neurology*, *62*(6\_suppl\_3). <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000114508.31261.E6>
- Blevins, L. K., Bach, A. P., Crawford, R. B., Zhou, J., Henriquez, J. E., Rizzo, M. D., Sermet, S., Khan, D. M. I. O., Turner, H., Small-Howard, A. L., & Kaminski, N. E. (2022). Evaluation of the anti-inflammatory effects of selected cannabinoids and terpenes from *Cannabis Sativa* employing human primary leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, *170*, 113458. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113458>
- Blumenfeld, H. (2005). Cellular and Network Mechanisms of Spike-Wave Seizures. *Epilepsia*, *46*(s9), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00311.x>
- Boxenbaum, H. (1982). Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, *10*(2), 201–227. <https://doi.org/10.1007/BF01062336>
- Bozzi, Y., & Borrelli, E. (2013). The role of dopamine signaling in epileptogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00157>

- Burneo, J. G., Tellez-Zenteno, J., & Wiebe, S. (2005). Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. *Epilepsy Research*, *66*(1–3), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2005.07.002>
- Cabral, G. A., & Griffin-Thomas, L. (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *11*, e3. <https://doi.org/10.1017/S1462399409000957>
- Chen, X., Ma, X.-B., Zhang, Q., Yin, Q., & Li, X.-H. (2021). A Scale for Predicting the Outcomes of Patients with Epilepsy: A Study of 141 Cases. *International Journal of General Medicine, Volume 14*, 1565–1574. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S302735>
- Chousidis, I., Chatzimitakos, T., Leonardos, D., Filiou, M. D., Stalikas, C. D., & Leonardos, I. D. (2020). Cannabinol in the spotlight: Toxicometabolomic study and behavioral analysis of zebrafish embryos exposed to the unknown cannabinoid. *Chemosphere*, *252*, 126417. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126417>
- Colasanti, B. K., Craig, C. R., & Allara, R. D. (1984). Intraocular pressure, ocular toxicity and neurotoxicity after administration of cannabinol or cannabigerol. *Experimental Eye Research*, *39*(3), 251–259. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(84\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0014-4835(84)90013-7)
- Condie, R., Herring, A., Koh, W. S., Lee, M., & Kaminski, N. E. (1996). Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase-mediated Signal Transduction and Interleukin 2 (IL-2) Expression in the Murine T-cell Line, EL4.IL-2. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(22), 13175–13183. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.13175>
- 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>
- Crick, E. W., Osorio, I., Bhavaraju, N. C., Linz, T. H., & Lunte, C. E. (2007). An investigation into the pharmacokinetics of 3-mercaptopropionic acid and development of a steady-state chemical seizure model using in vivo microdialysis and electrophysiological monitoring. *Epilepsy Research*, *74*(2–3), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.02.003>
- Crippa, J. A., Guimarães, F. S., Campos, A. C., & Zuardi, A. W. (2018). Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02009>
- Das, A., Wallace, G. C., Holmes, C., McDowell, M. L., Smith, J. A., Marshall, J. D., Bonilha, L., Edwards, J. C., Glazier, S. S., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience*, *220*, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.002>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C. G., & Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *British Journal of Pharmacology*, *163*(7), 1479–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>
- Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., Scheffer, I. E., Thiele, E. A., & Wright, S. (2017). Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *376*(21), 2011–2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611618>
- Devinsky, O., Elder, C., Sivathamboo, S., Scheffer, I. E., & Koepp, M. J. (2024). Idiopathic Generalized Epilepsy. *Neurology*, *102*(3). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000208076>

- Djeungoue-Petga, M., & Hebert-Chatelain, E. (2017). Linking Mitochondria and Synaptic Transmission: The CB1 Receptor. *BioEssays*, 39(12). <https://doi.org/10.1002/bies.201700126>
- Dunkley, P. R., Jarvie, P. E., & Robinson, P. J. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nature Protocols*, 3(11), 1718–1728. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.171>
- During, M. J., & Spencer, D. D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *The Lancet*, 341(8861), 1607–1610. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5)
- Eid, T., Thomas, M., Spencer, D., Rundén-Pran, E., Lai, J., Malthankar, G., Kim, J., Danbolt, N., Ottersen, O., & de Lanerolle, N. (2004). Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *The Lancet*, 363(9402), 28–37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15166-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15166-5)
- Engel, Moshé, Galanopoulou, Stern, & Mody. (2022). *Neurobiology of the Epilepsies* (J. Engel & Solomon L. Moshé, Eds.; 3rd ed.). Wolters Kluwer.
- Enrique, A., Goicoechea, S., Castaño, R., Taborda, F., Rocha, L., Orozco, S., Girardi, E., & Bruno Blanch, L. (2017). New model of pharmacoresistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice. *Epilepsy Research*, 129, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.10.012>
- Evans, A. T., Formukong, E., & Evans, F. J. (1987). Activation of phospholipase A by cannabinoids. *FEBS Letters*, 211(2), 119–122. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81420-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81420-5)
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy—Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Seminars in Neurology*, 40(06), 617–623. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718719>
- 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>
- Farghaly, W. M. A., El-Tallawy, H. N., Rageh, T. A., Mohamed, E. M., Metwally, N. A., Shehata, G. A., Badry, R., & Abd-Elhamed, M. A. (2013). Epidemiology of uncontrolled epilepsy in the Al-Kharga District, New Valley, Egypt. *Seizure*, 22(8), 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.04.010>
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L., & Mitchell, R. L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, 48(3), 443–450.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fonseca-Barriendos, D., Frías-Soria, C. L., Pérez-Pérez, D., Gómez-López, R., Borroto Escuela, D. O., & Rocha, L. (2022). Drug-resistant epilepsy: Drug target hypothesis and beyond the receptors. *Epilepsia Open*, 7(S1). <https://doi.org/10.1002/epi4.12539>
- Franklin, A., & Stella, N. (2003). Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *European Journal of Pharmacology*, 474(2–3), 195–198. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)02074-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)02074-0)

- French, J. A., Kanner, A. M., Bautista, J., Abou-Khalil, B., Browne, T., Harden, C. L., Theodore, W. H., Bazil, C., Stern, J., Schachter, S. C., Bergen, D., Hirtz, D., Montouris, G. D., Nespeca, M., Gidal, B., Marks, W. J., Turk, W. R., Fischer, J. H., Bourgeois, B., ... Glauser, T. A. (2004). Efficacy and Tolerability of the New Antiepileptic Drugs, I: Treatment of New-Onset Epilepsy: Report of the TTA and QSS Subcommittees of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Epilepsia*, *45*(5), 401–409. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.06204.x>
- Frías-Soria, C. L., Pérez-Pérez, D., Orozco-Suárez, S., & Rocha, L. (2021). Cannabidiol modifies the seizure expression and effects of antiseizure drugs in a rat model of recurrent severe seizures. *Seizure*, *90*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.04.008>
- Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2000). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis* (3rd ed.). Swedish Pharmaceutical Press.
- Ghovanloo, M.-R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018a). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(43), 16546–16558. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004929>
- Ghovanloo, M.-R., Shuart, N. G., Mezeyova, J., Dean, R. A., Ruben, P. C., & Goodchild, S. J. (2018b). Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(43), 16546–16558. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004929>
- Gojani, E. G., Wang, B., Li, D.-P., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2023). Anti-Inflammatory Effects of Minor Cannabinoids CBC, THCV, and CBN in Human Macrophages. *Molecules*, *28*(18), 6487. <https://doi.org/10.3390/molecules28186487>
- Goldensohn, E. S., & Purpura, D. P. (1963). Intracellular Potentials of Cortical Neurons during Focal Epileptogenic Discharges. *Science*, *139*(3557), 840–842. <https://doi.org/10.1126/science.139.3557.840>
- Gundogdu Celebi, L., Sirin, N. G., Elmali, A. D., Baykan, B., Oge, A. E., & Bebek, N. (2023). Continuous theta-burst stimulation in patients with drug-resistant epilepsy: A single-blind placebo-controlled cross-over pilot study. *Neurophysiologie Clinique*, *53*(3), 102896. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2023.102896>
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., Pagano Zottola, A. C., Delamarre, A., Cannich, A., Vincent, P., Varilh, M., Robin, L. M., Terral, G., García-Fernández, M. D., Colavita, M., Mazier, W., Drago, F., Puente, N., Reguero, L., ... Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, *539*(7630), 555–559. <https://doi.org/10.1038/nature20127>
- Herring, A. C., Faubert Kaplan, B. L., & Kaminski, N. E. (2001). Modulation of CREB and NF- $\kappa$ B signal transduction by cannabiniol in activated thymocytes. *Cellular Signalling*, *13*(4), 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00145-0)
- Herring, A. C., & Kaminski, N. E. (1999). Cannabiniol-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB, cAMP response element-binding protein, and interleukin-2 secretion by activated thymocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *291*(3), 1156–1163.
- Herring, A. C., Koh, W. S., & Kaminski, N. E. (1998). Inhibition of the Cyclic AMP Signaling Cascade and Nuclear Factor Binding to CRE and  $\kappa$ B Elements by Cannabiniol, a Minimally CNS-Active Cannabinoid. *Biochemical Pharmacology*, *55*(7), 1013–1023. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00630-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00630-8)

- Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J., Sills, G. J., & Brodie, M. J. (2007). Predictors of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Research*, *75*(2–3), 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.06.003>
- Höcht, C., Lazarowski, A., Gonzalez, N. N., Mayer, M. A., Opezzo, J. A. W., Taira, C. A., & Girardi, E. (2009). Differential hippocampal pharmacokinetics of phenobarbital and carbamazepine in repetitive seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. *Neuroscience Letters*, *453*(1), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.079>
- 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>
- Hollister, L. E. (1973). Cannabidiol and cannabinol in man. *Experientia*, *29*(7), 825–826. <https://doi.org/10.1007/BF01946311>
- Howlett, A. C. (1985). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular Pharmacology*, *27*(4), 429–436.
- Hubbard, J. A., Szu, J. I., Yonan, J. M., & Binder, D. K. (2016). Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. *Experimental Neurology*, *283*, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.003>
- Jan, T.-R., Rao, G. K., & Kaminski, N. E. (2002). Cannabinol Enhancement of Interleukin-2 (IL-2) Expression by T Cells Is Associated with an Increase in IL-2 Distal Nuclear Factor of Activated T Cell Activity. *Molecular Pharmacology*, *61*(2), 446–454. <https://doi.org/10.1124/mol.61.2.446>
- Johansson, E., Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Agurell, S., Gillespie, H., & Hollister, L. E. (1987). Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabinol in man after intravenous administration and smoking. *Biological Mass Spectrometry*, *14*(9), 495–499. <https://doi.org/10.1002/bms.1200140904>
- Jones, B., & Kenward, M. G. (2014). *Design and Analysis of Cross-Over Trials*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/b17537>
- Jüttler, E., Potrovita, I., Tarabin, V., Prinz, S., Dong-Si, T., Fink, G., & Schwaninger, M. (2004). The cannabinoid dexamabinol is an inhibitor of the nuclear factor-kappa B (NF-κB). *Neuropharmacology*, *47*(4), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.05.009>
- Kalilani, L., Sun, X., Pelgrims, B., Noack-Rink, M., & Villanueva, V. (2018). The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, *59*(12), 2179–2193. <https://doi.org/10.1111/epi.14596>
- Kandel, E., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2021). *Principles of Neural Science* (Sixth). McGraw-Hill .
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiological Reviews*, *89*(1), 309–380. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2008>
- Karler, R., Cely, W., & Turkkanis, S. A. (1973). The anticonvulsant activity of cannabidiol and cannabinol. *Life Sciences*, *13*(11), 1527–1531. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(73\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(73)90141-0)
- Karniol, I. G., Shirakawa, I., Takahashi, R. N., Knobel, E., & Musty, R. E. (1975). Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabinol in man. *Pharmacology*, *13*(6), 502–512. <https://doi.org/10.1159/000136944>

- Karniol, I. G., Takahashi, R. N., & Musty, R. E. (1974). Effects of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabiniol on operant performance in rats. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 212(2), 230–237.
- 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>
- Kelly, L. A., & Butcher, R. W. (1979). Effects of delta 1-tetrahydrocannabinol on cyclic AMP in cultured human diploid fibroblasts. *Journal of Cyclic Nucleotide Research*, 5(4), 303–313.
- Klotz, U. (2007). The Role of Pharmacogenetics in the Metabolism of Antiepileptic Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 46(4), 271–279. <https://doi.org/10.2165/00003088-200746040-00001>
- Kollipara, R., Langille, E., Tobin, C., & French, C. R. (2023). Phytocannabinoids Reduce Seizures in Larval Zebrafish and Affect Endocannabinoid Gene Expression. *Biomolecules*, 13(9), 1398. <https://doi.org/10.3390/biom13091398>
- Kort, M. E., & Kym, P. R. (2012). *TRPV1 Antagonists* (pp. 57–70). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396493-9.00002-9>
- Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N., & Eaton, M. J. (2007). Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia*, 55(3), 274–281. <https://doi.org/10.1002/glia.20455>
- Kühne, F., Becker, L., Bast, T., Bertsche, A., Borggraefe, I., Boßelmann, C. M., Fahrbach, J., Hertzberg, C., Herz, N. A., Hirsch, M., Holtkamp, M., Janello, C., Kluger, G. J., Kurlemann, G., Lerche, H., Makridis, K. L., von Podewils, F., Pringsheim, M., Schubert-Bast, S., ... Kaindl, A. M. (2023). Real-world data on cannabidiol treatment of various epilepsy subtypes: A retrospective, multicenter study. *Epilepsia Open*, 8(2), 360–370. <https://doi.org/10.1002/epi4.12699>
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>
- Kwan, P., & Brodie, M. J. (2000). Early Identification of Refractory Epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 342(5), 314–319. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420503>
- Kwan, P., & Brodie, M. J. (2004). Phenobarbital for the Treatment of Epilepsy in the 21st Century: A Critical Review. *Epilepsia*, 45(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.12704.x>
- Lamar, C. (1970). MERCAPTOPROPIONIC ACID: A CONVULSANT THAT INHIBITS GLUTAMATE DECARBOXYLASE <sup>1</sup>. *Journal of Neurochemistry*, 17(2), 165–170. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1970.tb02197.x>
- LaPenna, P., & Tormoehlen, L. M. (2017). The Pharmacology and Toxicology of Third-Generation Anticonvulsant Drugs. *Journal of Medical Toxicology*, 13(4), 329–342. <https://doi.org/10.1007/s13181-017-0626-4>
- Lavender, I., McCartney, D., Marshall, N., Suraev, A., Irwin, C., D'Rozario, A. L., Gordon, C. J., Saini, B., Grunstein, R. R., Yee, B., McGregor, I., & Hoyos, C. M. (2023). Cannabiniol (CBN; 30 and 300 mg) effects on sleep and next-day function in insomnia disorder ('CUPID' study): protocol for a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over, three-

- arm, proof-of-concept trial. *BMJ Open*, 13(8), e071148. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-071148>
- Lemberger, L., & Rowe, H. (1975). Clinical pharmacology of nabilone, a cannabinol derivative. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 18(6), 720–726. <https://doi.org/10.1002/cpt1975186720>
- Loewe, S. (1945). Marihuana activity of cannabinol. *Science (New York, N.Y.)*, 102(2658), 615.
- Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020a). 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>
- Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S. M., & Vezzani, A. (2020b). 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>
- Löscher, W., & White, H. S. (2023). Animal Models of Drug-Resistant Epilepsy as Tools for Deciphering the Cellular and Molecular Mechanisms of Pharmacoresistance and Discovering More Effective Treatments. *Cells*, 12(9), 1233. <https://doi.org/10.3390/cells12091233>
- Lucke-Wold, B. P., Nguyen, L., Turner, R. C., Logsdon, A. F., Chen, Y.-W., Smith, K. E., Huber, J. D., Matsumoto, R., Rosen, C. L., Tucker, E. S., & Richter, E. (2015). Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure. *Seizure*, 33, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.10.002>
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 5(6), 472–484. <https://doi.org/10.1038/nri1632>
- MacLennan, S. J., Reynen, P. H., Kwan, J., & Bonhaus, D. W. (1998). Evidence for inverse agonism of SR141716A at human recombinant cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 124(4), 619–622. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701915>
- Maioli, C., Mattoteia, D., Amin, H. I. M., Minassi, A., & Caprioglio, D. (2022). Cannabinol: History, Syntheses, and Biological Profile of the Greatest “Minor” Cannabinoid. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(21), 2896. <https://doi.org/10.3390/plants11212896>
- Manna, S. S. S. (2022). Dual effects of anandamide in the antiepileptic activity of diazepam in pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Behavioural Pharmacology*, 33(8), 527–541. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000700>
- Mantovani-Guerreiro Marilisa, & Montovani-Guerreiro Carlos Alberto. (2014). *Tratamiento Farmacológico de las Epilpesias* (Targas-Yacubian Elsa, Contreras-Caicedo Guilca, & Ríos-Pohl Loreto, Eds.; Vol. 1). ALADE.
- Mao, L., Wang, K., Zhang, Q., Wang, J., Zhao, Y., Peng, W., & Ding, J. (2022). Felt Stigma and Its Underlying Contributors in Epilepsy Patients. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.879895>
- Marson, A. G., Al-Kharusi, A. M., Alwaidh, M., Appleton, R., Baker, G. A., Chadwick, D. W., Cramp, C., Cockerell, O. C., Cooper, P. N., Doughty, J., Eaton, B., Gamble, C., Goulding, P. J., Howell, S. J., Hughes, A., Jackson, M., Jacoby, A., Kellett, M., Lawson, G. R., ... Williamson, P. R. (2007). The SANAD study of effectiveness of valproate, lamotrigine, or topiramate for generalised and unclassifiable epilepsy: an unblinded randomised controlled trial. *The Lancet*, 369(9566), 1016–1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60461-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60461-9)
- Martínez-Aguirre, C., Márquez, L. A., Santiago-Castañeda, C. L., Carmona-Cruz, F., Nuñez-Lumbreras, M. de los A., Martínez-Rojas, V. A., Alonso-Vanegas, M., Aguado-Carrillo, G., Gómez-Viquez, N. L., Galván, E. J., Cuéllar-Herrera, M., & Rocha, L. (2023). Cannabidiol

- Modifies the Glutamate Over-Release in Brain Tissue of Patients and Rats with Epilepsy: A Pilot Study. *Biomedicines*, *11*(12), 3237. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123237>
- Matsumoto, H., & Marsan, C. A. (1964). Cellular Mechanisms in Experimental Epileptic Seizures. *Science*, *144*(3615), 193–194. <https://doi.org/10.1126/science.144.3615.193>
- McCallum, N. K. (1975). The effect of cannabinal delta1-tetrahydro-cannabinal clearance from the blood. *Experientia*, *31*(8), 957–958. <https://doi.org/10.1007/BF02358875>
- McPartland, J. M., Glass, M., & Pertwee, R. G. (2007). Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *British Journal of Pharmacology*, *152*(5), 583–593. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707399>
- Moore, C. F., Weerts, E. M., Kulpa, J., Schwotzer, D., Dye, W., Jantzi, J., McDonald, J. D., Lefever, T. W., & Bonn-Miller, M. O. (2023). Pharmacokinetics of Oral Minor Cannabinoids in Blood and Brain. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *8*(S1), S51–S61. <https://doi.org/10.1089/can.2023.0066>
- Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). *Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture* (pp. 103–131). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_4)
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, *365*(6441), 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>
- Myers, K. A. (2022). Genetic Epilepsy Syndromes. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, *28*(2), 339–362. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000001077>
- Noebels, J. L., Avoli, M., Rogawski, M. A., Vezzani, A., & Delgado-Escueta, A. V. (Eds.). (2024). *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. Oxford University Press New York. <https://doi.org/10.1093/med/9780197549469.001.0001>
- Noriega-Morales, G., & Shkurovich-Bialik, P. (2020). Situación de la epilepsia en México y América Latina. *Anales Médicos de La Asociación Médica Del Centro Médico ABC*, *65*(3), 224–232. <https://doi.org/10.35366/95680>
- Palchevskiy, S., Czarnocki-Cieciura, M., Vistoli, G., Gervasoni, S., Nowak, E., Beccari, A. R., Nowotny, M., & Talarico, C. (2023). Structure of human TRPM8 channel. *Communications Biology*, *6*(1), 1065. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05425-6>
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K., & Naik, S. (2022). Cannabis: Chemistry, extraction and therapeutic applications. *Chemosphere*, *289*, 133012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
- Pérez-Pérez, D., Castañeda-Cabral, J. L., Orozco-Suárez, S., Sotelo, J., Besio, W., & Rocha, L. (2021). Noninvasive transcranial focal stimulation affects the convulsive seizure-induced P-glycoprotein expression and function in rats. *Epilepsy & Behavior*, *115*, 107659. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107659>
- Perez-Reyes, M., Timmons, M. C., Davis, K. H., & Wall, E. M. (1973). A comparison of the pharmacological activity in man of intravenously administered delta9-tetrahydrocannabinol, cannabinal, and cannabidiol. *Experientia*, *29*(11), 1368–1369. <https://doi.org/10.1007/BF01922823>
- Pertwee, R. G. (2008a). CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. In *Cannabinoids and the Brain* (pp. 91–99). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74349-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74349-3_7)
- Pertwee, R. G. (2008b). The diverse CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, *153*(2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Perucca, E., Perucca, P., White, H. S., & Wirrell, E. C. (2023). Drug resistance in epilepsy. *The Lancet Neurology*, *22*(8), 723–734. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00151-5)

- Perucca, P., Bahlo, M., & Berkovic, S. F. (2020). The Genetics of Epilepsy. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 21(1), 205–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120219-074937>
- Perucca, P., Scheffer, I. E., & Kiley, M. (2018). The management of epilepsy in children and adults. *Medical Journal of Australia*, 208(5), 226–233. <https://doi.org/10.5694/mja17.00951>
- Petit, F., Jeantaud, B., Reibaud, M., Imperato, A., & Dubroeuq, M. C. (1998). Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sciences*, 63(1), PL1–6. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00238-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00238-0)
- Picot, M., Baldy-Moulinier, M., Daurès, J., Dujols, P., & Crespel, A. (2008). The prevalence of epilepsy and pharmacoresistant epilepsy in adults: A population-based study in a Western European country. *Epilepsia*, 49(7), 1230–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01579.x>
- Poddar, M. K., & Dewey, W. L. (1980). Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 214(1), 63–67.
- Proper, E. A., Hoogland, G., Kappen, S. M., Jansen, G. H., Rensen, M. G. A., Schrama, L. H., van Veelen, C. W. M., van Rijen, P. C., van Nieuwenhuizen, O., Gispen, W. H., & de Graan, P. N. E. (2002). Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain*, 125(1), 32–43. <https://doi.org/10.1093/brain/awf001>
- Pumroy, R. A., Samanta, A., Liu, Y., Hughes, T. E., Zhao, S., Yudin, Y., Rohacs, T., Han, S., & Moiseenkova-Bell, V. Y. (2019). Molecular mechanism of TRPV2 channel modulation by cannabidiol. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48792>
- Rao, G. K., & Kaminski, N. E. (2006). Cannabinoid-Mediated Elevation of Intracellular Calcium: A Structure-Activity Relationship. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2), 820–829. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.100503>
- Reddy, C., & Saini, A. G. (2021). Metabolic Epilepsy. *Indian Journal of Pediatrics*, 88(10), 1025–1032. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03510-w>
- Rhee, M. H., Vogel, Z., Barg, J., Bayewitch, M., Levy, R., Hanus, L., Breuer, A., & Mechoulam, R. (1997). Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylyl cyclase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(20), 3228–3233. <https://doi.org/10.1021/jm970126f>
- Rho, J. M., & Boison, D. (2022). The metabolic basis of epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 18(6), 333–347. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00651-8>
- 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*, 5(1), 36–49. <https://doi.org/10.1002/epi4.12376>
- Rodríguez-Muñoz, M., Onetti, Y., Cortés-Montero, E., Garzón, J., & Sánchez-Blázquez, P. (2018). Cannabidiol enhances morphine antinociception, diminishes NMDA-mediated seizures and reduces stroke damage via the sigma 1 receptor. *Molecular Brain*, 11(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0395-2>
- Rogawski, M. A. (2013). The intrinsic severity hypothesis of pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 54(s2), 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>
- Rossini, L., De Santis, D., Mauceri, R. R., Tesoriero, C., Bentivoglio, M., Maderna, E., Maiorana, A., Deleo, F., de Curtis, M., Tringali, G., Cossu, M., Tumminelli, G., Bramerio, M., Spreafico, R., Tassi, L., & Garbelli, R. (2021). Dendritic pathology, spine loss and synaptic reorganization in human cortex from epilepsy patients. *Brain*, 144(1), 251–265. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa387>
- Rossini, L., Garbelli, R., Gnatkovsky, V., Didato, G., Villani, F., Spreafico, R., Deleo, F., Lo Russo, G., Tringali, G., Gozzo, F., Tassi, L., & de Curtis, M. (2017). Seizure activity per se does not induce tissue damage markers in human neocortical focal epilepsy. *Annals of Neurology*, 82(3), 331–341. <https://doi.org/10.1002/ana.25005>
- Santana-Gomez, C. E., Engel, J., & Staba, R. (2022). Drug-resistant epilepsy and the hypothesis of intrinsic severity: What about the high-frequency oscillations? *Epilepsia Open*, 7(S1). <https://doi.org/10.1002/epi4.12565>
- Saxena, S., & Li, S. (2017). Defeating epilepsy: A global public health commitment. *Epilepsia Open*, 2(2), 153–155. <https://doi.org/10.1002/epi4.12010>
- Schousboe, A., Bak, L. K., & Waagepetersen, H. S. (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Frontiers in Endocrinology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00102>
- Senn, S. (2002). *Cross-over Trials In Clinical Research*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470854596>
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a005678–a005678. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
- Showalter, V. M., Compton, D. R., Martin, B. R., & Abood, M. E. (1996). Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(3), 989–999.
- Singh, A., & Trevick, S. (2016). The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurologic Clinics*, 34(4), 837–847. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.015>
- Smith, P. E. M. (2021). Initial Management of Seizure in Adults. *New England Journal of Medicine*, 385(3), 251–263. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp2024526>
- Spolski, R., Li, P., & Leonard, W. J. (2018). Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature Reviews Immunology*, 18(10), 648–659. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0046-y>
- Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in Neurosciences*, 37(5), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>
- Tallarida, R. J. (2011). Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes & Cancer*, 2(11), 1003–1008. <https://doi.org/10.1177/1947601912440575>
- Tallarida, R. J., & S. Jacob, L. (1979). *The Dose—Response Relation in Pharmacology*. Springer Nature.
- Tang, F., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2017). Drug-Resistant Epilepsy: Multiple Hypotheses, Few Answers. *Frontiers in Neurology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00301>

- Tani, H., Dulla, C. G., Huguenard, J. R., & Reimer, R. J. (2010). Glutamine Is Required for Persistent Epileptiform Activity in the Disinhibited Neocortical Brain Slice. *The Journal of Neuroscience*, *30*(4), 1288–1300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0106-09.2010>
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, *393*(10172), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
- Thornton, C., Dickson, K. E., Carty, D. R., Ashpole, N. M., & Willett, K. L. (2020). Cannabis constituents reduce seizure behavior in chemically-induced and scn1a-mutant zebrafish. *Epilepsy & Behavior*, *110*, 107152. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2020.107152>
- van Oostrum, M., Blok, T. M., Giandomenico, S. L., tom Dieck, S., Tushev, G., Fürst, N., Langer, J. D., & Schuman, E. M. (2023). The proteomic landscape of synaptic diversity across brain regions and cell types. *Cell*, *186*(24), 5411-5427.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.028>
- Velísková, J., Velísek, L., Mares, P., & Rokyta, R. (1990). Ketamine suppresses both bicuculline- and picrotoxin-induced generalized tonic-clonic seizures during ontogenesis. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *37*(4), 667–674. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90544-r](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90544-r)
- Verdijk, J. P. A. J., Pottkämper, J. C. M., Verwijk, E., van Wingen, G. A., van Putten, M. J. A. M., Hofmeijer, J., & van Waarde, J. A. (2022). Study of effect of nimodipine and acetaminophen on postictal symptoms in depressed patients after electroconvulsive therapy (SYNAPSE). *Trials*, *23*(1), 324. <https://doi.org/10.1186/s13063-022-06206-y>
- 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., Fujinami, R. S., White, H. S., Preux, P.-M., Blümcke, I., Sander, J. W., & Löscher, W. (2016). Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathologica*, *131*(2), 211–234. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1481-5>
- Wang, G.-X., Wang, D.-W., Liu, Y., & Ma, Y.-H. (2016). Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis. *International Journal of Neuroscience*, *126*(5), 385–392. <https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1038710>
- Weinshenker, D., & Szot, P. (2002). The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacology & Therapeutics*, *94*(3), 213–233. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00218-8)
- Weydt, P., Hong, S., Witting, A., Möller, T., Stella, N., & Klot, M. (2005). Cannabinol delays symptom onset in SOD1 (G93A) transgenic mice without affecting survival. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders: Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, *6*(3), 182–184. <https://doi.org/10.1080/14660820510030149>
- Whittaker, V. P. (1993). Thirty years of synaptosome research. *Journal of Neurocytology*, *22*(9), 735–742. <https://doi.org/10.1007/BF01181319>
- Wong, H., & Cairns, B. E. (2019). Cannabidiol, cannabinol and their combinations act as peripheral analgesics in a rat model of myofascial pain. *Archives of Oral Biology*, *104*, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.028>
- Yamamoto, I., Watanabe, K., Kuzuoka, K., Narimatsu, S., & Yoshimura, H. (1987). The pharmacological activity of cannabinol and its major metabolite, 11-hydroxycannabinol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *35*(5), 2144–2147. <https://doi.org/10.1248/cpb.35.2144>
- Yamaori, S., Kushihara, M., Yamamoto, I., & Watanabe, K. (2010). Characterization of major phytocannabinoids, cannabidiol and cannabinol, as isoform-selective and potent inhibitors

- of human CYP1 enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 79(11), 1691–1698.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.028>
- Yasiry, Z., & Shorvon, S. D. (2012). How phenobarbital revolutionized epilepsy therapy: The story of phenobarbital therapy in epilepsy in the last 100 years. *Epilepsia*, 53(s8), 26–39.  
<https://doi.org/10.1111/epi.12026>
- Yılmaz, Ü., Yılmaz, T. S., Dizdärer, G., Akıncı, G., Güzel, O., & Tekgül, H. (2014). Efficacy and tolerability of the first antiepileptic drug in children with newly diagnosed idiopathic epilepsy. *Seizure*, 23(4), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.12.001>
- Yoo, J. Y., & Panov, F. (2019). Identification and Treatment of Drug-Resistant Epilepsy. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25(2), 362–380.  
<https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000710>
- Zhang, H.-X. B., Heckman, L., Niday, Z., Jo, S., Fujita, A., Shim, J., Pandey, R., Al Jandal, H., Jayakar, S., Barrett, L. B., Smith, J., Woolf, C. J., & Bean, B. P. (2022). Cannabidiol activates neuronal Kv7 channels. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.73246>
- Zhang, M., Chen, T., Lu, X., Lan, X., Chen, Z., & Lu, S. (2024). G protein-coupled receptors (GPCRs): advances in structures, mechanisms and drug discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01803-6>
- 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(2), 850–857. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.098541>
- Zimmerman, S., Zimmerman, A. M., Cameron, I. L., & Laurence, H. L. (1977). delta1-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol effects on the immune response of mice. *Pharmacology*, 15(1), 10–23. <https://doi.org/10.1159/000136658>



