

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN: QUÍMICA MEDICINAL

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICONVULSIVO Y NEUROPROTECTOR DEL
AGONISTA CANNABINOIDE WIN 55,212-2 EN EL MODELO EXPERIMENTAL
DE *STATUS EPILEPTICUS* INDUCIDO POR ACIDO KAÍNICO EN RATA”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

MASHA DOLORES BURELO SEGURA

MATRÍCULA: 2182800828

COMITÉ TUTORAL

TUTOR: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

ASESOR: DRA. NORMA ANGÉLICA NOGUEZ MÉNDEZ

ASESOR: DRA. MARIA DE LOS ANGELES ARACELI DÍAZ RUÍZ

Noviembre, 2020

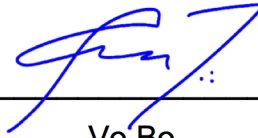
**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICONVULSIVO Y NEUROPROTECTOR DEL
AGONISTA CANNABINOIDE WIN 55,212-2 EN EL MODELO EXPERIMENTAL
DE *STATUS EPILEPTICUS* INDUCIDO POR ACIDO KAÍNICO EN RATA**

Comité tutorial



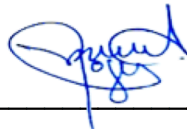
Vo.Bo

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda



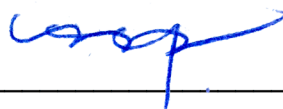
Vo.Bo

Dra. María de los Angeles Araceli Díaz Ruíz



Vo.Bo

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez



MVZ. Masha Dolores Burelo Segura

2182800828

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTICONVULSIVO Y NEUROPROTECTOR DEL
AGONISTA CANNABINOIDE WIN 55,212-2 EN EL MODELO EXPERIMENTAL
DE *STATUS EPILEPTICUS* INDUCIDO POR ACIDO KAÍNICO EN RATA**

Jurado del examen de grado



Vo.Bo Presidente

Dra. Tomasa Verónica Barón Flores



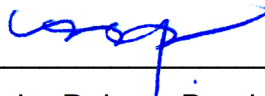
Vo.Bo Vocal

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez



Vo.Bo Secretario

Dr. Luis Antonio Tristán López



MVZ. Masha Dolores Burelo Segura

2182800828

Resumen

El *Status epilepticus* (SE) es una condición médica grave, que puede desencadenar epileptogénesis y en algunos casos conducir a la muerte del paciente. Durante el SE se producen convulsiones generalizadas continuas que resultan en daño cerebral irreversible. Por lo tanto, el uso de terapias que promuevan el cese de los eventos convulsivos y que promuevan la neuroprotección podrían reducir el impacto del SE. Según informes anteriores, el uso del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 ha demostrado un efecto neuroprotector en ratas jóvenes cuando se administra antes de inducirles el SE y también puede reducir tanto el daño celular como las convulsiones, cuando se administra 30 minutos antes del inicio de las convulsiones. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) para controlar las convulsiones y disminuir el daño neuronal ocasionado por el SE cuando es administrado una vez que se inició el SE. Los resultados mostraron una actividad eléctrica convulsiva reducida después de 1 y 2 horas después del SE inducido por la administración de ácido kaínico (KA), en los animales tratados con WIN a una dosis de 1.5 mg/Kg, mientras que la dosis de WIN a 3 mg/Kg mostró una reducción de la actividad eléctrica convulsiva a partir de las 2 h posteriores al establecimiento del SE. A las 24 h, observamos una actividad eléctrica similar al valor basal en todos los grupos que recibieron tratamiento. Por otro lado, los hallazgos obtenidos del ensayo de inmunofluorescencia con la técnica de Fluoro-Jade® B no mostró disminución en la degeneración neuronal, ya que en todos los grupos hubo un número similar de neuronas dañadas irreversiblemente, lo mismo ocurrió al evaluar la actividad de la Caspasa 8 y 3 (marcadores de muerte por apoptosis), con estos resultados podemos demostrar que el tratamiento con WIN no es neuroprotector. En conclusión, WIN controló el SE a una dosis de 1.5 mg/Kg pero no logró prevenir el daño neuronal inducido por el SE.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco donde cursé la Maestría en Ciencias Farmaceuticas. Así mismo agradezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por permitirme realizar la parte experimental de esta tesis en el Departamento de Neuroquímica, bajo la dirección del Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 706481 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Agradecimientos

A Cuche, mi perro, mi primer conejillo de indias.

A mi madre Carmen Segura, complice y amiga, quien me enseñó a ser fuerte y autosuficiente, por escucharme, entenderme y apoyar todas mis ideas descabelladas, por recordarme mis habilidades y creer en mi.

A Emma Moreno, mi terapeuta, amiga y segunda madre, por darle voz a mi conciencia y mantener mis pies en la tierra sin importar en que parte del mundo me encuentre.

A Fanny, Vane, Silvia, Beca, Aby y Lu, mis hermanas del alma; y al resto de mi gran familia californiana.

A mi padre que me cuida desde el cielo y a mis hermanos.

Al Dr. Camilo Ríos y la Dra. Araceli Díaz por apoyarme y demostrarme que se puede ser un gran investigador manteniendo humildad y profesionalismo.

Y a las ratitas que regalan su vida a la ciencia.

*Nada como una noche estrellada para comprender el hermoso
accidente que somos y el conjunto de casualidades que
seremos. Vive ahora, ama siempre.*

Abreviaturas

Δ^8 THC: Delta-8-tetrahidrocannabinol	IL: Interleucina
Δ^9 THC: Delta-9-tetrahidrocannabinol	ILAE: Liga Internacional contra la Epilepsia <i>por sus siglas en inglés</i>
2-AG: 2-araquidonilglicerol	IP ₃ : 1,4,5-inositol trifosfato
2-AGE: Éster de 2-araquidonil-glicerol o Noladina	IPI: Daño Precipitante Inicial
AC: Adenilil Ciclasa	IPSC: Corriente Inhibitoria Postsináptica
ACEA: Araquidonil-2-cloroetilamida	IPSP: Potencial Inhibitorio Postsináptico
ACPA: Araquidonil-1-ciclopropilamida	ISH: Hibridación <i>In Situ</i>
AEA: Anandamida o Araquidonoiletanolamida	KA: Ácido Kaínico
AFC: 7-amino-4-trifluorometil cumarina	KO: Knockout
AMG: Amígdala	LC: <i>Locus Coeruleus</i>
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	LCR: Líquido Cefaloraquídeo
AMPc: Monofosfato de Adenosina cíclico	LEV: Levetiracetam
ARD: Dominio Repetido de Anquirina	MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero	ME: Microscopía Electrónica
BHE: Barrera Hematoencefálica	MES: Electrochoque Máximo
CaBP: Calbindina	MGL: Lipasa de Monoacilglicerol
CB1-IR: Inmunorreactividad del Receptor CB1	mGluR: Receptor Metabotrópico de Glutamato
CB1R: Receptor Cannabinoide Tipo 1	mIPSC: Corriente Inhibitoria Postsináptica miniatura
CB2R: Receptor Cannabinoide Tipo 2	mPTP: Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial
CBZ: Carbamazepina	ms: Milisegundos
CCG: Capa Celular Granular	NAc: Núcleo <i>Accumbens</i>
CCK: Colecistoquinina	NADA: <i>N</i> -araquidonoil-dopamina
CCP: Capa de Células Piramidales	NAPE: Fosfatidiletanolamina
CME: Capa Molecular Externa	NArPE: <i>N</i> -araquidonoil fosfatidiletanolamina
CMM: Capa Molecular Media	NAT: N-acetiltransferasa
CPP: Células Piramidales Proximales	NF: Factor Nuclear
CPS: Crisis Parcial Simple	NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico
CPu: Putamen Caudado	NO: Óxido Nítrico
CRE: Crisis Recurrente Espontánea	NTS: Núcleo del Tracto Solitario
Ctx: Corteza	OAE: O-araquidonil-etanolamina o Virodamina
DAG: Diacilglicerol	OB: Bulbo Olfativo
DAGL: Lipasa de Diacilglicerol	OT: Tubérculo Olfativo
DLP: Depresión a Largo Plazo	OXC: Oxcarbazepina
DRN: Núcleo del Rafe Dorsal	PA: Potencial de Acción
DSE: Excitación Inducida por Despolarización	PAG: Sustancia Gris Periacueductal
DSI: Inhibición Inducida por Despolarización	PB: Fenobarbital
EEG: Electroencefalografía	PKA: Proteína Quinasa A
eEPSC: Corriente Excitatoria Postsináptica evocada	PLC: Fosfolipasa C
ELT: Epilepsia del Lóbulo Temporal	PLD: Fosfolipasa D
ERO: Especies Reactivas de Oxígeno	PLP: Potenciación a Largo Plazo
EPSC: Corriente Excitatoria Postsináptica	PTZ: Pentilentetrazol
EPSP: Potencial Excitatorio Postsináptico	RER: Retículo Endoplasmático Rugoso
FAAH: Amida Hidrolasa de Ácidos Grasos	ROMK: Canal de Potasio Medular Externo Renal
FAE: Fármaco Antiepiléptico	SE: <i>Status Epilepticus</i>
FBM: Felbamato	sIPSC: Corriente Inhibitoria Postsináptica espontánea
FJ: Fuoro-Jade	SNC: Sistema Nervioso Central
FLICE: Enzima Convertidora de Interleucina-1 similar a FADD	SNr: Sustancia <i>Nigra Pars Reticulata</i>
FNDC: Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro	SRED: Descargas Epiteliformes Recurrentes Espontáneas
GABA: Ácido Gamma Aminobutírico	TNF: Factor de Necrosis Tumoral
GAD: Descarboxilasa del Ácido Glutámico	PTX: Toxina <i>Pertussis</i>
GBP: Gabapentina	TPM: Topiramato
GFAP: Proteína Gliofibrilar Ácida	TRPA1: Receptor de Potencial Transitorio Anquirina 1
GIRK: Canales de Potasio Rectificados Internamente	TRPM8: Receptor de Potencial Transitorio Melastatina 8
GP: Globo Pálido	TRPV1: Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide 1
GPCR: Receptor Acoplado a Proteína G	V: Voltaje
GPR55: Receptor Acoplado a Proteína G 55	VPA: Ácido Valproico o Valproato
GTP γ S: Trifosfato de Guanosina Gamma-S	VTA: Área Tegmental Ventral

Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1 Convulsiones y Epilepsia	4
2.1.1 Convulsiones	4
2.1.2 Epilepsia	6
2.1.3 Epilepsia del Lóbulo Temporal.....	7
2.2 Elementos Cerebrales Relevantes en las Convulsiones y Epilepsia .	7
2.2.1 Neuronas	7
2.2.1.1 <i>Potencial de Acción</i>	8
2.2.1.2 <i>Transmisión Sináptica</i>	10
2.2.2 La Glía	13
2.2.3 Circuitos Neurales.....	13
2.2.4 Formación del Hipocampo	14
2.3 Epilepsia del Lóbulo Temporal	18
2.3.1 <i>Status Epilepticus</i>	19
2.3.2 Neuroinflamación y Gliosis	20
2.4 Modelos de Investigación de la Epilepsia	25
2.4.1 Modelos de Convulsiones Agudas.....	25
2.4.2 Modelos de Epilepsia <i>In Vivo</i>	26
2.4.3 Modelos de Epilepsia del Lóbulo Temporal	26
2.4.4 Modelos de Ácido Kaínico	26
2.5 Tratamientos Farmacológicos de la Epilepsia	28
2.5.1 Diazepam.....	28
2.5.2 Levetiracetam	28
2.5.3 Topiramato.....	29
2.5.4 Fenobarbital	29
2.5.5 Fenitoína	29
2.5.6 Carbamazepina.....	30
2.5.7 Oxcarbazepina.....	30

2.5.8 Gabapentina	30
2.5.9 Felbamato	30
2.5.10 Ácido Valproico.....	31
2.6 Cannabinoides	31
2.6.1 Antecedentes del Uso para la Epilepsia	31
2.6.2 Efectos Fisiológicos	35
2.6.3 Receptores y Ligandos	35
2.6.4 Endocannabinoides	37
2.6.4.1 Anandamida (AEA)	38
2.6.4.2 2-Araquidonilglicerol (2-AG).....	39
2.6.4.3 Otros	40
2.6.5 Ubicación de los Receptores	40
2.6.5.1 CB1R	40
2.6.5.2 CB2R	42
2.6.6 Plasticidad del Receptor CB1	42
2.6.7 Transducción de la Señal Mediada por el Receptor CB1	44
2.6.8 Inhibición de la Liberación de Neurotransmisores Mediada por el Receptor CB1	44
2.6.9 Señalización Retrógrada.....	46
2.6.10 Actividad Anticonvulsiva Mediada por el Receptor CB1.....	47
2.6.11 WIN 55,212-2 y Epilepsia	47
3. Hipótesis.....	50
4. Objetivos.....	50
4.1 Objetivo general	50
4.2 Objetivos particulares.....	50
5. Metodología	51
5.1 Animales.....	51
5.2 Fármacos.....	51
5.3 Modelo experimental.....	52
5.3.1 Implante de electrodos para registro del EEG	52

5.3.2	Establecimiento del <i>Status Epilepticus</i>	55
5.3.3	Grabación de video de electroencefalografía (EEG)	56
5.3.4	Ensayo histológico	57
5.3.4.1	<i>Procesamiento de muestras para el Ensayo bioquímico e histológico</i>	57
5.3.4.2	<i>Inmunofluorescencia por Fluoro-Jade® B</i>	58
5.3.4.3	<i>Conteo celular</i>	59
5.3.4.4	<i>Actividades de las Caspasas 8 y 3</i>	59
5.4	Análisis de datos y estadística	60
6.	Resultados	61
6.1	Efecto de WIN 55,212-2 en la potencia espectral y la frecuencia media de la señal del EEG, inducida por KA	61
6.2	Efecto neuroprotector de WIN 55,212-2 evaluado como el número de células degeneradas mediante la técnica de Fluoro-Jade® B	64
6.3.	Efecto antiapoptótico de WIN 55,212-2 evaluado como la actividad de las Caspasas 8 y 3 a las 24 h posteriores al tratamiento	66
7.	Discusión	68
8.	Conclusiones	72
9.	Bibliografía	73

Índice de Figuras

Figura 1.	Categorización de las convulsiones según la Liga Internacional contra la Epilepsia.....	6
Figura 2.	Esquematación de una neurona.....	8
Figura 3.	Fases del potencial de acción.....	10
Figura 4.	Diagrama de la transmisión sináptica.	11
Figura 5.	Representación de las sinapsis excitatorias e inhibitorias	12
Figura 6.	Formación del hipocampo.....	15
Figura 7.	Vías Excitatorias Principales de la Formación del Hipocampo	16
Figura 8.	Diagrama de los estratos del hipocampo de la rata.....	18
Figura 9.	El papel de las células gliales en el SNC sano y enfermo	24
Figura 10.	<i>Diginea Simplex</i>	27
Figura 11.	Cannabis en el libro <i>Pen Ts'ao</i> o <i>The Herbal</i> escrito por el Emperador Shen-Neng	32
Figura 12.	Receptores cannabinoides metabotrópicos	36
Figura 13.	Estructura química de WIN 55,212-2	37
Figura 14.	Receptores cannabinoides ionotrópicos	39
Figura 15.	Representación esquemática de las principales áreas que expresan CB1 en el cerebro del ratón	42
Figura 16.	Vías de señalización Endocannabinoide	48
Figura 17.	Vista dorsal del cráneo de una rata donde se visualiza la ubicación de las trepanaciones.	52
Figura 18.	Electrodos fabricados manualmente.....	53
Figura 19.	Colocación de electrodos en la corteza cerebral.	54
Figura 20.	Colocación de la primer capa de acrílico dental.	54
Figura 21.	Vista final del conector asegurado con acrílico dental a los tornillos de fijación.	55
Figura 22.	Registro electroencefalográfico (EEG) representativo de la corteza motora por tratamiento, en 5 períodos diferentes: Valor basal; <i>Status Epilepticus</i> (SE) 1, 2 y 24 h después de la administración del tratamiento.	62

Figura 23.	Efecto de los tratamientos sobre la adquisición del EEG. Muestra el resultado del método de la transformada de Fourier para estimar la potencia espectral total (μV^2) de la señal de EEG de los diferentes tratamientos	63
Figura 24.	Efecto de los tratamientos sobre la frecuencia del EEG (Hz)	63
Figura 25.	Micrografías representativas de las células positivas a Fluoro-Jade [®] B en la región CA3 para cada uno de los grupos a una escala de 400 μm y 200 μm	65
Figura 26.	Número de células positivas a Fluoro-Jade por mm^2	66
Figura 27.	Actividad de la Caspasa 8 en cada grupo de tratamiento.....	67
Figura 28.	Actividad de la Caspasa 3 en cada grupo de tratamiento.....	67

1. Introducción

El *status epilepticus* (SE) es una condición médica grave definida por la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) como: "una condición que resulta de la falla de los mecanismos responsables de la terminación o de los mecanismos de iniciación de la crisis, lo que conduce a crisis anormales y prolongadas. Es una afección que puede tener consecuencias a largo plazo, incluida la muerte neuronal, la lesión neuronal y la alteración de las redes neuronales, según el tipo y la duración de las convulsiones" (Blume *et al.*, 2001). De acuerdo con el meta-análisis de cuarenta y tres estudios, la tasa de incidencia anual bruta combinada, la tasa de letalidad de casos agrupada y la tasa de mortalidad anual bruta combinada para el SE fueron 12.6/100,000, 14.9% y 0.98/100,000 respectivamente (Lv *et al.*, 2017).

Durante el SE, las subunidades de "repuesto" de los receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) se mueven de los sitios subsinápticos a la membrana sináptica, causando un aumento de la excitabilidad y pueden explicar la sensibilidad a los bloqueadores del receptor de NMDA que persisten durante el SE (Chen *et al.*, 2007). La entrada de calcio después de la ocupación del receptor de NMDA puede activar varias enzimas que han sido implicadas en la muerte neuronal por apoptosis a través de la activación de caspasas, e incluso se ha reportado la muerte celular por necrosis (López-Meraz *et al.*, 2010). Así mismo, el estrés oxidativo es un mecanismo de daño presente como consecuencia del SE, por ejemplo, la acumulación de calcio mitocondrial puede a su vez resultar en un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondrial (Duan *et al.*, 2007). Finalmente, la respuesta inflamatoria es otro mecanismo involucrado en el daño después del SE (Holtman *et al.*, 2013).

Las benzodiazepinas se encuentran entre los fármacos anticonvulsivos más efectivos, de hecho, el diazepam (DZP) es el más utilizado para inhibir el SE (Chen y Wasterlain, 2006). Es altamente soluble en lípidos y penetra en el cerebro minutos después de la administración intravenosa (Walker *et al.*, 1998) actuando sobre los receptores GABA_A al aumentar la frecuencia de apertura del canal Cl⁻, ejerciendo

un efecto inhibitorio sobre las células postsinápticas (Macdonald y Greenfield, 1997). Aunque el medicamento tiene la capacidad de inhibir el SE debe administrarse en dosis altas, lo que provoca efectos adversos que pueden poner en peligro la funcionalidad del paciente y actualmente ya se han presentado casos refractarios a dicho tratamiento. Se ha observado que, en la transición de una única convulsión al SE autosostenible, los receptores GABA_A se mueven desde la membrana sináptica hasta el citoplasma, donde no tienen actividad funcional. Ese mecanismo reduce el número de receptores GABA_A disponibles para unirse a los fármacos GABA o GABAérgicos y esto podría explicar la resistencia a las benzodiazepinas (Chen *et al.*, 2007).

Para el estudio detallado del SE y la búsqueda de nuevos agentes anticonvulsivos se han desarrollado varios modelos animales de SE. La mayoría de estos modelos incluyen la administración sistémica de un producto químico convulsivo como el ácido kaínico (Diaz-Ruiz *et al.*, 2013; Lévesque y Avoli, 2013). El ácido kaínico (KA) es un análogo del glutamato (Vincent y Mulle, 2009) y es un neurotóxico 30 veces más potente que este último (Zhang y Zhu, 2011). El KA induce la excitabilidad neuronal y la despolarización de la membrana neuronal al aumentar la entrada de iones de calcio para impedir la transmisión del impulso nervioso (Ríos *et al.*, 2019).

En la búsqueda de nuevos anticonvulsivos a partir del uso de los modelos experimentales de epilepsia en ratas adultas o en cultivos primarios de hipocampo, se demostró que los cannabinoides endógenos y sintéticos atenúan la excitación neuronal y la actividad epiléptica (Shen *et al.*, 1996; Wallace *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2006; Deshpande *et al.*, 2007a; 2007b). En consecuencia, la estimulación de los receptores cannabinoides de tipo 1 (CB1R) con los endocannabinoides, anandamida o 2-araquidonilglicerol (2-AG), atenúa las convulsiones epilépticas y la pérdida de células neuronales asociadas (Deshpande *et al.*, 2007a; 2007b). Los efectos anticonvulsivos en varias estructuras se atribuyeron a la reducción de la liberación presináptica de glutamato mediante la activación de los receptores presinápticos CB1 acoplados a proteína G, un mecanismo de retroalimentación negativo (Shen y Thayer, 1999; Ameri y Simmet, 2000 Wallace *et al.*, 2001; 2002;

Freund *et al.*, 2003; Marsicano *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2006; Deshpande *et al.*, 2007b; Haj-Dahmane y Shen, 2009; Zarrindast *et al.*, 2010).

En ratas adultas, la expresión del receptor CB1 se da de forma ubicua en todo el hipocampo, la corteza frontal, los ganglios basales y el cerebelo, las regiones responsables de la susceptibilidad a las convulsiones, la función cognitiva y la coordinación motora (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992a; Köfalvi, *et al.*, 2005; Mackie, 2005).

Por otro lado, se estudian los cannabinoides sintéticos y su efecto en los eventos convulsivos, por ejemplo, un estudio demostró que el agonista cannabinoide WIN 55,212-2 tiene actividad anticonvulsiva en ratones jóvenes (20-28 días de edad) tratados con pilocarpina (Wallace *et al.*, 2001; 2002) y se han observado aumentos y disminuciones en la expresión de CB1R en ratas adultas según el área del hipocampo y el tiempo transcurrido desde la inducción del SE (Falenski *et al.*, 2007; 2009).

Dado que los cannabinoides sintéticos como el WIN 55,212-2 han demostrado tener efecto anticonvulsivo en modelos experimentales en ratas jóvenes, consideramos importante conocer si esta terapia es útil durante el SE ya que es una condición grave que puede llevar a la muerte, explorando adicionalmente si se trata también de una opción como tratamiento neuroprotector ya que tal información se desconoce hasta la fecha. Con base en esta información el objetivo de este trabajo fue evaluar dos dosis diferentes de (+ R) WIN 55,212-2 en el modelo de *status epilepticus* inducido por KA en rata.

2. Marco teórico

2.1 Convulsiones y Epilepsia

Aproximadamente 50 millones de personas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020) en todo el mundo sufren de epilepsia. Es un trastorno que se caracteriza por una predisposición a generar convulsiones y está fuertemente vinculada a la depresión, tanto como la causa fisiológica directa, como de los efectos secundarios mediados por las restricciones en el estilo de vida, vivir con el temor a las convulsiones, el deterioro intelectual, y la baja autoestima (Gilliam *et al.*, 2005). En algunos casos la única opción disponible es la cirugía altamente invasiva que a menudo involucra efectos secundarios graves como problemas con la memoria, pérdida parcial de la vista, depresión u otros problemas de humor, ya que el 30% de los pacientes son refractarios a las intervenciones farmacológicas disponibles actualmente (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020).

2.1.1 Convulsiones

Una de las primeras descripciones de una crisis se realizó hace más de 3000 años en Mesopotamia y se atribuyó al Dios de la Luna. La palabra convulsión se deriva del latín "*convulsio, convulsionis*". Hipócrates escribió el primer libro sobre las crisis epilépticas hace 2,500 años. Fue el primero que rechazó la causa divina de la enfermedad, atribuyendo las crisis al exceso de flema en el cerebro. No hubo más avances sino hasta la década de 1870 cuando un grupo de investigadores detectaron la actividad cortical durante una crisis convulsiva en animales (Yusta, 2005). En general una convulsión es un evento paroxístico que puede desencadenarse por trastornos fisiológicos (orgánicos) o psicológicos y es importante recordar que no todas las convulsiones son epilépticas. Las convulsiones que son desencadenadas por eventos fuera del cerebro, o por trastornos psicológicos, se describen como convulsiones no epilépticas. Estas incluyen, pero no se limitan a: convulsiones febriles en bebés, convulsiones hipoglucemiantes y parasomnias. Una convulsión epiléptica involucra descargas anormales de las neuronas corticales. Éstas se pueden clasificar según la

distribución anatómica del foco epileptiforme, el comportamiento o los fenómenos subyacentes al evento; por lo tanto, su clasificación precisa en ocasiones es difícil.

Una de las clasificaciones generales describe las convulsiones como parciales y generalizadas (fig. 1). Las convulsiones parciales (focales) están restringidas a un solo hemisferio, mientras que las convulsiones generalizadas afectan a ambos. Sin embargo, la distinción se difumina en casos de convulsiones parciales secundariamente generalizadas y convulsiones multifocales no generalizadas. Una crisis parcial simple (CPS) descrita por John Hughlings Jackson (1890) como una “lesión de descarga”, que a menudo puede producir un “aura”, se puede usar para predecir crisis secundarias generalizadas graves y potencialmente dañinas. El sitio del foco convulsivo dicta en gran medida la forma en que se experimenta la CPS, con un foco en el lóbulo temporal (el más común) que generalmente induce sensaciones epigástricas crecientes, sentimientos de familiaridad (*deja vu*) o falta de familiaridad (*jamaís vu*), intensos estallidos de emoción y flashbacks de memoria intensos y vívidos. Un foco en el lóbulo parietal a menudo provoca sensaciones de entumecimiento, hormigueo o ardor. En el lóbulo occipital, se puede experimentar una distorsión de la visión, luces destellantes, formas de colores y alucinaciones, mientras que, en los lóbulos frontales, se describe comúnmente una sensación similar a una “onda” que atraviesa la cabeza y el cuerpo. Las convulsiones parciales complejas (CPC) afectan áreas más extensas del cerebro, pero generalmente están restringidas a un solo hemisferio. Las CPC puede inhibir la conciencia, la capacidad de respuesta y la memoria de la convulsión. Un período de severa confusión post-ictal es a menudo difícil de separar de la propia crisis. El lóbulo temporal es el sitio más común para las CPS, donde se inducen automatismos manuales y orales (Aronica y Gorter, 2007). Las CPS en el lóbulo frontal son a menudo de menor duración y se caracterizan por la adopción de posturas extrañas de miembros, movimientos escalofriantes y una repentina recuperación post-ictal. Las convulsiones generalizadas afectan a ambos hemisferios e implican la pérdida total de la conciencia y convulsiones tónico-clónicas; mientras que las convulsiones generalizadas secundarias son en realidad convulsiones parciales que se propagan.

Si se definen las convulsiones desde la perspectiva conductual, se describen las convulsiones de ausencia (*petit mal*), que implican la pérdida temporal de la conciencia, generada por una interrupción de las vías cortico-talámicas y tálamo-corticales (Snead, 1995). Las crisis típicas de ausencia a menudo duran unos pocos segundos y pueden pasar desapercibidas. Las convulsiones tónicas, atónicas, mioclónicas y clónicas implican interrupciones en la corteza motora y producen contracción involuntaria, relajación y alternancia de los músculos. Las convulsiones tónico-clónicas (*gran mal*) involucran fases alternas de tono y clonus y generalmente resultan en la pérdida de la conciencia. Un período de 30 minutos o más de actividad de convulsiones continuas o repetitivas se clasifica como *status epilepticus* (Treiman, 1993). A partir de los distintos enfoques de clasificación, sólo el 75% de las convulsiones pueden ser clasificadas, ya que cumplen con cualquiera de los criterios mencionados.



Figura 1. Categorización de las convulsiones según la Liga Internacional contra la Epilepsia. Modificado de Fisher *et al.*, 2017.

2.1.2 Epilepsia

En lugar de un solo trastorno, “epilepsia” se refiere a un grupo diverso de síndromes con diferentes síntomas y etiologías. La epilepsia es la recurrencia de convulsiones epilépticas no provocadas, lo que implica una fisiopatología cerebral permanente

que genera la activación neuronal hipersincrónica anormal. Se clasifica según su etiología, semiología, sitio anatómico de origen de las crisis, síndrome y factor desencadenante (Fisher *et al.*, 2017).

2.1.3 Epilepsia del Lóbulo Temporal

La Epilepsia del lóbulo temporal (ELT) se describió por primera vez por John Hughlings Jackson en 1860 quien la refirió como neuronas que se activan de manera hipersincrónica y surgen de la parte uncal del lóbulo temporal. La clasificación internacional de las crisis epilépticas reemplazó este término con crisis parciales complejas en 1981 y para 1985, la ILAE clasificó la ELT como una condición caracterizada por las crisis recurrentes espontáneas (CRE) originadas en el lóbulo temporal medial o lateral (Fisher, 1989). La epileptogénesis es provocada por una alteración precipitante inicial (IPI), como una lesión cerebral traumática, una lesión cerebral isquémica o una convulsión (De Lanerolle *et al.*, 1989), involucrando una fase “latente” sin convulsiones, seguida de un periodo susceptible a las crisis recurrentes espontáneas (CRE) que en humanos puede durar años.

La ELT es la forma más común de epilepsia en adultos y se caracteriza clínicamente por convulsiones focales complejas con automatismos orales o manuales y convulsiones tónico-clónicas secundariamente generalizadas (Aronica y Gorter, 2007). Es la indicación más común para la cirugía de epilepsia, que puede implicar la resección, desconexión o estimulación del lóbulo temporal. Al ser una condición de diversas etiologías, los registros electrofisiológicos del cerebro humano durante la cirugía y la histología de los tejidos resecados han contribuido a nuestra comprensión de la enfermedad (Berg, 2008).

2.2 Elementos Cerebrales Relevantes en las Convulsiones y Epilepsia

2.2.1 Neuronas

Las neuronas son células especializadas que se encargan de la integración y transmisión de información (Hebb, 1949). La neurona consiste en dendritas, un

soma (cuerpo celular) y un axón (fig. 2). El axón arboriza y forma botones terminales en muchas otras neuronas, así como botones proximales a lo largo de él. La información se comparte entre las neuronas a través de la transmisión química en las sinapsis, y puede recorrer largas distancias mediante la progresión de los potenciales de acción (PA) a través de los axones en el SNC.

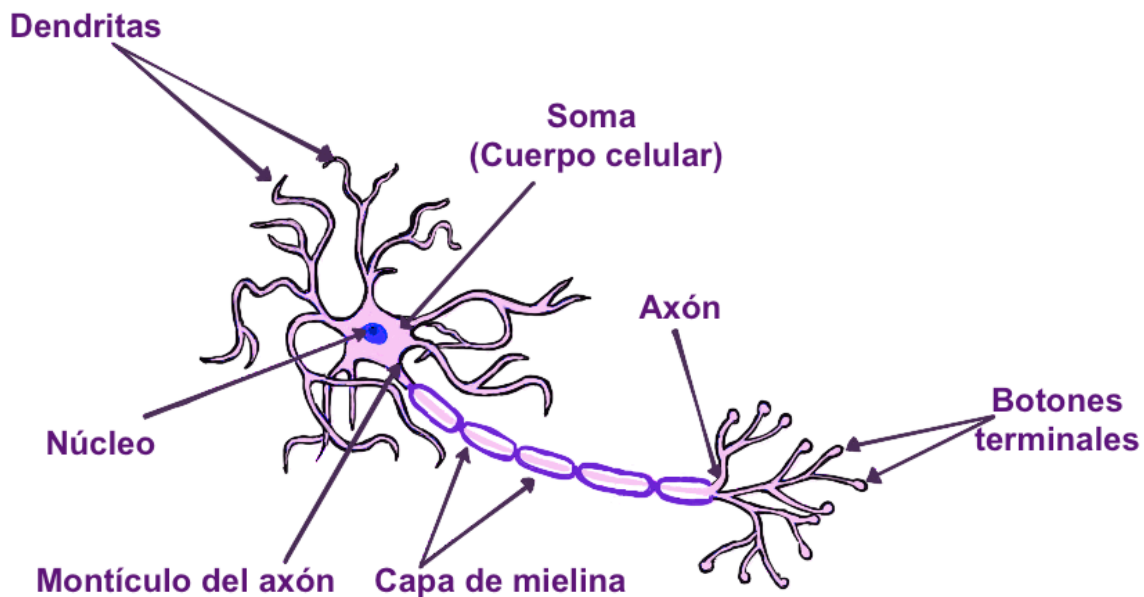


Figura 2. Esquematación de una neurona. Modificado de Babu, 2016.

2.2.1.1 Potencial de Acción

Una capa auxiliar de lípidos aislante separa al citosol del ambiente extracelular, la cual facilita la formación de un gradiente electroquímico. Este gradiente es creado y mantenido por una bomba de Na^+/K^- accionada por ATP. Así mismo, se mantiene un potencial de reposo (V_m) de alrededor de -65 mV a través de la bicapa lipídica con la acción de canales iónicos activados por voltaje en la membrana lipídica. Este potencial de membrana en reposo proporciona el almacenamiento de energía requerido para la transmisión rápida de información a través del axón mediante el potencial de acción (PA). El PA (fig. 3) se describió por primera vez en el axón gigante del calamar, por Hodgkin & Huxley en 1952, a través de cuatro artículos publicados simultáneamente en el mismo número del *Journal of Physiology*. El

potencial de membrana en las dendritas y soma, se despolariza mediante potenciales excitatorios postsinápticos (EPSP) a partir de la entrada excitatoria, típicamente mediada por glutamato en el SNC (Meldrum, 2000), e hiperpolarizado por potenciales inhibitorios postsinápticos (IPSPs) de entrada inhibitoria, típicamente mediada en el SNC por el ácido gamma-amino butírico (GABA) (Siviotti y Nistri, 1991). El potencial de membrana en esta región fluctúa de manera gradual, dependiendo de la entrada proveniente de las ramificaciones de otras neuronas.

Un PA se produce en el montículo del axón cuando el efecto neto de los EPSP y los IPSP es una despolarización más allá del potencial de umbral, que varía entre las neuronas, pero generalmente está en el rango de -40 a -55mV. La despolarización más allá del umbral conduce a la apertura de canales locales de Na^+ regulados por voltaje, despolarizando aún más la membrana y conduciendo a una cascada de afluencia de Na^+ (fase creciente), una inversión en el potencial (despolarización) que normalmente alcanza un máximo de + 40 mV. En este potencial de inversión, los canales de Na^+ se cierran, lo que impide más flujo de entrada y que se abran los canales de K^+ , lo que provoca un flujo de salida de K^+ y un retorno (repolarización) y, a menudo, un valor de potencial de membrana mucho menor (hiperpolarización). Los canales iónicos activados por voltaje, en particular los canales de Na^+ , propagan potenciales de acción a través del axón, con un alto nivel de fidelidad, hacia la terminal presináptica donde el PA se traduce en la liberación vesicular de neurotransmisores (Südhof, 1995).

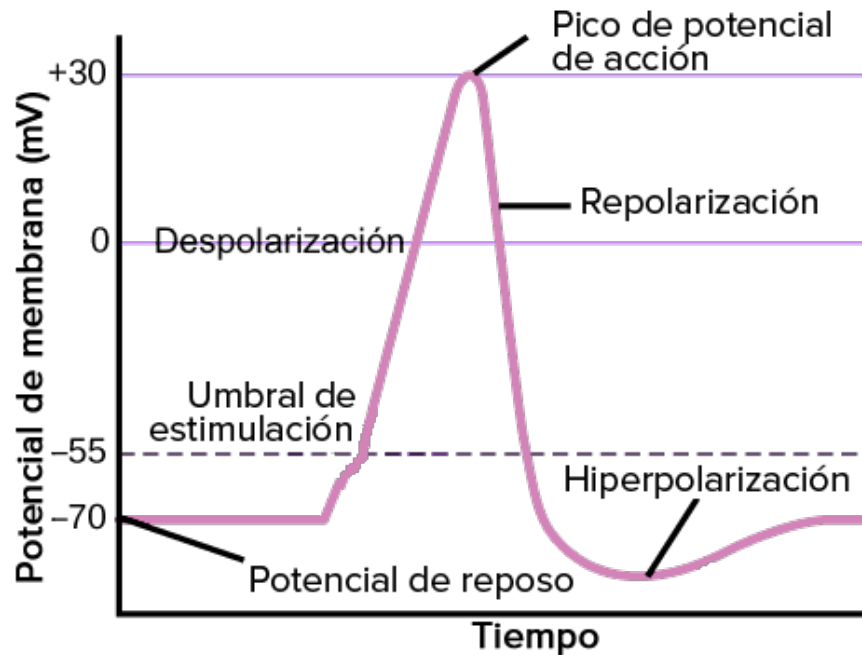


Figura 3. Fases del potencial de acción. Modificado de Gupta *et al.*, 2016.

2.2.1.2 Transmisión Sináptica

Los neurotransmisores se almacenan en grupos de vesículas sinápticas en la terminal presináptica. En nanodominios localizados, una proporción de estas vesículas sinápticas se acoplan muy cerca de una alta densidad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Zucker, 1996). Cuando un PA llega al axón, un flujo transitorio y local de Ca^{2+} interactúa con las proteínas asociadas con las vesículas y promueve la formación de un “complejo de fusión” que involucra una gran cantidad de interacciones proteína-proteína (Neher y Sakaba, 2008). Estos complejos de fusión permiten la exocitosis de neurotransmisores en la hendidura sináptica (fig. 4). Los neurotransmisores liberados en la hendidura sináptica se unen a los receptores en la terminal postsináptica, iniciando una serie de eventos (Südhof, 2004).

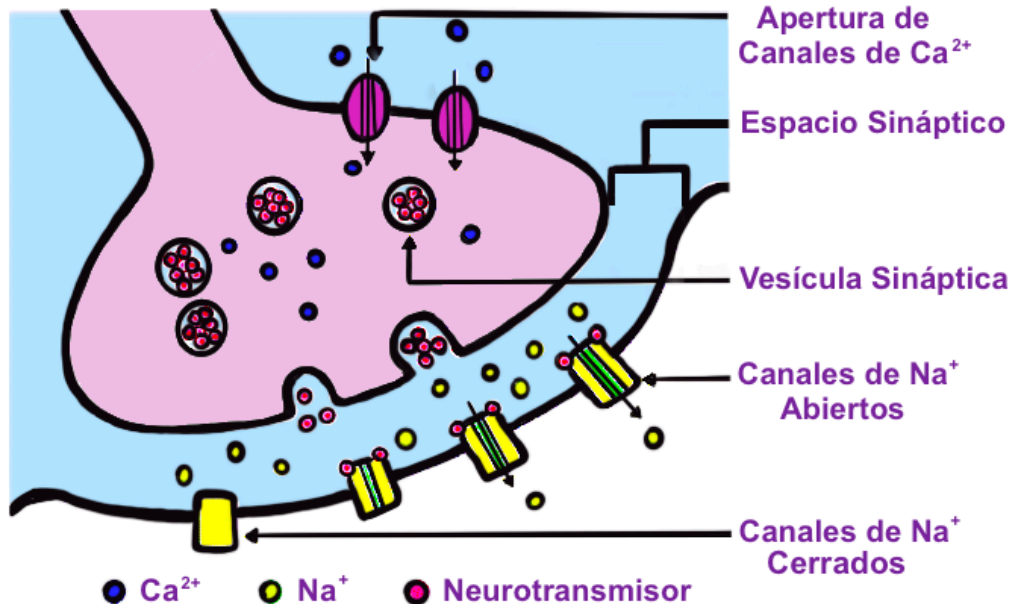


Figura 4. Diagrama de la transmisión sináptica. Modificado de Martin, 2020.

Los receptores no están restringidos a la terminal postsináptica, y muchos se encuentran en la terminal presináptica y en sitios extrasinápticos, donde generalmente desempeñan un papel regulador (Fellin *et al.*, 2004). Los receptores pueden agruparse según sean canales iónicos activados por ligando o receptores acoplados a proteínas G metabotrópicas. Los canales iónicos median respuestas rápidas y transitorias, mientras que los receptores metabotrópicos median respuestas más lentas a largo plazo, como la transcripción (Conn & Pinn, 1997).

La transmisión excitatoria e inhibitoria (fig. 5) generalmente está mediada por el glutamato y el GABA respectivamente (Bradford, 1995). Además de éstos dos aminoácidos dominantes, existe una amplia gama de neurotransmisores del SNC, incluyendo la acetilcolina (Loewi, 1921) y óxido nítrico (Bredt & Snyder, 1992), los péptidos como los opiáceos (Bell y Malick, 1976) y las monoaminas como la dopamina y la serotonina (Twarog, 1954).

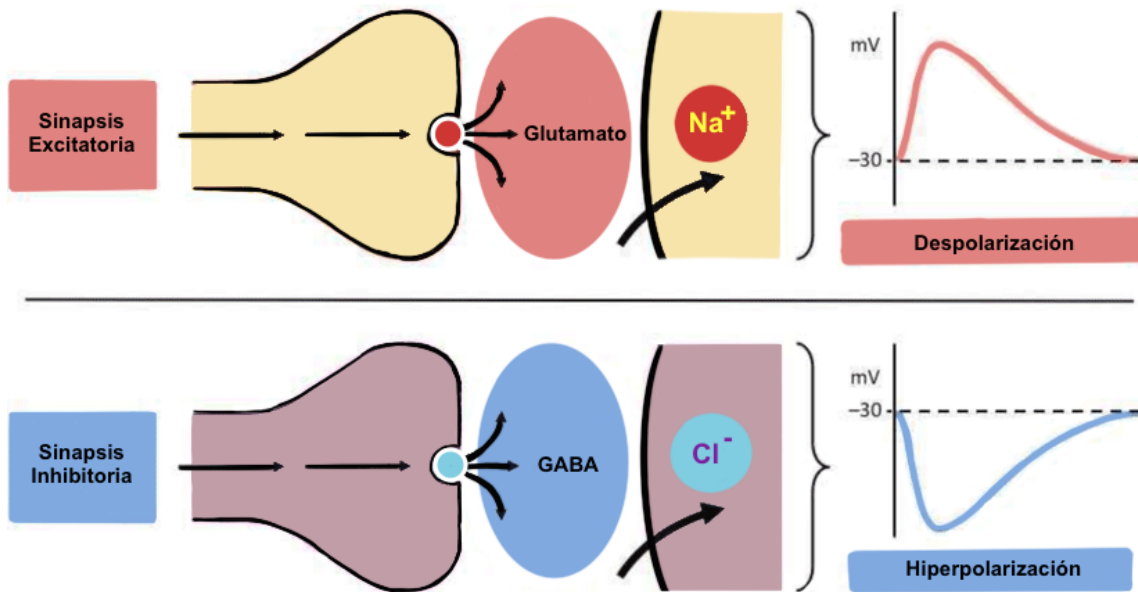


Figura 5. Representación de las sinapsis excitatorias e inhibitorias. Los cambios iónicos (Na^+ o Cl^-) conducen a la despolarización o hiperpolarización a partir de los neurotransmisores, glutamato o GABA respectivamente. Modificado de Besson, 2017.

Los receptores de glutamato se pueden agrupar en tres clases principales, nombrados de acuerdo con su afinidad a los agentes farmacológicos: Receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), receptores de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y receptores de kainato. La mayoría de los EPSP están mediados a través de los receptores AMPA, mientras que los receptores de kainato se encuentran en gran medida en los sitios extracelulares y en la terminal presináptica, donde se cree que desempeña un papel modulador (Ozawa, 1998).

El principal medio para modular la transmisión sináptica glutamatérgica es mediante cambios en la actividad y la abundancia de los receptores AMPA postsinápticos (Manilow y Malenka, 2002). El mecanismo principal para modular esto es mediante la señalización de Ca^{2+} a través del receptor NMDA, que puede inducir depresión a largo plazo (DLP) o potenciación a largo plazo (PLP) en respuesta a diferentes patrones de estimulación. El receptor NMDA funciona como un detector de coincidencia, abriendo un canal de Ca^{2+} solo cuando se activa con glutamato y la

membrana está suficientemente despolarizada para eliminar el bloqueo de Mg^{2+} en el canal (Nowak *et al.*, 1984). La permeabilidad al calcio del receptor de NMDA y su capacidad para funcionar como un detector de coincidencia le permite funcionar como un mediador clave de la plasticidad sináptica (Tsien, 2000). El influjo de Ca^{2+} a través del receptor NMDA postsináptico también puede modular la actividad en la terminal presináptica a través de la señalización retrógrada de NO (Hawkins *et al.*, 1998).

2.2.2 La Glía

Las células gliales se derivan de células inmunes, astrocitos, oligodendrocitos, células ependimales, glía radial y células NG2 (Verkhratsky y Butt, 2007). Además de proporcionar apoyo metabólico (Tsacopoulos y Magistretti, 1996), regular el desarrollo (Song *et al.*, 2002) regular el equilibrio iónico del espacio extracelular (Syková y Chvátal, 2000) y mediar la supervivencia neuronal (Vezzani *et al.*, 2008) y la apoptosis (Bal-Price & Brown, 2001), la glía también desempeña un papel en la plasticidad sináptica (Vernadakis, 1996) y la sinaptogénesis (Ullian *et al.*, 2004).

Las células gliales proporcionan un vínculo importante entre las neuronas y el sistema neurovascular, donde pueden regular la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Bannerjee & Bhat, 2007), de tal manera que están implicadas en la mediación de la respuesta neuroinflamatoria durante las convulsiones (Vezzani *et al.*, 2008).

2.2.3 Circuitos Neurales

Las convulsiones y la epilepsia suelen surgir como consecuencia de disfunciones a nivel de red. Una red compuesta de neurotransmisión excitadora glutamatérgica e inhibitoria GABAérgica, que no funciona puramente para amortiguar la actividad excitadora, pero permite la aparición de la no linealidad. Los mecanismos de alimentación hacia adelante y hacia atrás, muy dependientes de las características específicas del cableado, permiten que las redes mixtas de neuronas excitatorias e inhibitorias se autoorganicen y generen propiedades complejas (Buzsáki, 1997).

La señalización en el cerebro se lleva a cabo en el contexto de un sistema de oscilaciones anidadas, con oscilaciones a menudo de bloqueo de fase (Palva *et al.*, 2005). El hipocampo ha sido un foco para los estudios sobre mecanismos oscilatorios, la región CA3 en particular, es un importante marcapasos para generar actividad en toda la red (Ben-Ari y Cossart, 2000), lo que vincula a esta región de tal susceptibilidad a la actividad convulsiva. De hecho, muchas afecciones fisiopatológicas pueden entenderse como una “oscilopatía”, que incluye esquizofrenia, depresión y epilepsia (Uhlhaas y Singer, 2006).

Durante la función cerebral normal, las oscilaciones más lentas tienden a ser de mayor amplitud, mientras que las oscilaciones de mayor frecuencia tienden a ser de menor amplitud. Es decir, la amplitud de las oscilaciones en el cerebro es inversamente proporcional a su frecuencia. Estas dinámicas $1/f$ se denominan ruido rosa, porque cuando se observan distribuciones similares de longitudes de onda de la luz, el efecto del espectro de colores es un tono rosa (Bak *et al.*, 1987). Lo anterior nos ayuda a comprender e interpretar el EEG, por ejemplo, durante una convulsión, el ruido rosa, la dinámica $1/f$ de la actividad cerebral se interrumpe y se producen oscilaciones de mayor frecuencia en amplitudes más altas que las que están presentes durante la función cerebral normal. La gran amplitud de estas oscilaciones representa la hipsincronía patológica de las redes neuronales.

2.2.4 Formación del Hipocampo

El nombre de hipocampo fue acuñado por primera vez por el anatomista veneciano Giulio Cesare Aranzi alrededor de 1564, en referencia a su parecido con el caballito de mar. La nomenclatura que describe la anatomía del hipocampo y la formación del hipocampo (fig. 6) se confunde con frecuencia, el “hipocampo” se reserva para el hipocampo propiamente dicho, o cuerno de amon, mientras que la “formación del hipocampo” se refiere al hipocampo, el giro dentado y el subículo.

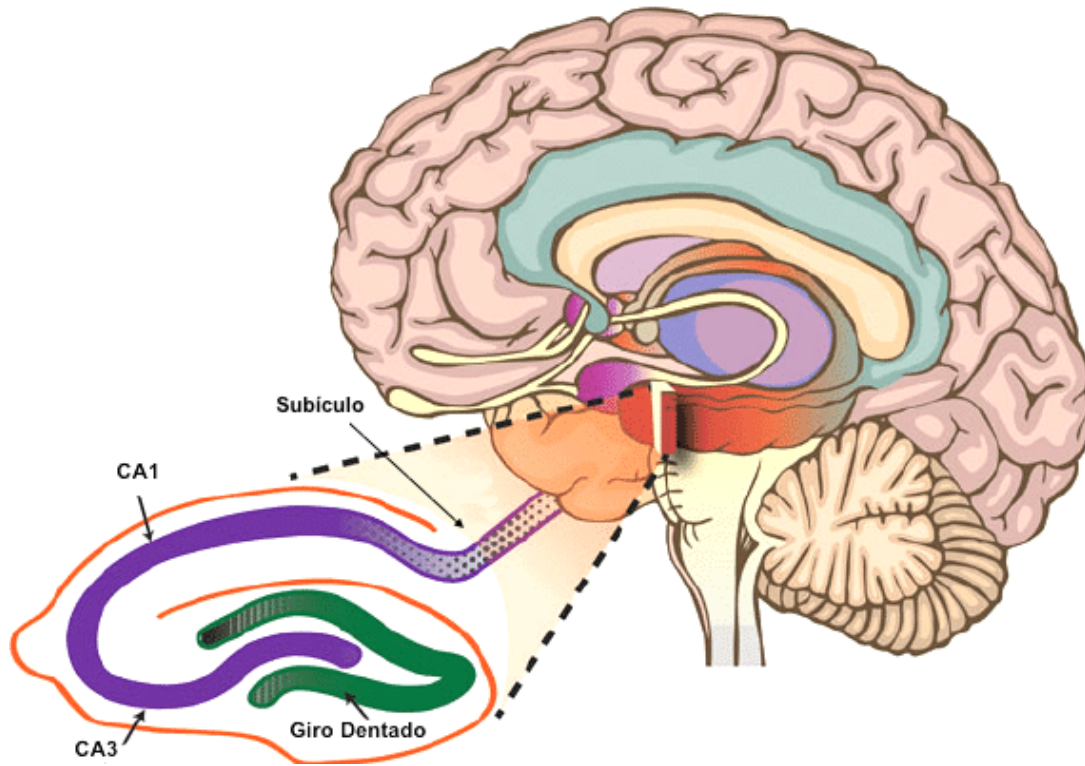


Figura 6. Formación del hipocampo. Modificado de Vineyard *et al.*, 2012.

Los circuitos de la formación del hipocampo se han visto tradicionalmente en términos de un “circuito trisináptico” excitador (fig. 7), propagado por sinapsis glutamatérgicas y modulado por una amplia gama de interneuronas inhibitorias del circuito local GABAérgico (Sik, *et al.*, 1997; McBain & Fisahn, 2001). El “circuito trisináptico” consiste en una entrada, a través de la vía perforante, desde la capa II de la corteza entorrinal, con sinapsis formadas en dendritas de células granulares dentadas en la capa molecular del giro dentado. Las proyecciones de las fibras musgosas del giro dentado forman sinapsis con las neuronas piramidales de la región CA3 en el estrato *lucidum*. Los axones de CA3 o “colaterales de Schaffer” se encuentran en el estrato *radiatum* y el estrato *lacunosum-moleculare*, donde forman sinapsis con las dendritas de células piramidales de CA1. La región CA1 envía proyecciones a la capa V de la corteza entorrinal completando el ciclo trisináptico. Si bien esta es la vía principal para la transmisión en el hipocampo, también existen otras vías, que incluyen, entre otras, una proyección desde la capa III de la corteza

entorrinal, directa a las dendritas de CA1 en el estrato *lacunosum-moleculare* y una “retroproyección” desde la región CA3 al giro dentado (Scharfman, 2007). La entrada principal al hipocampo, y por lo tanto el punto de inicio del circuito “trisináptico” es el giro dentado.

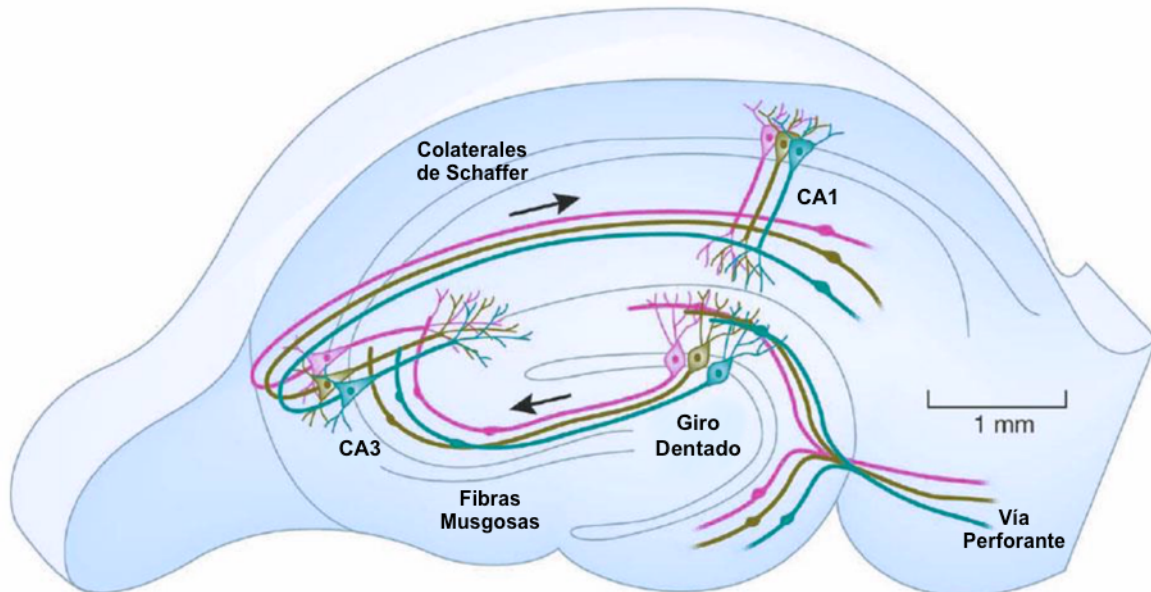


Figura 7. Vías Excitatorias Principales de la Formación del Hipocampo. Modificado de Moser, 2011.

El giro dentado es una estructura en forma de V, con los dos extremos de la V intercalados en la capa de células piramidales proximales (CPP) del hipocampo, se compone de tres capas distintas. La capa celular granular (CCG) es una capa gruesa de 4 a 8 somas de neuronas con gránulos excitadores densamente empaquetados. Superficial a la CCG esta la capa molecular, en la que se encuentra el árbol dendrítico completo de las células granulares, junto con las fibras de la vía perforante y un pequeño número de cuerpos inhibitorios de células interneuronales (Freund y Buzsáki, 1996). Subyacente a la CCG está la zona polimórfica (*hilus*) que encierra el extremo proximal de las CPP de CA3 (Freund y Buzsáki, 1996). El *hilus* alberga una variedad de cuerpos de células neuronales, que incluyen una gama de interneuronas inhibitorias y células musgosas excitatorias (Anderson *et al.*, 2006)

El axón principal de las células granulares deja la región hilar y cursa adyacente a la capa de células piramidales en el estrato *lucidum* de la región CA3, donde forman botones de paso gigantes, en las dendritas proximales de las células piramidales.

Con un extremo de su estructura intercalado entre las hojas del giro dentado encontramos el hipocampo; el cual se subdivide en regiones CA1, CA2 y CA3, con CA3 proximal al giro dentado. La organización laminar del hipocampo comprende la capa de células piramidales (CCP), que está densamente llena de neuronas piramidales excitatorias bordeadas en sus lados superficiales y profundos por el estrato *radiatum* y el estrato *oriens* respectivamente (fig. 8). En CA3, el estrato *lucidum* es un estrato delgado, que comprende la entrada de las fibras musgosas del giro dentado y separa la CCP del estrato *radiatum*.

El estrato *radiatum* contiene las fibras colaterales de Shaffer, que se proyectan desde CA3 a CA1, donde forman la tercera sinapsis en el circuito trisináptico. Tanto el estrato *radiatum* como el *oriens* contienen altas densidades de fibras asociativas, que unen a las células piramidales en el mismo subcampo y las fibras comisurales, que unen a los dos hipocampos a través de los hemisferios. Superficial al estrato *radiatum*, se encuentra el estrato *lacunosum-moleculare*, donde las fibras colaterales de Schaffer y las entradas de la vía perforante de la capa II de la corteza entorrinal terminan en las dendritas de células piramidales CA1 (Freund y Buzsáki, 1996).

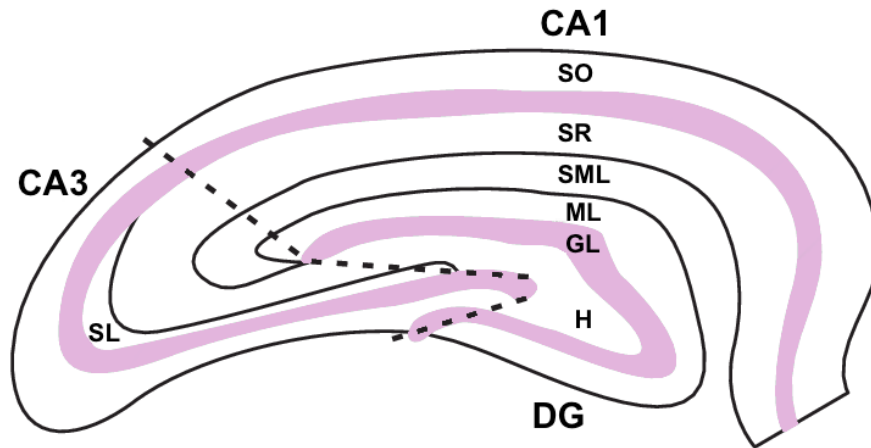


Figura 8. Diagrama de los estratos del hipocampo de la rata. La línea punteada separa la región CA1 de CA3 y CA3 del giro dentado (DG); SO - estrato *oriens*, SP – estrato piramidal, SR - estrato *radiatum*, SML - estrato *lacunosum-moleculare*, ML - capa molecular de giro dentado, GL - capa de células granulares, H - hilio de giro dentado, SL - estrato *lucidum*. Modificado de Jiang y Swann, 1997.

2.3 Epilepsia del Lóbulo Temporal

La Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT) es una epilepsia adquirida cuyas características clínicas son la susceptibilidad progresiva a las convulsiones parciales complejas y los cambios anatómicos subyacentes, como la pérdida de células neuronales y la gliosis en el hilio dentado y las regiones CA3 y CA1 del hipocampo (Bouchet y Cazauvieilh, 1825). Después de una crisis u otro IPI, una fase “latente” sin síntomas precede a la aparición de CRE que caracterizan la epilepsia crónica, lo cual es un proceso denominado epileptogénesis (De Lanerolle *et al.*, 1989). La teoría principal de la causalidad indica que las convulsiones provocan la muerte neuronal en el hipocampo y esta pérdida de células a su vez, reduce el umbral para la actividad paroxística, es decir, “las convulsiones generan convulsiones” (Gowers, 1881). Las convulsiones u otro IPI inician una respuesta inflamatoria mediada por células gliales y citocinas proinflamatorias. Esta respuesta inflamatoria, si es suficientemente grave y de duración suficiente, inicia una serie de cambios anatómicos y fisiológicos, que incluyen sinaptogénesis reactiva (Mori *et al.*,

1998), neuroinflamación (Vezzani y Granata, 2005), gliosis fibrilar, ramificación axonal aberrante (Buckmaster y Dudek, 1997), expresión alterada de los neurotransmisores y sus receptores (Koyama & Ikegaya, 2005), un patrón altamente selectivo de muerte celular neuronal (Buckmaster y Dudek, 1997) y dispersión de la capa de células granulares dentadas (Houser, 1990). Estos cambios subyacen a una alteración en la excitabilidad neuronal y la dinámica de la red, reduciendo el umbral de convulsiones y precediendo la aparición de epilepsia (Pitkänen y Lukasiuk, 2011).

La región CA3 es extremadamente densa en fibras asociativas y colaterales, por lo que se activa con un alto nivel de sincronía y se cree que funciona como un “marcapasos” para la actividad fisiológica en el hipocampo. Debido al alto nivel de interconectividad entre las neuronas principales, el hipocampo es particularmente susceptible de convertirse en un foco de actividad ictal (Dragoi y Buszaki, 2006). Después de un IPI, las neuronas en la formación del hipocampo tienen diferentes grados de susceptibilidad a la neurodegeneración, las células de la región CA2 son altamente resistentes y las células de las regiones CA3 y CA1 son las más susceptibles. Después de las convulsiones en pacientes humanos, las fibras musgosas, los axones de las células granulares dentadas que forman sinapsis en el hilio y en las células piramidales CA3 en el estrato *lucidum*, ramifican y forman conexiones aberrantes, notables en la capa molecular del giro dentado (Sutula *et al.*, 1989; Houser, 1990).

2.3.1 Status Epilepticus

Aunque la mayoría de las convulsiones son breves y no causan consecuencias a largo plazo, un subconjunto es lo suficientemente prolongado como para que puedan surgir consecuencias a largo plazo. Estas convulsiones muy prolongadas se denominan “*status epilepticus*” (SE) y se consideran una emergencia neurológica. El SE fue inicialmente definido por la Liga Internacional contra la Epilepsia como una convulsión que “persiste durante un período de tiempo suficiente o se repite con la frecuencia suficiente para que no se produzca una recuperación de la conciencia entre las convulsiones” (Lowenstein, 1998). El SE es

una emergencia tanto neurológica como médica, con un potencial de morbilidad y mortalidad significativas.

El SE ocurre cuando fallan los mecanismos que normalmente detienen una convulsión, ya sea por excitación excesiva o inhibición ineficaz. El aumento de la excitación puede ocurrir como resultado del aumento de glutamato o análogos de glutamato, o un aumento de otros aminoácidos excitadores. La disminución de la inhibición resulta de la disminución de GABA. Los receptores GABA_A cambian en número y sensibilidad durante el curso del SE (Kapur *et al.*, 1997) un fenómeno que tiene implicaciones para el tratamiento, ya que los medicamentos que actúan sobre los receptores de GABA pueden ser efectivos de manera temprana, pero no tardía, en el curso del SE. Recientemente, se ha demostrado que los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) se acumulan rápidamente y aumentan la excitación glutamatérgica durante el SE. Esto también tiene implicaciones para el tratamiento, ya que los medicamentos que antagonizan directamente a los receptores de NMDA pueden ser más efectivos en las etapas posteriores del SE (Naylor *et al.*, 2013). Existen muchos otros mecanismos que contribuyen al desarrollo y la refractariedad del SE, incluido la falla mitocondrial (Cock *et al.*, 2002), procesos inflamatorios resultando en una barrera hematoencefálica dañada (David *et al.*, 2009; Marchi *et al.*, 2011) y cambios en la expresión génica.

2.3.2 Neuroinflamación y Gliosis

La inflamación es un proceso inducido por mecanismos de inmunidad innata en respuesta a una lesión o infección con el fin de eliminar patógenos y promover la reparación de tejidos (Vezzani *et al.*, 2008), así mismo en ciertas condiciones como alergias y enfermedades autoinmunes, la inflamación contribuye al daño tisular mediante la apoptosis y la disfunción celular. Si bien el SNC es un sitio “inmuno-privilegiado”, protegido de las respuestas inmunitarias sistémicas por parte de la barrera hematoencefálica (BHE), la respuesta inflamatoria mediada por las células gliales en el SNC, desempeñan un papel importante en el desarrollo de una amplia gama de trastornos como la epilepsia (Vezzani *et al.*, 2008).

La inflamación cerebral crónica implica la activación de astrocitos, microglía, células endoteliales de la BHE, células inmunes periféricas y la producción concomitante de mediadores inflamatorios (McGeer y McGeer, 1995) como citocinas proinflamatorias. Las células gliales reactivas amplifican la señalización de las citocinas (Mrak y Griffin, 2005), tienen un efecto directo sobre la neurotransmisión anormal y la neurodegeneración que preceden a la aparición de eventos convulsivos. La proliferación extensa de glía que se produce cerca o en el sitio de la lesión (gliosis), constituye una característica patológica del tejido dañado del SNC también conocida como cicatriz glial; la cual, no solo está formada por astrocitos reactivos y microglía, sino que también se complementa con la participación de células endoteliales, fibroblastos y factores de matriz extracelular (Shapiro *et al.*, 2008). La inflamación y la gliosis también contribuyen a la degeneración de las neuronas (Glass *et al.*, 2010), la modulación directa de la transmisión sináptica y a un aumento de la permeabilidad de la BHE (De Vries *et al.*, 1997).

La manera en que la gliosis podría influir en la condición neuropatológica está determinada por la congruencia de factores específicos, como la gravedad, la duración, el tiempo después de la agresión, la ubicación del daño y los aspectos específicos de la señalización inter e intracelular (Foresti *et al.*, 2011), por ejemplo, la activación de la señalización de la glía y las citocinas son fenómenos que se refuerzan mutuamente y pueden contribuir a la muerte de las células neuronales o la neuroprotección (Vezzani *et al.*, 2008).

Aunque previamente se asumió que las citocinas estaban involucradas solo en la modulación de la inflamación en respuesta a alguna patología, se ha demostrado que muchas citocinas inflamatorias, en particular IL-1 β y TNF- α , desempeñan un papel en la función neuronal a través de la modulación de la plasticidad sináptica, la transmisión neural y la señalización de Ca²⁺ (Vitkovic *et al.*, 2000) y en el desarrollo del SNC (Stolp, 2013).

Por otro lado, los daños como lesiones traumáticas, patógenos y convulsiones cerebrales pueden inducir un aumento de la transcripción de citocinas y receptores de citocinas. Por ejemplo, después de un período de SE, la expresión de los

receptores de citocinas y la presencia de citocinas aumentan en respuesta al estrés excitotóxico. Mientras que los astrocitos y la microglía son la principal fuente de citocinas después de las convulsiones (Vezzani *et al.*, 2008), también se observa un aumento de la expresión en neuronas y células endoteliales. Las convulsiones desencadenan una respuesta inflamatoria de inicio rápido en la glía, que consiste en un aumento de las citocinas proinflamatorias prototípicas, como la interleucina-1 β 1 (IL-1 β), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Vezzani *et al.*, 2008), mientras que el receptor de la IL-1 se expresa en niveles muy elevados en las neuronas (Ravizza *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de citocinas inflamatorias puede tener efectos a largo plazo en la excitabilidad del cerebro al inducir cambios estructurales y funcionales en las redes gliales y neuronales. Por ejemplo, la IL-1 β puede activar las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las vías dependientes del factor nuclear- κ B (NF- κ B). La transcripción resultante de los genes puede conducir a la modificación de los canales iónicos y contribuir a la hiperexcitabilidad y epileptogénesis a largo plazo (Bialer & White, 2010).

La microglía se activa en respuesta a las citocinas y quimioquinas inflamatorias y a través de la señalización de ATP (Davalos *et al.*, 2005). La microglía activada migra al sitio de la lesión (Nimmerjahn *et al.*, 2005) donde puede desempeñar un papel en una variedad de procesos de importancia para la epileptogénesis, incluida la amplificación de los efectos inflamatorios o la inducción de la degeneración neuronal, así mismo dado que son células bien adaptadas para la vigilancia eficiente del parénquima, también se dedican a la detección de cuerpos extraños, lesiones celulares o infecciones (Kreutzberg, 1996). Por otro lado, los astrocitos, antes conocidos únicamente como el “pegamento” neuronal (Volterra y Meldolesi, 2005), también actúan en conjunto con la microglía para mediar la inflamación (Vezzani, 2008). La astrogliosis implica inicialmente cambios reversibles en los perfiles de expresión de los genes de astrocíticos, la proliferación y migración de los astrocitos al sitio de la lesión, junto con otros tipos de células, la reorganización de la estructura

del tejido y la deposición de una matriz extracelular de colágeno denso conduce a la formación de una cicatriz glial.

Es probable que muchas funciones de los astrocitos reactivos sean importantes para determinar la respuesta del tejido a las convulsiones. Steele y Robinson (2012) sugieren una pérdida de los fenómenos de función, donde los astrocitos activados tienen una capacidad reducida para desempeñar su papel de apoyo, lo que significa una menor captación de glutamato y una mayor exposición de las neuronas a la excitotoxicidad. Los astrocitos reactivos también tienen un efecto de ganancia de función, con la liberación de factores que estimulan la apoptosis neuronal (Haneka *et al.*, 2010), la modulación directa de las propiedades electroquímicas de las neuronas a través de la liberación de gliotransmisores, tanto en la sinapsis como en los sitios extrasinápticos y su papel en la mediación de la permeabilidad de la BHE (De Vries *et al.*, 1997) y la liberación de factores pro y antiinflamatorios (Haneka *et al.*, 2010).

Después de un daño, como una convulsión, la respuesta neuroinflamatoria resultante, la señalización de las citocinas y la actividad de las células gliales puede llevar a un aumento de la permeabilidad de la BHE y el arribo de células inflamatorias sistémicas como macrófagos y leucocitos en el parénquima cerebral, exacerbando la respuesta neuroinflamatoria. El influjo de inmunoglobulina G y albúmina en el parénquima cerebral a través de la BHE comprometida también puede exacerbar la respuesta inmune; véase la fig. 9.

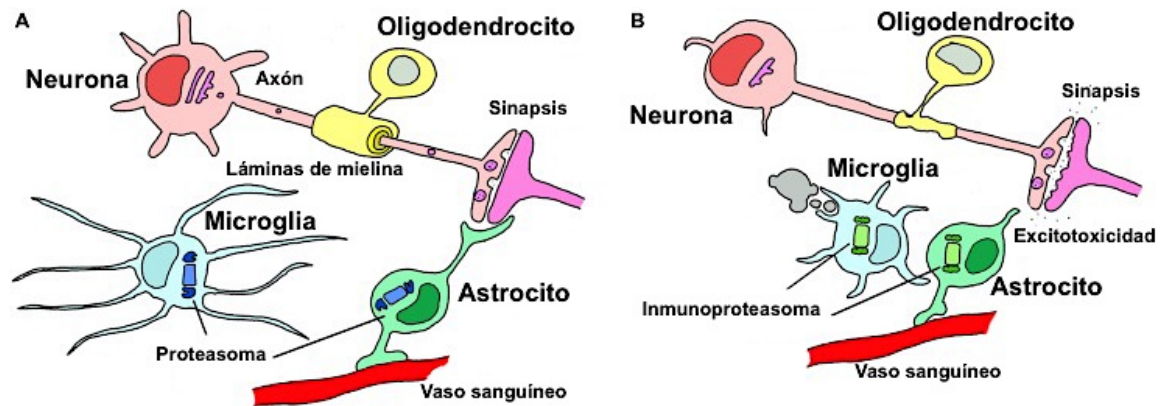


Figura 9. El papel de las células gliales en el SNC sano y enfermo. (A) En una situación saludable, los astrocitos apoyan las neuronas al filtrar los nutrientes de la sangre y modulan las sinapsis, los oligodendrocitos envuelven los axones para aislar las láminas de mielina y la microglía escanea el ambiente en busca de células muertas o patógenos invasores. (B) Durante la gliosis reactiva en enfermedades neurodegenerativas, los oligodendrocitos y los astrocitos pierden su función de soporte normal. Los astrocitos disminuyen la absorción de glutamato de la sinapsis, lo que conduce a la excitotoxicidad. La microglía se activa y fagocita las células muertas y comienza a secretar citoquinas proinflamatorias que activa a los astrocitos. Tanto los astrocitos reactivos como la microglía activada aumentan la expresión del inmunoproteasoma. En enfermedades particulares, se observa desmielinización de los axones debido a la disfunción de los oligodendrocitos. Jansen *et al.*, 2014.

Derivado de la neuroinflamación ocurre la apoptosis. La apoptosis suele ocurrir a través de la vía intrínseca y extrínseca. La primera, se inicia cuando las mitocondrias están expuestas a una sobrecarga patológica de calcio, lo que desencadena la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP), activando las caspasas iniciadoras, como la caspasa 8, que activarán posteriormente a las caspasas ejecutoras como la caspasa 3. Y la vía extrínseca, la cual es iniciada por la unión de ligandos específicos a ciertos receptores de la superficie celular llamados receptores de la muerte (receptores Fas), o el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF)-R1 (TRAIL-R1), TRAIL-R2 y TNFRp55, y está mediada por la activación directa de caspasas aguas arriba. En este sentido, la activación de la apoptosis depende de la activación inducida por TNF- α de la caspasa 8 y 3 (Ríos *et al.*, 2015).

2.4 Modelos de Investigación de la Epilepsia

Para comprender la epilepsia y encontrar nuevos tratamientos, el uso de modelos animales es crucial. Existe una amplia variedad de modelos debido a la falta de confiabilidad con la que un modelo recrea fielmente el síndrome observado en los humanos. La amplitud de los diferentes síntomas de la epilepsia requiere una variación similar en los modelos animales (Fisher, 1989) existiendo también modelos genéticos, donde la susceptibilidad a las convulsiones se puede seleccionar durante la reproducción donde se van a sobreexpresar o eliminar genes específicos (Mita *et al.*, 2001) y también existe la inducción de convulsiones en animales normales (Ben-Ari y Cossart, 2000).

Las convulsiones pueden inducirse en animales normales, tanto eléctrica o químicamente, y ya sea induciendo directamente una convulsión (Ben-Ari & Cossart, 2000), o por “kindling”; proceso donde se administran múltiples estimulaciones subconvulsivas de naturaleza eléctrica o química hasta que se produce una convulsión espontánea (Lothman *et al.*, 1985).

Los criterios para juzgar un modelo animal son los siguientes (Sarkisian, 2001):

1. Patrones electrofisiológicos similares a los observados en humanos.
2. Etiología similar.
3. El modelo debe reflejar las condiciones etarias en las que inicia en humanos.
4. El modelo debe replicar los cambios patológicos específicos observados en humanos.
5. El modelo debe responder a los FAE de manera similar a los humanos.
6. Las características de comportamiento deben reflejar las observadas en humanos.

2.4.1 Modelos de Convulsiones Agudas

Se utilizan para explorar los mecanismos neurofisiológicos que subyacen a la generación de convulsiones o para evaluar la eficacia de los fármacos

antiepilépticos. Las convulsiones parciales simples pueden inducirse eléctricamente al estimular directamente el tejido cortical (Adrian, 1936), por ejemplo, con pulsos eléctricos a través de electrodos de bola en la corteza, o mediante la administración de Pentilentetrazol (PTZ). Para las convulsiones parciales complejas, algunos modelos populares incluyen la administración de pilocarpina, toxina tetánica o KA.

2.4.2 Modelos de Epilepsia *In Vivo*

Dependiendo del tipo de estudio que se realizará dependerá el modelado, siempre siguiendo las pautas para modelos animales. Por ejemplo, las convulsiones febriles infantiles se pueden modelar exponiendo ratas y ratones neonatales a shock hipertérmico (Baram *et al.*, 1997); y las convulsiones de ausencia infantil, se modelan utilizando ratones mutantes, susceptibles de convulsiones espontáneas que imitan en gran medida las características de los eventos menores (Puranam y McNamara, 1999).

2.4.3 Modelos de Epilepsia del Lóbulo Temporal

La ELT generalmente se induce mediante un IPI, o kindling. El IPI suele ser un período de SE inducido eléctrica o químicamente (pilocarpina o KA). El kindling es un proceso mediante el cual la duración y la participación del comportamiento de las convulsiones inducidas aumentan después de inducirlas repetidamente hasta que se alcanza una meseta y, por lo tanto, la estimulación repetida reduce el umbral para que ocurran más convulsiones (Racine, 1972).

2.4.4 Modelos de Ácido Kaínico

El KA, análogo del neurotransmisor excitador glutamato, se encuentra naturalmente en las algas *Digenea simplex* (fig. 10). La planta de color rojo violáceo de la familia *Rhodomelaceae* tiene una amplia distribución mundial y se encuentra típicamente en las áreas costeras, creciendo en rocas a profundidades de alrededor de 1.5 a 7 metros. Fue en Japón donde el KA se extrajo por primera vez de *D. simplex* (Murakami *et al.*, 1953) y se descubrieron sus efectos excitotóxicos en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Dos décadas más tarde, los estudios de

Ben-Ari *et al.*, 1978 y Nadler *et al.*, 1978, demostraron de forma independiente que las inyecciones intraamigdaloides o intraventriculares de KA, podrían inducir convulsiones repetitivas y un patrón de daño neuronal que recuerda a la ELT en humanos. A partir de este punto, el KA se ha utilizado ampliamente para inducir convulsiones, particularmente en roedores, proporcionando modelos útiles tanto para las convulsiones agudas como para la ELT. Las inyecciones locales o sistémicas de ácido kaínico primero activan las neuronas piramidales de CA3 a través de los receptores de alta afinidad presentes en las fibras musgosas. La región CA3 genera corrientes glutamatérgicas controladas por red sincronizadas que se propagan a otras regiones del hipocampo a través de la activación de las sinapsis colaterales recurrentes (Ben-Ari y Cossart, 2000).



Figura 10. *Digenea Simplex*, alga ampliamente conocida como uno de los tratamientos antihelmínticos más eficientes en la medicina popular oriental. Modificado de Yoshida, 1997.

Existen tres etapas principales para un modelo de epilepsia de SE inducida por KA (Grabenstatter *et al.*, 2005): 1) Un período de SE, que suele durar varias horas, 2) Un período latente sin crisis, que suele durar varios días o semanas y 3) La aparición

gradual y aumento progresivo en la frecuencia de las crisis recurrentes espontáneas (CRE).

Por razones éticas y científicas, es una práctica común administrar diazepam (DZP) después de inducir convulsiones con KA para reducir la mortalidad, lo cual puede permitir el control experimental sobre la duración de la crisis, disminuyendo la variabilidad entre los animales.

2.5 Tratamientos Farmacológicos de la Epilepsia

Ya que los agentes etiológicos de la epilepsia son tantos, muchos de los tratamientos disponibles abordan los síntomas en lugar de las causas. Los agentes farmacológicos que aumentan el umbral de convulsiones tienen invariablemente efectos secundarios significativos en la actividad cerebral normal, las condiciones que están bien controladas a menudo se vuelven refractarias al tratamiento, e incluso cuando un programa de tratamiento es efectivo, la razón del éxito a menudo no está clara. Los fármacos antiepilépticos (FAE) suelen dirigirse a los canales iónicos, a los transportadores de neurotransmisores, a las enzimas metabólicas neurotransmisoras, a los canales de iones regulados por voltaje, a mejorar la inhibición sináptica o a inhibir la excitación sináptica. A continuación, describiremos brevemente los FAE más comunes.

2.5.1 Diazepam

El diazepam se administra a menudo en la clínica para detener el SE en situaciones de emergencia, en lugar de controlar la epilepsia crónica. Han reemplazado en gran medida a los barbitúricos porque son medicamentos más seguros con menos riesgo de sobredosis. El diazepam y otras benzodiazapinas también son agonistas de GABA y mejoran el impulso inhibitorio al unirse al receptor GABA_A en un sitio diferente al de los barbitúricos (Walker *et al.*, 1998).

2.5.2 Levetiracetam

El levetiracetam (LEV) a diferencia de la mayoría de los FAE, no parece funcionar a través de la mediación de la inhibición GABAérgica, o al actuar en canales de Ca^{2+} de tipo T o Na^+ regulados por voltaje (Rigo *et al.*, 2002), sin embargo, hay algunas pruebas que respaldan la idea de que funciona al mediar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular a través de los efectos en los receptores de rianodina e IP_3 (Nagarkatti *et al.*, 2008) y en los canales ROMK1 mediante la modulación de la fosforilación por la proteína quinasa A (Lee *et al.*, 2008). Se utiliza como terapia complementaria para pacientes refractarios a otros regímenes de tratamiento terapéutico.

2.5.3 Topiramato

El topiramato (TPM) tiene un complejo mecanismo de acción incluida la inhibición de las corrientes evocadas de kainato, la mejora de las corrientes provocadas por GABA, el bloqueo de los canales Na^+ regulados por voltaje, el bloqueo de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje y la inhibición de la isoenzima anhidrasa carbónica.

Se utiliza como complemento de la monoterapia en pacientes con epilepsia parcial refractarios a otros regímenes de tratamiento farmacológico (Walker y Sander, 1996).

2.5.4 Fenobarbital

Los barbitúricos como el fenobarbital (PB), fueron tratamientos populares para la epilepsia de *gran mal*, pero ya que tienen una gran acción sedante se utiliza principalmente para emergencias en el control de SE. PB como todos los barbitúricos es un agonista de GABA, con una alta afinidad por el receptor GABA_A . El sitio de unión es distinto del sitio de unión del propio GABA y del sitio de unión de las benzodiazepinas (Sofia y Barry, 1977).

2.5.5 Fenitoína

La fenitoína es poco utilizada actualmente, aunque representa un tratamiento de emergencia para detener el SE. La fenitoína antagoniza los potenciales de acción

dependientes del calcio, las corrientes de calcio y los flujos de calcio, retrasa o reduce las corrientes de K^+ dependientes del voltaje y aumenta las respuestas postsinápticas a GABA (Lees y Leach, 1993).

2.5.6 Carbamazepina

La carbamazepina (CBZ) si bien puede controlar las convulsiones secundarias generalizadas, la CBZ puede exacerbar los síntomas de la epilepsia de ausencia. Tiene una vida media corta y, por lo tanto, debe administrarse regularmente (4 veces al día) o administrarse en una formulación de liberación controlada (Bonneto *et al.*, 1993). El principal mecanismo de acción de la CBZ es el bloqueo de los canales de Na^+ regulados por voltaje y la consecuente disminución de la entrada de Na^+ en las neuronas (Willow *et al.*, 1985).

2.5.7 Oxcarbazepina

La oxcarbazepina (OXC) es un análogo de la CBZ. El mecanismo de acción es similar al de CBZ; sin embargo, el bloqueo de los canales de Na^+ se produce en concentraciones mucho más bajas (McLean, 2002). La OXC se puede combinar más eficazmente con otros FAE que la CBZ ya que se asocia con menos efectos secundarios adversos.

2.5.8 Gabapentina

La gabapentina (GBP), es un tratamiento eficaz contra las convulsiones parciales y secundariamente generalizadas en muchos pacientes, sin embargo, es ineficaz en las convulsiones generalizadas y en las crisis de ausencia; es ampliamente utilizada ya que se asocia con una baja incidencia de efectos adversos graves y no se ha asociado con toxicidad hepática o de médula ósea (Ojemann *et al.*, 1992). Su mecanismo de acción no se comprende completamente y aunque tiene similitudes estructurales con GABA, no se cree que funcione como un agonista gabaérgico. Sin embargo, se cree que desempeña un papel en la modulación del metabolismo de GABA y de los aminoácidos excitadores en el SNC (Errante *et al.*, 2003).

2.5.9 Felbamato

El felbamato (FBM), se utiliza como terapia de último recurso para pacientes que presentan epilepsia parcial refractaria y para controlar el síndrome de Lennox-Gastaut grave. Se usa comúnmente como monoterapia, debido a la toxicidad de médula ósea y hepática grave y a los efectos secundarios relacionados con su interacción con otros FAE, como vómitos, insomnio, náuseas y dolor de cabeza (Leppik *et al.*, 1991). Parece funcionar tanto al mejorar la transmisión GABAérgica como a la inhibición de los efectos excitadores del aspartato (Rho *et al.*, 1994).

2.5.10 Ácido Valproico

El ácido valproico o valproato (VPA) de manera similar a la GBP, tiene un efecto simultáneo de regulación al alza de la síntesis de GABA, al tiempo que regula a la baja la síntesis de aspartato (Johannessen, 2000), pero también puede inhibir la activación de alta frecuencia de neuronas al bloquear los canales de Na⁺ regulados por voltaje y actuar disminuyendo la potenciación de la transmisión excitatoria en el receptor NMDA (Griffith & Taylor, 1988). Es el FAE más comúnmente utilizado en el tratamiento de la epilepsia generalizada y también se usa contra las crisis de ausencia de epilepsia parcial y las crisis mioclónicas (Johannessen, 2000).

2.6 Cannabinoides

2.6.1 Antecedentes del Uso para la Epilepsia

El potencial de los cannabinoides como tratamiento anticonvulsivo ha sido apreciado durante siglos. El primer registro que se tiene sobre el uso de cannabis con fines medicinales, es de hace 5000 años en China, donde se utilizaba como tratamiento para la constipación, dolor reumatoide, partos y analgesia en general (Mechoulam, 2005). En 1464, el poeta Ali Ben Makki visitó al hijo epiléptico de un vigilante en Bagdad y mediante el uso de hachís curó por completo al paciente Zahir-ad-din Muhammed; sin embargo, este tipo de tratamiento generó dependencia en el paciente (Rosenthal, 1971).



Figura 11. Cannabis en el libro *Pen Ts'ao* o *The Herbal* escrito por el Emperador Shen-Neng compilado de las tradiciones chinas que datan del año 2700 AC (Zuardi, 2006).

En el sudeste asiático, se ha estimado el inicio del consumo de marihuana para tratar las convulsiones desde el siglo XVI (Mechoulam, 1986). En 1843, el científico irlandés W.B. O'Shaughnessy publicó observaciones sobre los beneficios terapéuticos del cannabis en la India, incluida la “interrupción de la tendencia convulsiva”; También informó que la administración oral de marihuana bloqueó las convulsiones tetánicas recurrentes en un bebé de 40 días de edad (O'Shaughnessy, 1843). Sin embargo, en 1890, J. Russel Reynolds, médico personal de la reina Victoria, informó que si bien el cannabis “era muy útil para las crisis convulsivas epilépticas violentas, era absolutamente inútil para las crisis de epilepsia de *petit mal*” (Reynolds, 1890). Cincuenta años más tarde, se documentó el efecto anticonvulsivo de los extractos de cannabis en el modelo de electroshock máximo (MES) en ratón (Loewe y Goodman, 1947). Posteriormente, Davis y Ramsey publicaron un estudio clínico que apoya la acción anticonvulsiva de los homólogos del THC, cuando se administraron a cinco niños epilépticos hospitalizados (Davis y Ramsey, 1949). Si bien estos niños presentaban una epilepsia de *gran mal* controlada inadecuadamente con fenobarbital (PB) y otros antiepilépticos, dos se

volvieron casi completamente o completamente libres de crisis cuando se trataron con tales homólogos (Davis y Ramsey, 1949).

En 1964 cuando Gaoni y Mechoulam lograron aislar el delta-9- tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) se inició el estudio de sus propiedades anticonvulsivas. El trabajo de Karler, Wada y algunos otros en la década de 1970, estableció las propiedades anticonvulsivas de varios cannabinoides, incluidos el cannabinol, el cannabidiol y el Δ^9 -THC, en varios modelos animales, incluido el modelo de MES en ratón (Karler y Turkanis, 1981). En estudios realizados por Sofia *et al.*, el Δ^9 -THC y los anticonvulsivos fenitoína, fenobarbital (PB) y clordiazepóxido se evaluaron en el modelo de MES. Se encontró que el Δ^9 -THC fue el más potente para aumentar la latencia de la extensión de las extremidades posteriores y prevenir la mortalidad (Sofia *et al.*, 1976; Sofia y Barry, 1977). Otro estudio que utilizó este modelo demostró que la administración del Δ^9 -THC potenciaba significativamente el efecto anticonvulsivo de la fenitoína hasta 1.5 veces más y el cannabidiol hasta cuatro veces más (Chesher y Jackson, 1974).

Otros estudios utilizando los cannabinoides por vía intraperitoneal (i.p.) también demostraron ser anticonvulsivos efectivos en los modelos de kindling de epilepsia. En un estudio, 1 y 5 mg/Kg de Δ^9 -THC fueron suficientes para reducir o bloquear las manifestaciones clínicas y electrográficas de convulsiones amigdaloides inducidas en ratas (Corcoran *et al.*, 1973). El tratamiento de gatos con Δ^9 -THC mostró una reducción de la actividad convulsiva clínica y electrográfica inducida por la estimulación subcortical (Wada *et al.*, 1973).

También se ha informado que los cannabinoides son anticonvulsivos en varios otros modelos. Por ejemplo, tanto el Δ^9 -THC como el Δ^8 -THC protegieron contra las convulsiones inducidas por PTZ en ratones y eran aditivos con el PB; el Δ^9 -THC y el PB juntos brindaron una protección del 100% (Dwivedi y Harbison, 1975). Finalmente, tanto el Δ^9 -THC como el Δ^8 -THC fueron anticonvulsivos en ratas que presentaban crisis generalizadas espontáneamente en un modelo de epilepsia experimental con cobalto (Colasanti *et al.*, 1982).

Por otro lado, los cannabinoides también han presentado efectos paradójicos sobre la actividad convulsiva, pudiendo llegar a ser pro-convulsivos. Varios estudios han demostrado lo anterior, pero fue documentado por primera vez en 1967 cuando Keeler y Reifler informaron sobre un caso de un hombre adulto con epilepsia de *gran mal* que tuvo 3 convulsiones tónico-clónicas durante un intervalo de 3 semanas debido a su consumo de marihuana (Keeler y Reifler, 1967). En otro estudio, la administración de Δ^9 -THC una dosis de 0.05 mg/Kg por vía intravenosa, produjo convulsiones en una población de conejos blancos de Nueva Zelanda (Consroe *et al.*, 1977), los cuales son animales genéticamente susceptibles. También ha causado actividad convulsiva en ratas, perros y monos que no son susceptibles a convulsiones, cuando se administró Δ^9 -THC por vía oral, i.v., o por inhalación; sin embargo, estos efectos solo ocurrieron en algunos animales con dosis letales o casi letales administradas de forma aguda o altas en varias ocasiones durante meses (Mechoulam, 1986). Adicionalmente, otros estudios indicaron que se desarrolla tolerancia al efecto anticonvulsivo de los cannabinoides, incluidos el Δ^9 -THC y cannabidiol (Karler *et al.*, 1974; Karler y Turkanis, 1980; Colasanti *et al.*, 1982). De hecho, se ha informado una tolerancia completa al Δ^9 -THC (100 mg/Kg/día) en cuanto a sus efectos anticonvulsivos en el MES a partir de los 3 a 4 días. También se produjo tolerancia cruzada en animales tolerantes al Δ^9 -THC a la fenitoína y el PB (Karler *et al.*, 1974).

En la década de 1990, la investigación de laboratorio sobre cannabinoides y epilepsia se mantuvo estancada a pesar del descubrimiento de receptores de cannabinoides específicos en 1988 (Devane *et al.*, 1988) y la posterior explosión de literatura relacionada con los cannabinoides. El tema de la legalización de la marihuana con fines medicinales, incluyendo el tratamiento de la epilepsia, puso este tema en primer plano. A pesar de la creciente popularidad de los pacientes con epilepsia que se automedicaron con marihuana, los datos de investigación sobre los cannabinoides y la epilepsia en el siglo XX fueron prácticamente inexistentes (Robson, 2001) y actualmente siguen bajo investigación para su uso no solo en esta condición médica, sino también para muchos otros padecimientos.

2.6.2 Efectos Fisiológicos

La administración de cannabinoides produce numerosos efectos fisiológicos agudos que incluyen aumentos en la frecuencia cardíaca, enrojecimiento de la conjuntiva, reducción de la fuerza física, aumento del apetito y la subsecuente ingesta de alimentos (Hollister, 1986). En estudios con animales, los cannabinoides alteran una serie de parámetros de comportamiento caracterizados por una “tétrada” de efectos que incluyen una disminución de la actividad espontánea, analgesia, disminución de la temperatura rectal e inmovilidad rígida (catalepsia), incluso, estos efectos farmacológicos han demostrado ser excelentes predictores de la actividad cannabimimética en roedores (Ameri, 1999). Los efectos subjetivos de la marihuana en los seres humanos se caracterizan por numerosos síntomas que incluyen excitación y disociación de ideas, mejora de los sentidos, errores en el juicio del tiempo o el espacio, daño a las emociones, ideas fijas de delirios, ilusiones y alucinaciones (Dewey, 1986).

2.6.3 Receptores y Ligandos

El Δ^9 -THC y otros compuestos cannabinoides actúan en receptores específicos conocidos como receptores cannabinoides. Estos receptores tienen una estructura característica de receptor acoplado a proteína G (GPCR) que incluye siete dominios transmembrana hidrófobos, un extremo N extracelular y un extremo C intracelular (fig. 12). Actualmente hay dos subtipos de receptores cannabinoides bien caracterizados, CB1R (Devane *et al.*, 1988; Matsuda *et al.*, 1990) y CB2R (Kaminski *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1993), pero existe una creciente evidencia que apoya la existencia de subtipos adicionales de receptores de cannabinoides tanto en el SNC como en la periferia (Hájos y Freund, 2002b; Wiley y Martin, 2002; Begg *et al.*, 2005).

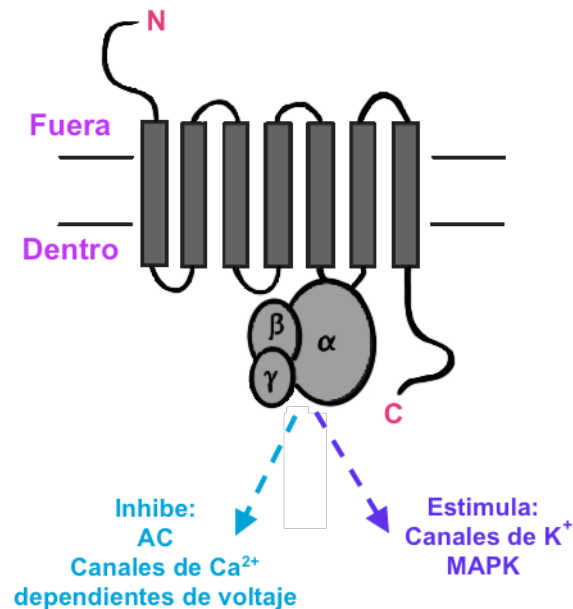


Figura 12. Receptores cannabinoide metabotrópico, conformados por siete proteínas que contienen dominios transmembrana que señalizan a través de proteínas G heterotriméricas. Se muestran las respuestas típicas resultantes de la activación de las proteínas G Gi/Go por los receptores CB1 y CB2. Modificado de Caterina, 2014.

Algunos estudios en cerebros de ratones knockout (KO) de receptor CB1 (-/-) que utilizaron autorradiografía de [³⁵S]GTPγS indicaron que varios cannabinoides actúan en receptores que no son CB1, ni CB2 (Di Marzo *et al.*, 2000; Breivogel *et al.*, 2001; Monory *et al.*, 2002). Otra evidencia de respaldo para los receptores adicionales del SNC en ratones KO de CB1R (-/-) incluye la capacidad de algunos cannabinoides para alterar las medidas de comportamiento (Di Marzo *et al.*, 2000), y la liberación de glutamato (Hájos *et al.*, 2001; Hájos y Freund, 2002a, b; Köfalvi *et al.*, 2003; Hoffman *et al.*, 2005).

La caracterización de los receptores de cannabinoides no podría haber sido posible sin el desarrollo de numerosos ligandos de cannabinoides, que se clasifican en cuatro grupos principales según su estructura química: clásico, no clásico,

aminoalquilindol y eicosanoide (Pertwee, 2005). Los cannabinoides clásicos comprenden los “fitocannabinoides” mencionados anteriormente que incluyen el Δ^9 -THC, el Δ^8 -THC y el cannabinoil, así como sus análogos sintéticos, como el derivado del Δ^8 -THC, HU-210. Los cannabinoides no clásicos incluyen análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC, por ejemplo, el compuesto bicíclico CP55,940. Los aminoalquilindoles, incluyendo el WIN 55,212-2 (fig. 13), están formados por estructuras muy diferentes a las de otros cannabinoides (Compton *et al.*, 1992). Su caracterización contribuyó a la determinación autorradiográfica de la localización del receptor CB1 en el cerebro (Herkenham *et al.*, 1990; Jansen *et al.*, 1992). Y el cuarto grupo, los eicosanoides, son los endocannabinoides y sus análogos sintéticos.

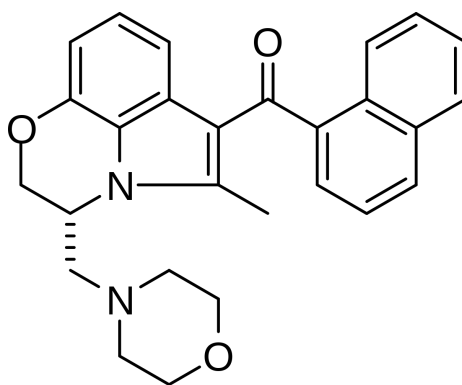


Figura 13. Estructura química de WIN 55,212-2. Modificado de Maya-López *et al.*, 2017.

2.6.4 Endocannabinoides

A partir del descubrimiento de los receptores cannabinoides se creó un gran interés en encontrar sus ligandos naturales. Se han aislado varios compuestos endocannabinoides, incluyendo la anandamida o araquidonoiletanolamida (AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG), O-araquidonil-etanolamina (virodamina, OAE), éster de 2-araquidonil-glicerol (noladina, 2-AGE) y *N*-araquidonoil-dopamina (NADA).

La caracterización de tales compuestos y sus receptores hizo evidente que existe un sistema de señalización neuromoduladora endógeno completo, conocido como sistema endocannabinoide (Pertwee, 2005).

El sistema endocannabinoide está compuesto no solo de receptores de cannabinoides y endocannabinoides, sino también de proteínas para la síntesis e inactivación de endocannabinoides, así como otras posibles dianas moleculares de los endocannabinoides (Pertwee, 2005). Aunque no es un sistema neurotransmisor clásico, el sistema endocannabinoide participa en la neurotransmisión química de manera muy similar a estos sistemas a través de la síntesis, liberación, interacción con receptores diana e inactivación de endocannabinoides.

2.6.4.1 Anandamida (AEA)

El primer cannabinoide endógeno descubierto que lleva el nombre de la palabra sánscrita “ananda” que significa “felicidad interior”, se identificó a partir del cerebro porcino en 1992 (Devane *et al.*, 1992) y posteriormente se denominó araquidonoiletanolamida (AEA) o anandamida, La síntesis de la AEA se inicia a través de un aumento en el Ca^{2+} intracelular (Di Marzo *et al.*, 1994). La AEA se produce a partir de la hidrólisis de su precursor fosfolipídico, *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NArPE), después de la activación de la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD) (Di Marzo *et al.*, 1994; Pertwee, 2005). Debido a la naturaleza hidrófoba de la AEA, se cree que se produce en la membrana plasmática. Esto está respaldado por los hallazgos de la NArPE en la superficie celular (Cadas *et al.*, 1996). Una vez que se libera la AEA, se une a los receptores CB1 como un agonista parcial para producir numerosos efectos comparables a los del Δ^9 -THC (Felder *et al.*, 1993; Mackie *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1993; Wartmann *et al.*, 1995). También se encontró que la AEA se une a los receptores periféricos (CB2), aunque con menor afinidad que los receptores CB1 (Freund *et al.*, 2003). La AEA también se une al receptor TRPV1 (fig. 14), lo que demuestra que tiene efectos no cannabinoides (Zygmunt *et al.*, 1999). Se piensa que la AEA se inactiva rápidamente; un transportador de Na^{2+} de alta afinidad introduce la AEA en la célula (Beltramo *et al.*, 1997; Piomelli *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2005). Allí se hidroliza rápidamente por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que convierte la AEA en ácido araquidónico y etanolamina (Cravatt *et al.*, 1996; Giang y Cravatt, 1997).

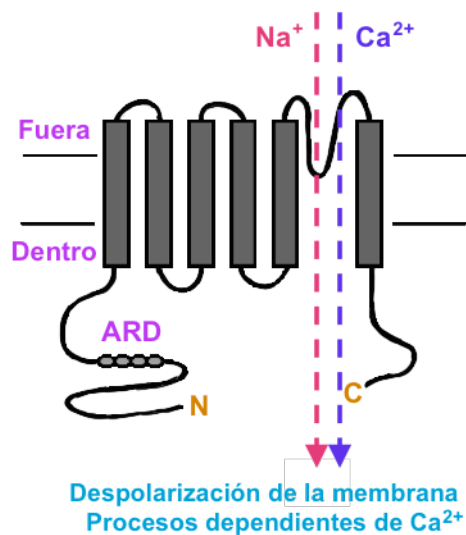


Figura 14. Receptores cannabinoide ionotrópicos del canal TRP. Las subunidades del canal TRP tienen cada una seis dominios transmembrana. Se ensamblan cuatro subunidades para formar un canal de función para mediar la entrada de iones de sodio y/o calcio. ARD, Dominio repetido de anquirina. Modificado de Caterina, 2014.

2.6.4.2 2-Araquidonilglicerol (2-AG)

El 2-araquidonilglicerol (2-AG) es un ligando cannabinoide endógeno cuyos niveles en el cerebro son extremadamente altos, en algunos casos aproximadamente 170 veces más que la anandamida (Stella *et al.*, 1997). El 2-AG se sintetiza principalmente por los precursores del diacilglicerol (DAG) que forman el 2-AG después de la activación de la lipasa del DAG (DAGL) (Pertwee, 2005). Dos isoformas de lipasa 1 del DAG que se han caracterizado hasta ahora son el DAGL α y el DAGL β (Bisogno *et al.*, 2003). Al igual que la anandamida, su síntesis puede desencadenarse por un aumento del Ca^{2+} intracelular (Stella *et al.*, 1997), aunque también hay evidencia de su generación a través de mecanismos independientes de Ca^{2+} (Kondo *et al.*, 1998). Debido a que los incrementos del DAG son paralelos a los incrementos del 2-AG, es probable que la fosfolipasa C (PLC) u otra actividad

de la fosfolipasa contribuya a la síntesis del 2-AG (Stella *et al.*, 1997). Si bien se ha demostrado que la FAAH también degrada el 2-AG (Freund *et al.*, 2003), otras hidrolasas del 2-AG conocidas como monoacilglicerol lipasas también participan en la inactivación del 2-AG en las neuronas corticales (Dinh *et al.*, 2002). El 2-AG se une a los receptores CB1, lo cual se demostró al producir una inhibición reversible de la acumulación de AMPc sensible a la toxina pertussis (PTX) (Stella *et al.*, 1997).

2.6.4.3 Otros

Se han propuesto otros tres ligandos endógenos potenciales: *N*-araquidonoil-dopamina (NADA) (Huang *et al.*, 2002), éster de 2-araquidonilglicerol (“noladina”) (2-AGE) (Hanus *et al.*, 2001) y *O*-araquidonil etanolamina (“virodamina”) (OAE) (Fezza *et al.*, 2002). En general, se sabe mucho menos sobre estos compuestos y su papel en el sistema endocannabinoide. Existe controversia sobre si estos compuestos se producen en niveles suficientes en el tejido cerebral de los mamíferos para ejercer un efecto fisiológico (Pertwee, 2005).

2.6.5 Ubicación de los Receptores

2.6.5.1 CB1R

El receptor CB1 es uno de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) más abundantes en el SNC (fig. 15), con niveles hasta 10 veces superiores a cualquier otro GPCR (Herkenham *et al.*, 1990; Sim *et al.*, 1996b). Los primeros estudios autorradiográficos con el ligando cannabinoide radiomarcado [³H]CP55,940 demostraron concentraciones particularmente altas del receptor en varias regiones cerebrales diferentes, como el estriado, el hipocampo, la sustancia *nigra* y el cerebelo (Herkenham *et al.*, 1990; Herkenham *et al.*, 1991). Los estudios en ratas, conejillos de indias, monos *rhesus* y humanos han demostrado que todas las especies contienen una unión muy densa dentro del hipocampo, particularmente la capa molecular del giro dentado, y una unión densa en otras partes de la formación del hipocampo (Herkenham *et al.*, 1990). Otros estudios de localización en el hipocampo de rata elucidaron una unión muy densa en la región CA3 y una unión densa en CA1 y el subículo, con niveles más altos en el estrato *lacunosum-*

moleculare y en las bandas que rodean la capa de células piramidales (Herkenham *et al.*, 1991).

Los estudios de hibridación *in situ* (ISH) han correlacionado muchas de estas regiones de unión densa del receptor a regiones que expresan altos niveles de ARNm del CB1R (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992b; Matsuda *et al.*, 1993; Marsicano y Lutz, 1999). En el hipocampo, las diferencias notables en los estudios de ISH incluyen la presencia de ARNm del CB1R en niveles bajos en la capa de células piramidales. Además, se dispersaron células muy intensas en el estrato piramidal, el estrato *oriens*, el estrato *lacunosum-moleculare* y la capa de células granulares del giro dentado, y fueron las más marcadas en el SNC (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992b).

Varios estudios que utilizaron anticuerpos específicos para el receptor CB1, dirigido a los primeros 77 residuos del extremo N (N¹⁻⁷⁷) caracterizaron la localización de los receptores CB1 del hipocampo con el anticuerpo N¹⁻⁷⁷ con respecto a su posible función. Los estudios de marcaje fluorescente doble tanto en cortes de hipocampo como en cultivos co-localizaron el receptor CB1 con numerosos marcadores celulares (Tsou *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 2000), y esta co-localización fue confirmada por estudios de ISH (Marsicano y Lutz, 1999). Casi todas las neuronas que contienen receptores CB1 se co-localizan con GABA o la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD); curiosamente, los estudios de ISH en el hipocampo también han mostrado la co-localización con receptores de serotonina 3 (5-HT₃) (Hermann *et al.*, 2002; Morales y Backman, 2002) y receptores de dopamina D₂ (Hermann *et al.*, 2002).

Los estudios de microscopía electrónica (ME) en el hipocampo revelaron que los receptores CB1 estaban localizados axonalmente, lo que sugiere un mecanismo de acción presináptico, y se encontraron exclusivamente en las sinapsis simétricas o GABAérgicas (Katona *et al.*, 1999). Otros anticuerpos desarrollados han podido localizar más ampliamente la expresión del receptor CB1 axonal del anillo perisináptico en el hipocampo de la rata, a una corta distancia del borde de la

sinapsis, donde pueden influir directamente en la función del canal de Ca^{2+} sináptico (Nyiri *et al.*, 2005).

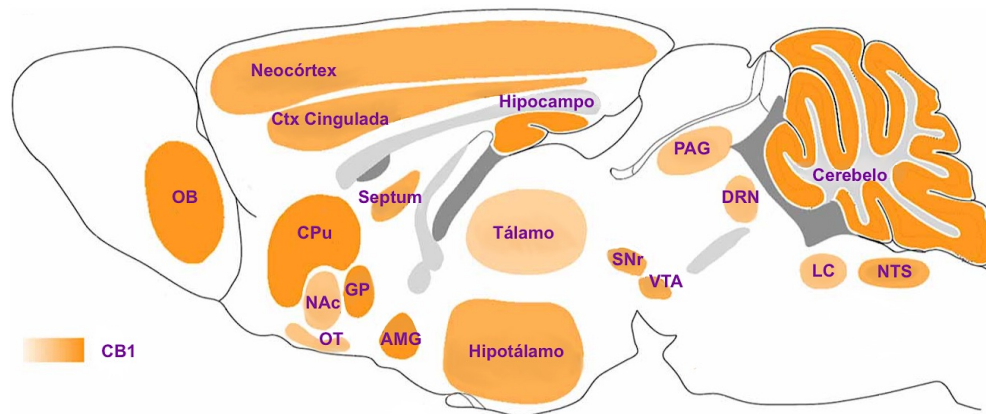


Figura 15. Representación esquemática de las principales áreas que expresan CB1 en el cerebro del ratón. AMG, amígdala; CPu, putamen caudado; Ctx, corteza; DRN, núcleo del rafe dorsal; GP, globo pálido; LC, *locus coeruleus*; NAc, núcleo *accumbens*; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfativo; OT, tubérculo olfativo; PAG, sustancia gris periacueductal; SNr, *substantia nigra pars reticulata*; VTA, área tegmental ventral. Modificado de Flores *et al.*, 2013.

2.6.5.2 CB2R

Las transcripciones de ARNm y las proteínas del receptor CB2 se han detectado recientemente en niveles más bajos, pero aún significativos en el SNC, particularmente en el cerebelo, corteza y tronco del encéfalo (Van Sickle *et al.*, 2005) aunque anteriormente se pensaba que se encontraba predominantemente en tejidos inmunes (Kaminski *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1993). En el hipocampo, se encontró una inmunotinción moderada de CB2R en el estrato piramidal, mientras que se observó una tinción más pronunciada en la región CA2-CA3 (Gong *et al.*, 2006). Además, las interneuronas en el estrato *oriens* y el *radiatum* fueron inmunoreactivas para el CB2R (Gong *et al.*, 2006). Sin embargo, la importancia funcional de estos receptores en el cerebro aún no se conoce con claridad.

2.6.6 Plasticidad del Receptor CB1

Se ha demostrado que los receptores CB1 exhiben plasticidad en numerosos estados patológicos. En 1993 se demostró que había una pérdida de la expresión del receptor CB1 en la sustancia *nigra* en la enfermedad de Huntington (Glass *et al.*, 1993). Si bien la evidencia preliminar sugirió que se debió simplemente a la presencia de receptores CB1 en las terminales estriatonigrales, un estudio posterior encontró que en la sustancia *nigra*, la unión del receptor cannabinoide está comprometida antes de la degeneración de la terminal *estriatonigral* (Glass *et al.*, 2000). Esto sugiere que la regulación a la baja del receptor cannabinoide puede ser protectora y compensatoria (Glass *et al.*, 2000).

Se sabe que la expresión del receptor cannabinoide es plástica en varios otros estados de enfermedad. Por ejemplo, en un modelo de isquemia cerebral focal en las ratas, la expresión del receptor CB1 en las neuronas aumentó en la zona del límite arterial del manto cortical de 2 a más de 72 horas, como lo muestran tanto el análisis de Western blot como el análisis inmunohistoquímico (Jin *et al.*, 2000). Esto concuerda con estudios previos realizados por el mismo laboratorio que sugieren que los cannabinoides son neuroprotectores (Nagayama *et al.*, 1999). También se demostró que la expresión del receptor CB1 está significativamente aumentada en un modelo de rata de dolor neuropático crónico (Siegling *et al.*, 2001). A través de la transección del nervio ciático, los autores pudieron obtener una regulación contralateral selectiva del ARNm del receptor CB1 talámico evaluado 1 vez después de la cirugía. Estos resultados indican que el aumento de la expresión del receptor CB1 puede subyacer al aumento de la eficacia antinociceptiva de los cannabinoides en condiciones de dolor crónico (Siegling *et al.*, 2001). Finalmente, existe evidencia de que el sistema endocannabinoide también puede alterarse en el desarrollo de la esquizofrenia. Se han encontrado niveles elevados de AEA en el LCR de 10 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (Leweke *et al.*, 1999). Estos cambios en la función y expresión del receptor CB1 implican al sistema endocannabinoide en desempeñar un papel en los procesos neuronales normales afectados por estos trastornos. En conjunto, estos estudios ilustran que la expresión y la función del receptor CB1 pueden alterarse por numerosos eventos celulares y moleculares.

2.6.7 Transducción de la Señal Mediada por el Receptor CB1

En el cerebro, la unión del agonista al receptor CB1 da como resultado la activación de al menos cinco isoformas diferentes de proteínas G, $G_{i/o}$ (Prather *et al.*, 2000). Como es típico de las proteínas $G_{i/o}$, la activación del receptor CB1 produce una inhibición de la adenilil ciclasa (Howlett, 1985; Howlett *et al.*, 1986) y subsiguientes disminuciones en la formación del AMPc (Bidaut-Russell *et al.*, 1990).

La activación del receptor CB1 también causa numerosos cambios posteriores en la permeabilidad de los iones. La conductancia del canal de potasio aumenta tanto en los canales rectificadores de potasio (GIR $[K^+]$) acoplados internamente a la proteína G (Henry y Chavkin, 1995) como en los canales de corriente de potasio dependientes del voltaje (Deadwyler *et al.*, 1995). A la inversa, la activación del receptor CB1 disminuye la conductancia de ambos canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q (Mackie y Hille, 1992; Twitchell *et al.*, 1997). Además, se sabe que la activación del receptor CB1 activa una cascada de MAP quinasa (Bouaboula *et al.*, 1995b; Wartmann *et al.*, 1995).

2.6.8 Inhibición de la Liberación de Neurotransmisores Mediada por el Receptor CB1

Existe una gran evidencia de que los cannabinoides modulan la neurotransmisión GABAérgica en el hipocampo. La electrofisiología paralela o los experimentos de liberación de $[^3H]GABA$ a menudo se han realizado junto con estudios anatómicos. Por ejemplo, la aplicación del WIN55,212-2 inhibió la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias en miniatura (mIPSC) mediada por GABA en neuronas cultivadas de hipocampo, y se revirtió mediante la aplicación del antagonista cannabinoide SR141716A (Irving *et al.*, 2000). Los mecanismos de esta inhibición se examinaron más a fondo en cortes de hipocampo, donde el WIN55,212-2 inhibió las IPSCs mediadas por $GABA_A$ y las IPSCs espontáneas (sIPSC) a través de un mecanismo mediado por el CB1R sin efectos en la sensibilidad postsináptica de GABA o la captación de GABA (Hoffman y Lupica, 2000). Estos resultados contrastan con los hallazgos en los que se encontró que el Δ^9 -THC disminuía significativamente la captación de GABA en el hipocampo de rata (Coull *et al.*,

1997). De hecho, se ha demostrado que la aplicación de agonistas cannabinoides reducen significativamente las IPSCs en numerosas regiones del cerebro, como el estriado (Szabo *et al.*, 1998), proyecciones estriatonigrales (Wallmichrath y Szabo, 2002), la sustancia *nigra* (Chan *et al.*, 1998; Chan y Yung, 1998), el núcleo *accumbens* (Manzoni y Bockaert, 2001) y la amígdala (Katona *et al.*, 2001).

Por otro lado, hablando de la neurotransmisión glutamatérgica, se ha demostrado que los cannabinoides inhiben la liberación de glutamato al reducir la amplitud de la corriente excitatoria postsináptica (EPSC) en rodajas de cerebro de roedores o en neuronas de numerosas regiones del cerebro, incluido el núcleo *accumbens* (Robbe *et al.*, 2001), globo pálido (Freiman y Szabo, 2005), el estriado (Gerdeman y Lovinger, 2001 ; Huang *et al.*, 2001), el cerebelo (Lévénés *et al.*, 1998; Takahashi y Linden, 2000), la sustancia *nigra pars reticulata* (Szabo *et al.*, 2000), la corteza prefrontal (Auclair *et al.*, 2000), el área tegmental ventral (Melis *et al.*, 2004a), la amígdala lateral (Azad *et al.*, 2003) y la médula espinal (Morisset y Urban, 2001).

Los estudios bioquímicos han confirmado que la activación del receptor CB1 por el WIN55,212-2, inhibe la liberación de glutamato en el hipocampo a través de una proteína G inhibitoria que suprime la actividad del canal de Ca²⁺ tipo N y P/Q (Wang, 2003).

Debido a que los estudios han ilustrado la falta de una tinción del receptor CB1 en las sinapsis glutamatérgicas, existe una paradoja en la modulación cannabinoide de la neurotransmisión glutamatérgica. Varios estudios han abordado esta paradoja y se ha hipotetizado la existencia de un nuevo subtipo de receptor cannabinoide (Hájos *et al.*, 2001). La evidencia adicional de tal receptor se ha demostrado mediante la capacidad del WIN55,212-2 para inhibir la liberación de [³H]glutamato en ratones KO de receptor CB1 (-/-) (Köfalvi *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a que este subtipo propuesto aún no se ha caracterizado molecularmente, los estudios adicionales que abordan este problema son algo limitados. Además, dos estudios posteriores han propuesto que los receptores CB1 son responsables de la supresión sináptica glutamatérgica en el hipocampo (Kawamura *et al.*, 2006;

Takahashi y Castillo, 2006), por lo que la controversia sobre la especificidad del receptor CB1 en la liberación de glutamato sigue sin resolverse.

Además de GABA y glutamato, se ha encontrado que los cannabinoides inhiben la liberación de varios otros neurotransmisores (Pertwee, 2005). En el hipocampo, la activación del receptor CB1 inhibió la liberación de [³H]noradrenalina estimulada por los receptores de NMDA y kainato (Kathmann *et al.*, 1999). Estudios en cortes de hipocampo (Gifford y Ashby, 1996; Gessa *et al.*, 1997) y de sinaptosomas (Gifford *et al.*, 2000) demostraron que los cannabinoides también inhiben la liberación de [³H]acetilcolina a través de un mecanismo dependiente del receptor CB1. No es sorprendente que la liberación de [³H]acetilcolina se haya incrementado en los hipocampos de ratones KO de receptores CB1 (-/-) (Kathmann *et al.*, 2001). La liberación de neurotransmisores dependiente del receptor CB1 también se demostró para la dopamina en el estriado (Kathmann *et al.*, 1999) y para la serotonina en la corteza cerebral (Nakazi *et al.*, 2000).

2.6.9 Señalización Retrógrada

La señalización retrógrada es un fenómeno en el que una señal viaja desde una neurona postsináptica a una presináptica. Este concepto puso en conflicto el principio de Ramon y Cajal de células “dinámicamente polarizadas” el cual establece que las dendritas neuronales fueron diseñadas para recibir señales y los axones fueron diseñados para enviarlas (Alger, 2002). Si bien varias moléculas se han propuesto como mensajeros retrógrados, como el óxido nitroso, el monóxido de carbono, el glutamato y el FNDC, los endocannabinoides ahora constituyen la clase mejor caracterizada de estos mensajeros. Los endocannabinoides participan en dos tipos de señalización retrógrada conocidos hasta la fecha: supresión de inhibición inducida por despolarización (DSI) y supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE) (Kreitzer y Regehr, 2002; Diana y Marty, 2004). En ambos casos, la despolarización postsináptica, ya sea directamente a través de aumentos en los niveles de Ca²⁺ postsinápticos o como resultado de la activación del receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) (Doherty y Dingledine, 2003), causa la síntesis y liberación de endocannabinoides. Estos endocannabinoides actúan sobre los

receptores CB1 presinápticos para modular la liberación de neurotransmisores (fig. 16).

2.6.10 Actividad Anticonvulsiva Mediada por el Receptor CB1

La señalización de los endocannabinoides (fig. 16) en la modulación de la neuroexcitabilidad se ha confirmado por la capacidad de los cannabinoides para suprimir la hiperexcitabilidad *in vitro*, consistente con un efecto anticonvulsivo. Ameri *et al.* en el 2000 demostraron una naturaleza anticonvulsiva dependiente del receptor CB1 de los cannabinoides utilizando electrofisiología del corte de hipocampo. La actividad epileptiforme recurrente producida en la región CA3 también fue atenuada por la AEA y el WIN55,212-2 pero no por el WIN55,212-3, y el 2-AG, donde el antagonista cannabinoide SR141716A revirtió este efecto (Ameri *et al.*, 1999; Ameri y Simmet, 2000). Un trabajo posterior demostró una capacidad específica del WIN55,212-2 en el receptor CB1 para suprimir las descargas epileptiformes recurrentes espontáneas (SRED) en modelos de cultivos neuronales del hipocampo inducidos por concentraciones bajas de Mg^{2+} (Blair *et al.*, 2006).

Los antecedentes en modelos animales existen a partir del año 2001, cuando el trabajo de Wallace *et al.* (2001) caracterizó la naturaleza anticonvulsiva mediada por el receptor CB1 de cannabinoides como el Δ^9 -THC y el WIN55,212-2 en el modelo de MES en ratón. La anandamida (AEA) y el análogo estable O-1812 también resultaron ser anticonvulsivos en este modelo, y la actividad anticonvulsiva de todos estos compuestos se eliminó con el tratamiento previo de SR141716A (Wallace *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2002). Otro trabajo con el modelo de MES demostró la actividad anticonvulsiva del endocannabinoide putativo *N*-palmitoiletanolamida, utilizando el modelo de kindling tanto de inflamación amigdaloides como el de convulsiones inducidas por PTZ (Sheerin *et al.*, 2004). En otro estudio con convulsiones inducidas por PTZ, ACPA el agonista específico del receptor CB1 aumentó el umbral de convulsiones, mientras que la administración de AM251, antagonista del receptor CB1, disminuyó dependientemente el umbral (Shafaroodi *et al.*, 2004).

Los agonistas WIN55,212-2, el CP55,940 y la AEA, atenuaron las convulsiones producidas por el ácido glutámico y NMDA cuando fueron administrados como pretratamiento (Hayase *et al.*, 2001). Además, el CP55,940 y el WIN55,212-2 redujeron significativamente las lesiones de las convulsiones producidas por la cocaína (Hayase *et al.*, 2001).

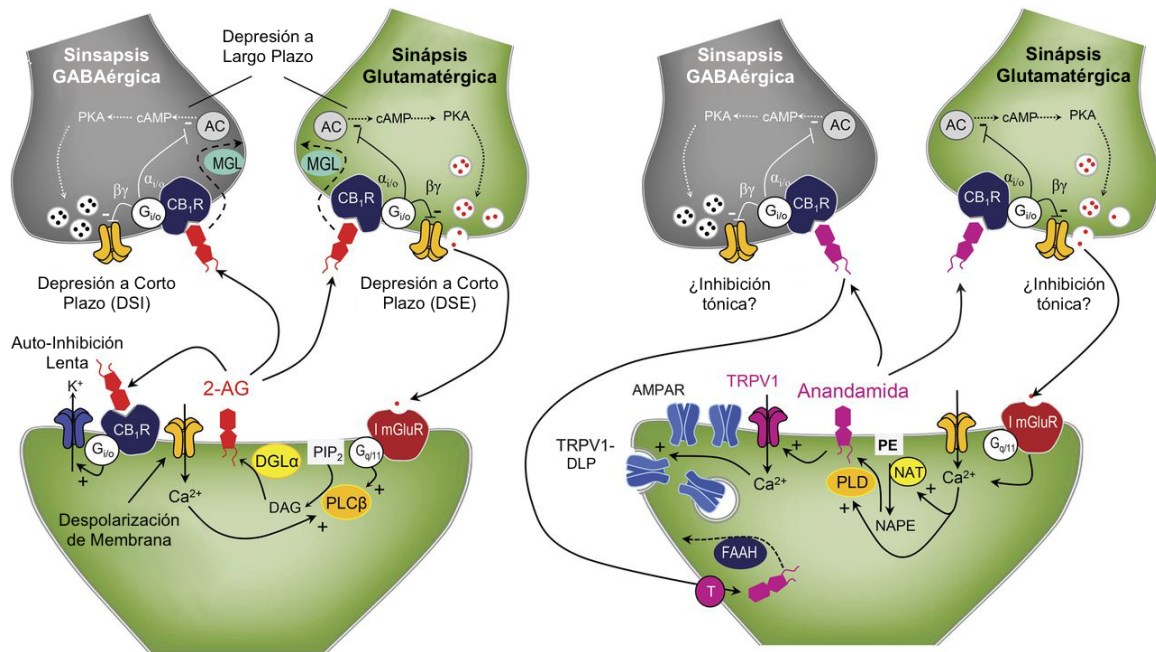


Figura 16. Vías de señalización Endocannabinoide. Los endocannabinoides, incluyendo el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y la anandamida (AEA), se sintetizan de forma postsináptica en respuesta al aumento del Ca^{2+} intracelular desencadenado por la despolarización. La vía principal para la síntesis del 2-AG consiste en la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) mediante la fosfolipasa C β ($PLC\beta$), lo que lleva a la producción de diacilglicerol (DAG) que se hidroliza por la lipasa del DAG α ($DGL\alpha$) para producir el 2-AG. Después de la liberación, el 2-AG se inactiva mediante la lipasa de monoacilglicerol (MGL) ubicada en la membrana presináptica. La anandamida se sintetiza a partir del precursor de *N*-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE), que se genera por la enzima *N*-acetiltransferasa (NAT) activada por Ca^{2+} ; NAPE luego se hidroliza por la fosfolipasa D (PLD), produciendo anandamida. La anandamida se transporta a la terminal postsináptica por uno o más transportadores selectivos (T) y luego se inactiva por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Los efectos de los endocannabinoides en el SNC están mediados principalmente por los receptores cannabinoides tipo 1 (CB_1R) acoplados a las vías de transducción de las proteínas $G_{i/o}$. Inhiben la adenilil ciclasa (AC) y, por lo tanto, la vía del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) - proteína quinasa A (PKA), activan los canales

de potasio (K^+) postsináptico e inhiben los canales de voltaje de Ca^{2+} presinápticos. La mayoría de los efectos de los endocannabinoides están mediados por los receptores CB1 presinápticos que se encuentran principalmente en las sinapsis GABAérgicas y en menor medida, en las sinapsis glutamatérgicas. La activación de los CB1R presinápticos provoca la depresión sináptica a corto plazo, la supresión de la inhibición inducida por la despolarización (DSI) y la supresión de la excitación inducida por la despolarización (DSE), así como la depresión a largo plazo (DLP) en las sinapsis tanto inhibitoria como excitatoria. Algunos efectos de los endocannabinoides están mediados por los receptores CB1 postsinápticos, que participan en los mecanismos de autoinhibición. La anandamida también activa los canales del receptor potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) postsinápticos, que puede resultar en la DLP de las sinapsis excitadoras (TRPV1-DLP) a través de la endocitosis de los receptores de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Modificado de Benarroch, 2014.

2.6.11 WIN 55,212-2 y Epilepsia

WIN 55,212-2 (WIN) es un aminoalquilindol, o cannabinoide sintético, agonista del receptor CB1 que ha demostrado eficacia antiepiléptica al atenuar las convulsiones en diferentes modelos de epilepsia (Huizenga et al., 2017; Rudenko *et al.*, 2012) y parece inducir neuroprotección en condiciones cerebrales agudas a través de la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (Hu *et al.*, 2010). Tales mecanismos son el resultado de su agonismo total a CB1. Por ejemplo, en un modelo de pilocarpina en ratones jóvenes tuvo eficacia anticonvulsiva (Wallace *et al.*, 2001; 2002) mientras que en otro estudio se demostró que inhibe la liberación de glutamato en el hipocampo a través de una proteína G inhibitoria (Wang, 2003).

Con base en la evidencia que demuestra la eficacia anticonvulsiva y neuroprotectora de los agonistas del receptor CB1, y dado que se desconoce el efecto anticonvulsivo y neuroprotector del tratamiento con WIN durante el SE, en este trabajo evaluamos su beneficio terapéutico en dos diferentes dosis.

3. Hipótesis

La administración del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 a una dosis de 1.5 mg/Kg y 3 mg/Kg, tienen efecto anticonvulsivo y neuroprotector en el *status epilepticus* en un modelo experimental inducido con ácido kaínico en ratas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto anticonvulsivo y neuroprotector del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 administrado durante el *status epilepticus* (SE) en un modelo experimental de ácido kaínico (KA) en ratas.

4.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto anticonvulsivo del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 administrado en dos diferentes dosis durante el SE, utilizando Electroencefalografía (EEG) en el modelo de ácido kaínico (KA) en rata.
2. Analizar si la actividad electroencefalográfica está relacionada con la dosis de WIN 55,212-2 en el modelo experimental de SE.
3. Determinar el efecto neuroprotector de WIN 55,212-2 administrado en dos diferentes dosis durante el SE, cuantificando el número de células piramidales degeneradas en el CA3 del hipocampo.
4. Evaluar el efecto antiapoptótico del WIN 55,212-2 administrado en dos diferentes dosis durante el SE, a través de la actividad de las caspasas 8 y 3 en el hipocampo en un modelo de SE inducido con KA en rata.

5. Metodología

5.1 Animales

Los experimentos fueron realizados en ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 a 350 g que tuvieron acceso *ad libitum* al agua y alimentos antes de cada experimento. Los animales fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X) y todos los experimentos se condujeron en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), los cuales se llevaron a cabo siguiendo los lineamientos y estándares éticos establecidos internacionalmente y las especificaciones técnicas de la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

5.2 Fármacos

El ácido kaínico (KA) adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), se diluyó en solución salina al 0.9%, a una concentración de 5 mg de KA en 2 mL de solución salina. Se suspendió un stock de (R +) WIN 55,212-2 (WIN) obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), en un vehículo que estaba formado por 10% dimetilsulfóxido (DMSO), 5 % de Tween 80 y 85% de solución salina, a una concentración de 3 mg de WIN en 2 mL de vehículo. Como control positivo se utilizó el producto comercial denominado Valium[®] (Roche Laboratories) en solución inyectable cuyo principio activo es Diazepam (DZP) en una concentración de 10 mg/2mL.

El KA se utilizó a una concentración de 10-20 mg/Kg, el WIN a una dosis de 1.5 mg/Kg y 3 mg/Kg según lo sugerido por investigaciones anteriores (Maya-López *et al.*, 2017) y el DZP a una dosis fija de 20 mg/Kg según lo informado por Pitkänen *et al.* (2005).

5.3 Modelo experimental

5.3.1 Implante de electrodos para registro del EEG

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (80mg/Kg de peso corporal) y Xilazina (10mg/Kg de peso corporal). Una vez inducida la anestesia, se colocó al animal en un equipo estereotáxico, donde se inició con la asepsia de la zona quirúrgica con una solución de yodopovidona al 10% y una navaja de afeitar. Se les practicó una incisión sagital sobre el cráneo y se separaron tanto el tejido conectivo como los músculos, hasta dejar expuesto el cráneo.

Se realizó hemostasia en los tejidos circundantes mediante presión, y sobre el cráneo con un ligero raspado, entonces se blanqueó el cráneo con Peróxido de Hidrógeno para evidenciar las suturas del mismo y localizar claramente el Bregma.

Se realizarón 5 trepanaciones con un micro taladro eléctrico en las ubicaciones que se observan en la fig. 17.



Figura 17. Vista dorsal del cráneo de una rata donde se visualiza la ubicación de las trepanaciones.

Las tres trepanaciones que utilizaron la broca de diámetro de 0.5 mm corresponden a la ubicación de los electrodos sobre la corteza cerebral, donde el electrodo más craneal es de conexión a tierra; y las dos trepanaciones de 1.2 mm de diámetro corresponden a los tornillos de fijación, cabe mencionar que los electrodos de aguja, fueron fabricados manualmente (fig. 18) con cable de acero inoxidable (Rhodes, 0.1mm).

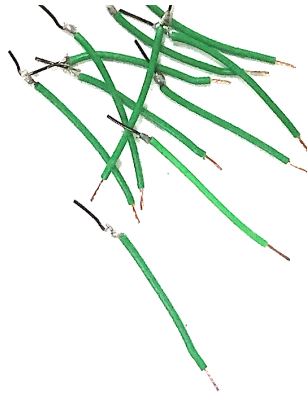


Figura 18. Electrodo fabricados manualmente.

Primero se colocaron los tornillos de fijación en las trepanaciones correspondientes; posteriormente se colocaron los electrodos en la corteza cerebral, iniciando por el más caudal, para finalmente posicionar el electrodo de conexión a tierra en la trepanación más craneal (fig. 19).



Figura 19. Colocación de electrodos en la corteza cerebral.

Se aplicó una primera capa de acrílico dental (Arias, acrimin autocurable) para fijar todos los elementos colocados al cráneo (fig. 20). Entonces se soldaron los tres electrodos a una matriz de conectores, se ajustaron con resina epóxica para mantenerlos alineados y una vez unidos se fijaron de forma sagital al cráneo con acrílico dental (fig. 21).

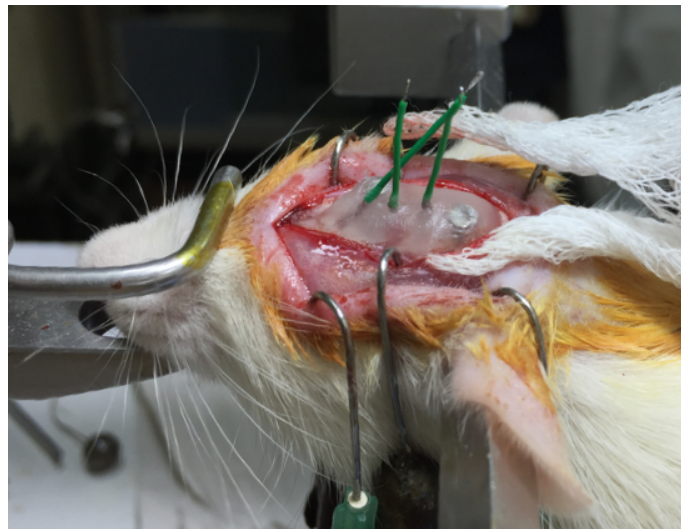


Figura 20. Colocación de la primer capa de acrílico dental.



Figura 21. Vista final del conector asegurado con acrílico dental a los tornillos de fijación.

Finalmente se suturó con puntos separados únicamente en los extremos craneal y caudal para ajustar los tejidos al conector, quedando como una herida abierta; se colocó gentamicina en la herida y se administró a los animales durante 3 días consecutivos con Enrofloxacin como antibioterapia a una dosis de 10 mg/Kg y con un antiinflamatorio no esteroideo (Meloxicam) a una dosis 1 mg/Kg. Se permitió la adaptación de los animales al conector durante 6 días y entonces se utilizaron para el estudio.

5.3.2 Establecimiento del *Status Epilepticus*

Los animales se asignaron al azar a uno de los cuatro grupos experimentales de la siguiente manera. Grupo 1: Ácido kaínico más Vehículo (KA + Veh, i.p., n = 6), Grupo 2: (KA + WIN) Ácido kaínico más (R +) WIN 55,212-2 (1.5 mg/Kg, i.p., n = 6), Grupo 3: (KA + WIN) Ácido kaínico más (R +) WIN 55,212-2 (3 mg/Kg, i.p., n = 6) y Grupo 4: (KA + DZP) Ácido kaínico más Diazepam (20 mg/Kg, i.p., n = 4). Las ratas se indujeron al *status epilepticus* (SE) mediante inyecciones consecutivas de ácido kaínico intraperitoneal (5 mg/Kg i.p.) con un intervalo de 1 h según el protocolo descrito por Vermoesen *et al.* (2010), sin embargo, si una rata se acercaba al SE,

se administraron medias dosis (2.5 mg/Kg) para reducir la mortalidad. Tanto el Veh, el WIN y el DZP se administraron cuando el animal cumplió con 30 minutos de convulsiones motoras convulsivas monitoreadas mediante EEG, punto que se consideró como inicio del SE.

Para evaluar el comportamiento se utilizó la escala de Racine modificada (Racine, 1972) que consta de cuatro fases; Fase 1: Ausencia de movilidad, Fase 2: Encorvamiento con mioclonías faciales, Fase 3: Mioclonías faciales o de extremidades anteriores unilaterales, Fase 4: Mioclonías bilaterales de las extremidades anteriores y caída, y Fase 5: Convulsiones clónicas generalizadas con pérdida del reflejo de enderezamiento. Las puntuaciones 1 a 2 se definieron como crisis no convulsivas (CNC) y las puntuaciones 3 a 5 como crisis motoras convulsivas (CMC) (Williams *et al.*, 2009).

5.3.3 Grabación de video de electroencefalografía (EEG)

Se realizaron los registros electroencefalográficos y de comportamiento colocando las ratas en jaulas acrílicas transparentes individuales. Las videograbaciones electroencefalográficas se adquirieron utilizando un equipo EBNeuro®, con una base de datos del software Galileo NT y el comportamiento se registró con una cámara de video. Con este equipo aseguramos el momento exacto de la instalación, el comportamiento y la electroencefalografía del SE. Después de 30 minutos de registro basal, se inyectó a los animales el KA disuelto en solución salina (NaCl al 0.9%), hasta que se estableció el SE. Todos los animales recibieron los tratamientos correspondientes a cada grupo. Posteriormente, los registros de EEG se llevaron a cabo durante 2.5 h más para evaluar la eficacia de los tratamientos de acuerdo con Choy *et al.* (2010) y modificado por Ríos *et al.* (2019). Finalmente, 24 h después de la administración de los tratamientos, se realizó un segundo registro durante 30 min. Para comparar la actividad eléctrica entre los grupos estudiados, se realizó un análisis de la potencia espectral total de acuerdo con el método descrito previamente por Franco-Pérez *et al.* (2015). En resumen, todas las señales de EEG se filtraron con un paso bajo a 0.3 Hz y un paso alto de 70 Hz, en cinco momentos diferentes (T1: basal; T2: en SE; T3: 1 h; T4: 2 h y T5: 24 h después de presentar

SE) se extrajeron épocas de 10 segundos de los diferentes EEG. Se seleccionaron esas épocas para evitar artefactos de señal debidos a ajustes de cable o ruido externo y que contenían la actividad EEG epileptiforme. La actividad epileptiforme se definió como una actividad altamente explosiva sincronizada con trenes evidentes de fluctuaciones de voltaje y persistente durante al menos dos segundos (Bartsch *et al.*, 2014; Bröer *et al.*, 2013). Posteriormente, las épocas de 10 segundos elegidas se sometieron a un análisis automatizado basado en el método de transformada de Fourier para estimar la potencia espectral total (μV^2) que nos indica la intensidad de la actividad eléctrica y la frecuencia media (Hz) que denota la cantidad de eventos eléctricos que ocurren en un determinado rango de tiempo.

5.3.4 Ensayo histológico

5.3.4.1 Procesamiento de muestras para el Ensayo bioquímico e histológico

El análisis histológico se realizó 24 h después del inicio del SE más los últimos 30 minutos de registro de EEG (24.5 h) posteriores a la administración de KA. Todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (100 mg/Kg ip) y se perfundieron a través de la aorta ascendente con solución salina fisiológica fría utilizando una bomba peristáltica a 30 mL/min. Los cerebros se extrajeron del cráneo y se dividieron los hemisferios para destinar cada uno a diferentes técnicas de análisis. Uno de los hemisferios se asignó para la prueba de medición de actividad de las Caspasas 8 y 3 y el hemisferio restante para ensayo de inmunofluorescencia con la técnica de Fluoro-Jade® B, el criterio de asignación del hemisferio a cada una de las pruebas fue la ubicación de los electrodos implantados inicialmente, es decir, si los electrodos se encontraban en el hemisferio derecho, tal hemisferio fue utilizado para la medición de Caspasas, y su contraparte para la prueba restante.

El hemisferio destinado a la técnica de Fluoro-Jade® B, se sumergió en una solución compuesta por paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M durante 96 horas, posteriormente se criopreservó en sacarosa al 30% por 24 horas para completar su fijación. El hemisferio destinado a la prueba de actividad de las Caspasas 8 y 3 se

diseccionó para extraer únicamente el hipocampo, el cual una vez obtenido se colocó en un tubo Ependorff para después pesarse en una balanza analítica (Sartorius™).

Tanto el hemisferio fijado destinado a la técnica de Fluoro-Jade, como los hipocampos diseccionados para la prueba de Caspasas, se sumergieron en nitrógeno líquido para ser almacenados en un refrigerador (REVCO™) a -20°C hasta el momento de la realización del ensayo correspondiente.

5.3.4.2 Inmunofluorescencia por Fluoro-Jade® B

La técnica de Fluoro-Jade® B es una herramienta de inmunohistoquímica que se efectuó para evaluar el efecto neuroprotector del WIN ya que esta tinción sirve para evidenciar células en degeneración. Para este ensayo se utilizaron los hemisferios congelados que se mencionan anteriormente, los cuales fueron cortados en secciones longitudinales (14 µm de espesor) con la ayuda de un criostato (Leica GM 1510S, Alemania) y se montaron en portaobjetos previamente recubiertos con silano.

Se preparó la solución de tinción a partir de una solución de stock de FJ al 0.01% que se obtuvo de la adición de 10 mg de polvo de tinción (AG310-30MG, Chemicon© International, CA) en 100 mL de agua destilada. Para preparar 100 mL de la solución de tinción, se añadieron 4 mL de la solución de stock a 96 mL de ácido acético al 0.1%. Resultando en una concentración de tinción final de 0.0004%. La solución de stock, fue estable en refrigeración por varios meses, mientras que la solución de tinción fue preparada 10 minutos antes de su uso y no fue reutilizada.

La tinción con Fluoro-Jade (FJ) se realizó de la siguiente manera: El tejido se sumergió en una solución que contenía etanol al 80% y solución de hidróxido de Sodio al 1% durante 5 minutos, seguido de 2 minutos en etanol al 70% y 2 minutos en agua destilada. Después, los portaobjetos se transfirieron a una solución de permanganato de potasio al 0.06% durante 10 minutos para después enjuagarse tres veces (1 min) en agua destilada agitando suavemente. Se quitó el exceso de agua de cada portaobjetos y se colocaron en una placa donde se recubrieron con

la solución de tinción de FJ al 0.0004 % para mantenerse durante 2 h en refrigeración. Transcurrido este tiempo, cada portaobjetos fue lavado 3 veces con agua destilada durante 1 min. Después se secaron completamente y se sumergieron en xilol antes de ser cubiertos con DPX (Sigma Chem. Co., St. Louis MO), para posteriormente colocar un cubreobjetos y completar su montaje.

5.3.4.3 conteo celular

Las neuronas positivas a Fluoro-Jade (FJ+) se contaron en la región CA3 del hipocampo mediante el método descrito por Drexel (2012). Todas las imágenes se digitalizaron utilizando una cámara de congelación Evolution MP (Media Cybernetics, EE.UU.) conectada a un microscopio Axiolab (Zeiss, Alemania) y el software Image-Pro Plus 5.1 para analizar las imágenes y contar las células. El número de neuronas FJ+ en la región CA3 se contó en cada una de las tres secciones por animal usando una rejilla ocular que cubre un área de 62,500 μm^2 con un aumento de 400x y se calculó la densidad celular (células/ mm^2). Los conteos fueron realizados por un examinador cegado a los grupos experimentales.

5.3.4.4 Actividades de las Caspasas 8 y 3

Antes de realizar el ensayo de caspasas, determinamos las concentraciones de proteína de cada muestra utilizando el método de Lowry (1951) de la siguiente manera. Se utilizó la muestra del hipocampo disecado, de cada muestra se hizo una dilución 1:20 (50 μL de homogeneizado + 950 μL de agua), se pipetearon 0.4 ml de la muestra diluida y se añadieron 2 mL de la siguiente solución: 49 mL de Na_2CO_3 al 2% + 0.5 mL de CuSO_4 al 1%. Diez minutos después, se añadió el reactivo de fenol de folin 1:1 (0.2 mL por muestra) y se leyó la absorbancia después de 30 minutos en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin-Elmer mod. Lambda 20 utilizando una longitud de onda de 550 nm.

La actividad de la Caspasa 8 se midió usando el Kit de Ensayo Colorimétrico (APT 171 Merck Millipore) que reconoce la secuencia de aminoácidos IETD. Este ensayo se basa en la detección del cromóforo p-nitroanilina (pNA) después de la escisión del sustrato marcado IETD-pNA. Asimismo, la actividad de la Caspasa 3 se midió

usando un kit de ensayo colorimétrico (APT165 Merck Millipore) que identifica la secuencia de aminoácidos DEVD. Este ensayo se basa en la detección del cromóforo p-nitroanilina (pNA) después de la escisión del sustrato marcado DEVD-pNA. Todas las actividades se midieron a 405 nm, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis de microplaca (BioTek Eon™).

5.4 Análisis de datos y estadística

Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar (EE). Se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar la distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas, aplicando la prueba de Levene.

Las diferencias significativas en la potencia espectral total y la frecuencia se analizaron mediante ANOVA de una vía de medidas repetidas, seguido de la prueba de Dunnett. Los resultados de las actividades de las Caspasas 8 y 3, y la valoración de las neuronas en degeneración positivas a FJ, también se evaluaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett.

Los análisis de los datos experimentales se realizaron con un software IBM SPSS statistics v. 22.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan como: la media \pm EE (error estándar).

6. Resultados

6.1 Efecto de WIN 55,212-2 en la potencia espectral y la frecuencia media de la señal del EEG, inducida por KA

Los registros de EEG de la corteza motora por tratamiento en los 5 puntos de tiempo evaluados, se muestran en la fig. 22, donde cada uno corresponde a T1 = basal; T2 = *status epilepticus* (SE); períodos post-tratamiento T3 = 1h, T4 = 2h y T5 = 24h. Los datos obtenidos del registro encefalográfico fueron normalizados para ser comparables entre individuos y grupos debido a la diferencia de conductancia entre cada electrodo implantado. La fig. 23 muestra los resultados de la actividad eléctrica convulsiva, medida como la potencia espectral total a través de la transformada de Fourier, durante 10 s. Los valores se expresan como la media \pm EE.

A 1 h de la aplicación del tratamiento encontramos una disminución significativa de la potencia espectral únicamente en el grupo KA + WIN 1.5mg ($7.865 \pm 1.336 \mu V^2$) y en el control positivo KA + DZP ($1.320 \pm 0.602 \mu V^2$) en comparación con KA + Veh ($19.261 \pm 3.205 \mu V^2$); después de 2 h, se encontraron diferencias significativas entre KA + WIN 1.5mg ($4.873 \pm 1.339 \mu V^2$), KA + WIN 3mg ($8.140 \pm 5.198 \mu V^2$) y KA + DZP ($0.979 \pm 0.469 \mu V^2$) en comparación con KA + Veh ($18.521 \pm 5.018 \mu V^2$). Finalmente, a las 24 h después de la administración del tratamiento, encontramos una disminución significativa en todos los grupos de tratamiento, KA + WIN 1.5mg ($0.940 \pm 0.204 \mu V^2$), KA + WIN 3mg ($1.909 \pm 0.448 \mu V^2$) y KA + DZP ($0.578 \pm 0.140 \mu V^2$) en comparación con el grupo KA + Veh ($2.338 \pm 0.620 \mu V^2$). Se debe tener en cuenta que tanto el WIN 1.5mg como el DZP redujeron la potencia espectral ($p < 0.05$) de acuerdo al ANOVA de una vía de medidas repetidas seguido por la prueba de Dunnett.

Por otro lado, los resultados de la frecuencia se muestran en la fig. 24, y los valores se expresan como la media \pm EE. Los grupos KA + WIN 1.5mg (0.930 ± 0.143 Hz), KA + WIN 3mg (0.686 ± 0.034 Hz) y KA + DZP (0.955 ± 0.092 Hz) no mostraron un aumento significativo en comparación con KA + Veh (0.834 ± 0.110 Hz); a las 2 h el grupo KA + WIN 1.5mg (0.760 ± 0.127 Hz), KA + WIN 3mg (0.872 ± 0.086 Hz) y KA + DZP (1.213 ± 0.121 Hz) no mostraron un aumento significativo en comparación

con KA + Veh (0.809 ± 0.099 Hz). Finalmente, a las 24 h después de la administración de KA, tampoco se observó un aumento significativo nuevamente en los grupos KA + WIN 1.5mg (0.718 ± 0.061 Hz), KA + WIN 3mg (0.566 ± 0.040 Hz) y KA + DZP (0.950 ± 0.082 Hz) en comparación con KA + Veh (0.678 ± 0.125 Hz), según el ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett ($p > 0.05$).

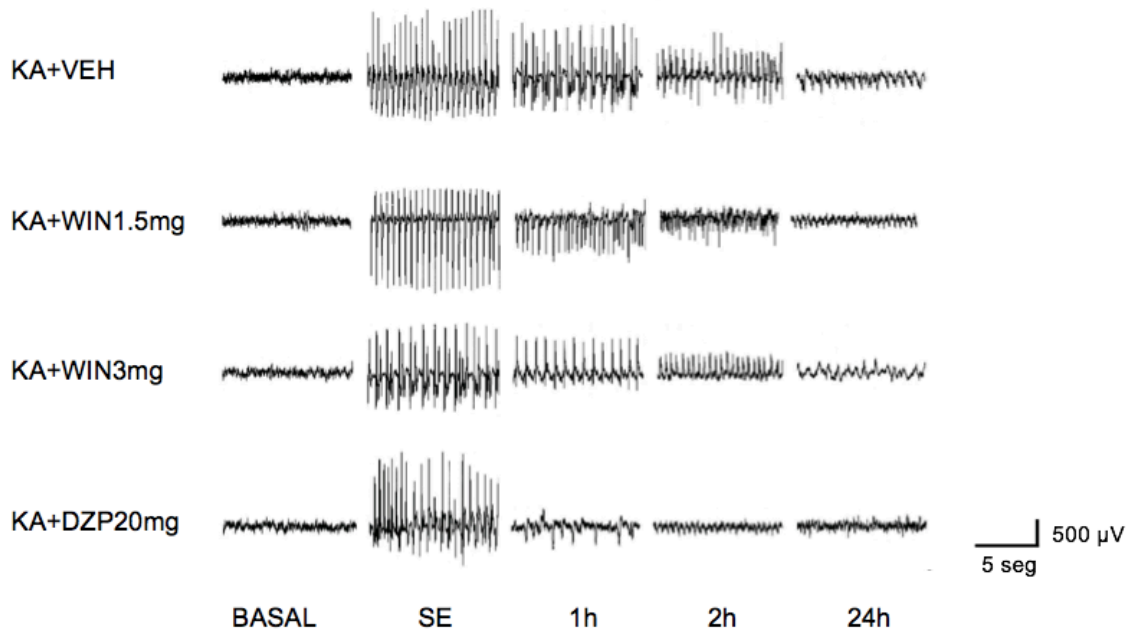


Figura 22. Registro electroencefalográfico (EEG) representativo de la corteza motora por tratamiento, en 5 períodos diferentes: Valor basal; *Status Epilepticus* (SE) 1, 2 y 24 h después de la administración del tratamiento.

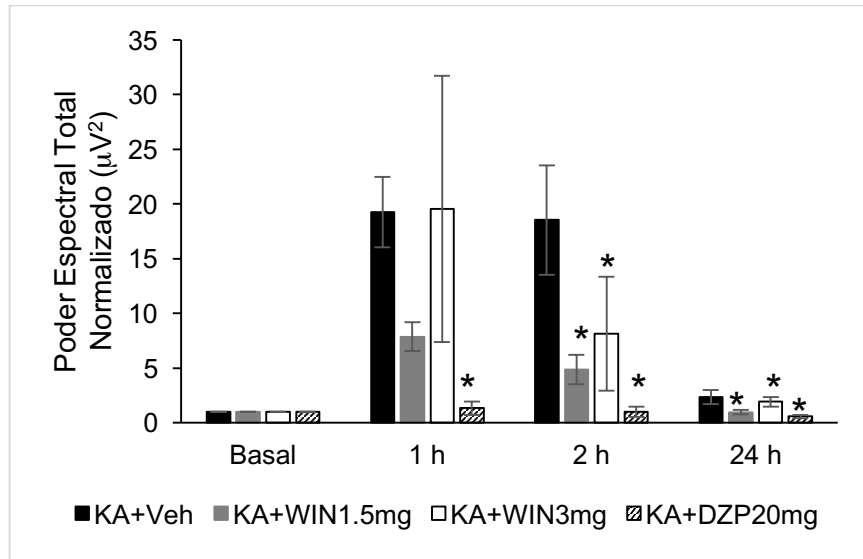


Figura 23. Efecto de los tratamientos sobre la adquisición del EEG. Muestra el resultado del método de la transformada de Fourier para estimar la potencia espectral total (μV^2) de la señal de EEG de los diferentes tratamientos. Se removieron los datos del punto de tiempo de SE para facilitar la observación comparativa de los puntos de tiempo restantes. Los resultados se expresan como el promedio \pm EE y se analizaron utilizando un ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett. *Diferente del grupo Veh ($p < 0.05$).

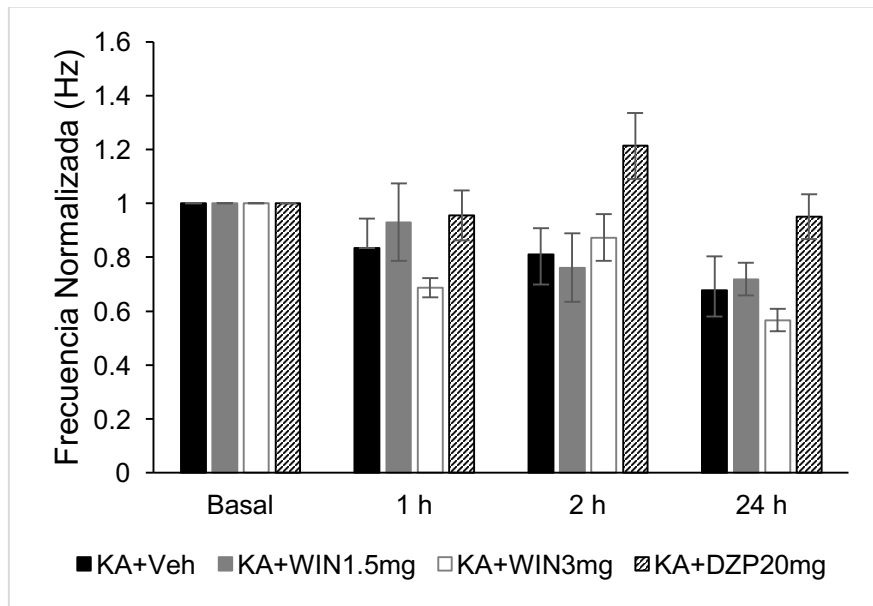


Figura 24. Efecto de los tratamientos sobre la frecuencia del EEG (Hz). Se removieron los datos del punto de tiempo de SE para facilitar la

observación comparativa de los puntos de tiempo restantes. Los resultados se expresan como el promedio \pm EE y se analizaron utilizando un ANOVA de medidas repetidas seguido de la prueba de Dunnett.

6.2 Efecto neuroprotector de WIN 55,212-2 evaluado como el número de células degeneradas mediante la técnica de Fluoro-Jade® B

La fig. 25 muestra imágenes histológicas representativas de la tinción de Fluoro-Jade (FJ) de las neuronas piramidales en degeneración de la región CA3 del hipocampo de los animales tratados, así como de los que recibieron solo KA + Veh (grupo control). Todos los animales se sacrificaron 24.5 h después de la administración del tratamiento y el número de células en degeneración de los grupos KA + WIN 1.5mg (87.333 ± 10.525), KA + WIN 3mg (95.666 ± 9.333) y KA + DZP (88.666 ± 7.512) no fue diferente del grupo KA + Veh (82 ± 8.386). ($p > 0.05$, ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett) y se representan gráficamente en la fig. 26.

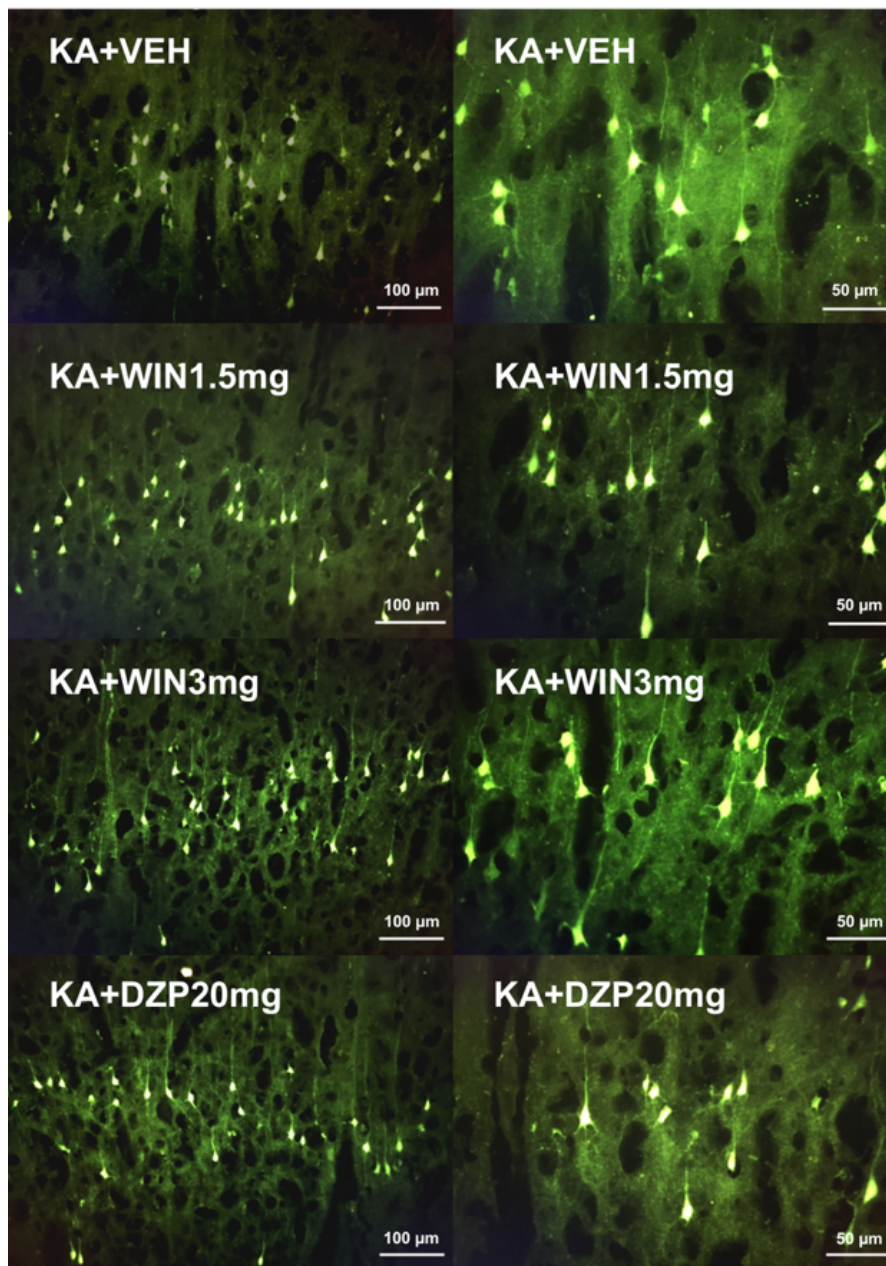


Figura 25. Micrografías representativas de las células positivas a Fluoro-Jade® B en la región CA3 para cada uno de los grupos a una escala de 400 μm y 200 μm.

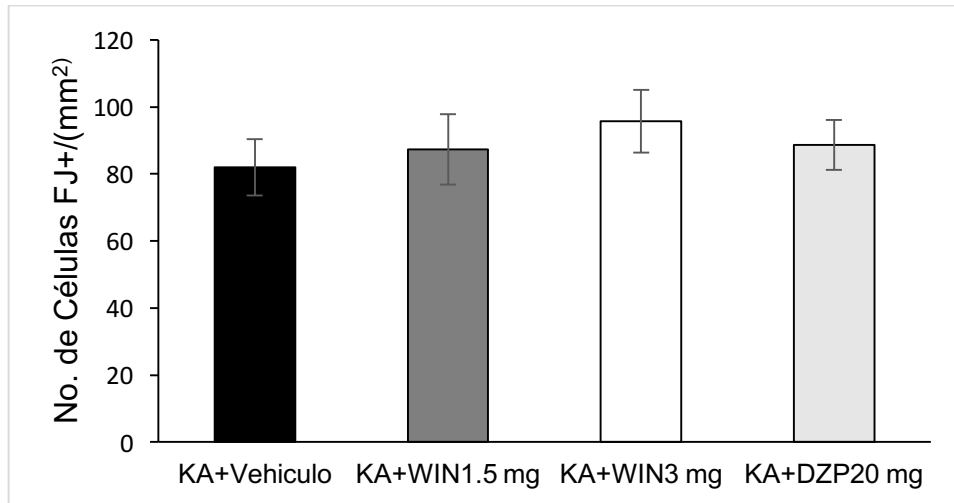


Figura 26. Número de células positivas a Fluoro-Jade por mm². Los resultados representan el valor promedio \pm el error estándar de 3 animales por grupo. El análisis de datos mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett, no muestra diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando se compara con el grupo control.

6.3. Efecto antiapoptótico de WIN 55,212-2 evaluado como la actividad de las Caspasas 8 y 3 a las 24 h posteriores al tratamiento

La activación de la vía intrínseca de la apoptosis se evaluó a través de la actividad de la Caspasa 8. Los resultados de la actividad de la Caspasa 8 por grupo se muestran en la fig. 27. Los valores se expresan en unidades de fluorescencia por mg de proteína por hora y representan la media \pm EE de 4-6 animales por grupo. Como se puede ver, no hay una disminución significativa en la actividad de la caspasa ($p > 0.05$) en los grupos KA + WIN 1.5mg (71.016 ± 7.991), KA + WIN 3mg (76.043 ± 8.901) y KA + DZP (70.612 ± 11.200) en comparación con el grupo KA + Veh (76.957 ± 6.902).

En cuanto a la actividad de la Caspasa 3, los resultados se muestran en la fig. 28. Al igual que en el caso de la Caspasa 8, no se registró una disminución de la actividad de la Caspasa 3 en ninguno de los grupos con tratamiento, siendo KA + WIN 1.5mg (106.177 ± 9.980), KA + WIN 3mg (96.526 ± 9.559) y KA + DZP (96.016 ± 10.937) comparados con el grupo KA + Veh (100.774 ± 6.136), $p > 0.05$.

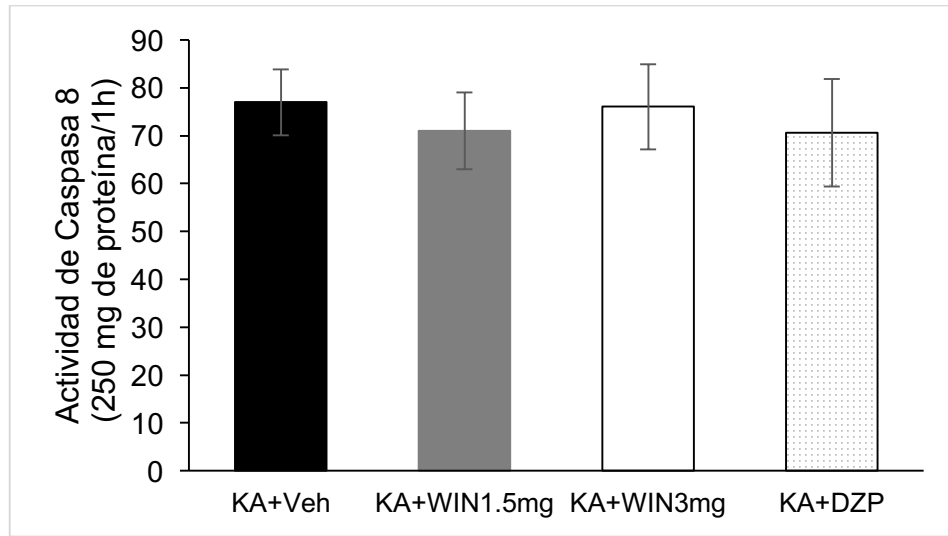


Figura 27. Actividad de la Caspasa 8 en cada grupo de tratamiento. Los resultados se expresan como unidades de color que representan la actividad por mg de proteína por 1 hora y corresponden al valor promedio \pm EE de 4 a 6 animales por grupo. Sin diferencia significativa ($p > 0.05$). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

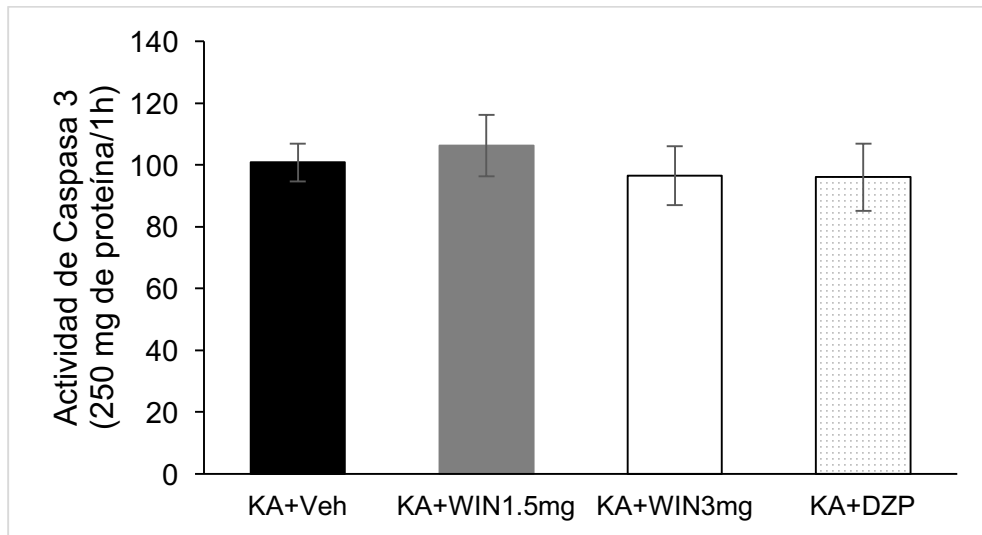


Figura 28. Actividad de la Caspasa 3 en cada grupo de tratamiento. Los resultados se expresan como unidades de color que representan la actividad por mg de proteína por 1 hora y corresponden al valor promedio \pm EE de 4 a 6 animales por grupo. Sin diferencia significativa ($p > 0.05$). ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

7. Discusión

En el presente estudio, observamos una reducción de la actividad eléctrica convulsiva en todos los grupos de tratamiento. En el control positivo, la acción del Diazepam induce una respuesta GABAérgica mejorada, disminuyendo la susceptibilidad de las neuronas a la descarga. Y en los grupos con WIN 55,212-2, la eficacia anticonvulsiva está mediada principalmente por la modulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} y la inhibición de los canales de calcio de tipo T (Ryan *et al.*, 2009) a través del agonismo al receptor CB1, que finalmente modula la liberación de glutamato y GABA (Lutz, 2004). El efecto anticonvulsivo que resulta del agonismo al CB1R se apoya también de la evidencia de que los antagonistas del CB1R pueden exacerbar las convulsiones en modelos de epilepsia (Vinogradova *et al.*, 2011), e incluso en dosis bajas pueden bloquear el efecto anticonvulsivo de agonistas como el WIN 55,212-2 (Di Maio *et al.*, 2015).

Los cannabinoides siguen una curva de dosis-respuesta en forma de campana (Petwee, 2004), lo que sugiere que la dosis es un factor clave en su farmacología y eficacia. De hecho, a concentraciones altas pueden tener efectos neurotóxicos, ya que pueden conducir a una señalización alterada del receptor acoplado a la proteína G huérfano, Receptor de Potencial Transitorio Melastatina 8 (TRPM8) (Pertwee, 2008), que conduce a la muerte celular excitotóxica (Moran *et al.*, 2004), así como el Receptor de Potencial Transitorio de los canales Vaniloides (TRPV1, TRPV2) (Leweke *et al.*, 2012; Pertwee, 2010), que participa en las respuestas proinflamatorias en el SNC (Rogoz *et al.*, 2014). Particularmente, WIN 55,212-2 tiene una acción bifásica: a bajas concentraciones protege las neuronas mediante la activación de los receptores CB1, y a concentraciones altas activa adicionalmente el Receptor de Potencial Transitorio Anquirina 1 (TRPA1) que interfiere con la neuroprotección mediada por el receptor CB1 (Koch, 2011). Otras hipótesis que tratan explicar los efectos bifásicos *in vivo* de los cannabinoides favorecen principalmente la existencia de dos módulos estructurales distintos funcionalmente opuestos (receptores/proteínas G) responsables de las acciones estimulantes e inhibitorias (Tzavara *et al.*, 2003). Aunque los CB1R median la mayoría de las

acciones farmacológicas de los cannabinoides a nivel del SNC (Chaperon y Thiebot, 1999), los efectos informados de algunos agonistas que no son responsables de los receptores CB1/CB2, incluido WIN55,212-2, sugieren la existencia de un receptor cannabinoide putativo (Breivogel *et al.*, 2001; Monory *et al.*, 2002). Se propuso la participación diferencial del receptor cannabinoide putativo frente al CB1R en la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica del hipocampo (Hájos *et al.*, 2001). La diferencia en la excitabilidad neta de las sinapsis del hipocampo, atribuible a las acciones cannabinoides preferenciales sobre las vías aferentes glutamatérgicas versus las vías aferentes GABAérgicas, también podría explicar los efectos bifásicos (Tzavara *et al.*, 2003). Por otro lado, dado que los receptores cannabinoides están ampliamente distribuidos por todo el cerebro, y están involucrados en numerosos sistemas neuronales, podría esperarse que la administración sistémica de fármacos cannabinoides pudiera activar diferentes redes y dar lugar a efectos opuestos (Sarne, 2019).

Se especula que efectos inhibitorios son mediados en el hipocampo, y los efectos excitatorios se regulan en el septum (Tzavara *et al.*, 2003). Por ejemplo, en un estudio la inyección de WIN 55,212-2 en ratas indujo tanto la estimulación transitoria como la inhibición prolongada de la liberación de acetilcolina del hipocampo cuando el efecto estimulante fue mediado por los receptores CB1 en el septum e involucró los receptores de dopamina D1, mientras que el efecto inhibitorio fue mediado por los receptores CB1 en el hipocampo e involucró los receptores de dopamina D2 (Tzavara *et al.*, 2003). Otro ejemplo de dos sistemas endógenos opuestos que son activados por los cannabinoides es el control bimodal de la ingesta de alimentos, con hiperfagia inducida por cannabinoides mediada por neurotransmisión glutamatérgica e hipofagia inducida por cannabinoides mediada por neurotransmisión GABAérgica (Bellocchio *et al.*, 2010). Un desequilibrio similar entre las señales estimuladoras (glutamatérgicas) e inhibitorias (GABAérgicas) puede ser la base de los efectos pro y anticonvulsivos de diferentes agonistas cannabinoides (Funada y Takebayashi-Ohsawa, 2018). Aunque también una fuente adicional para la heterogeneidad del efecto cannabinoide podría residir en la

diferente cantidad y velocidad de desensibilización inducida por los agonistas cannabinoides totales y parciales (Keren y Sarne, 2003).

Por otro lado, en este estudio no observamos un efecto neuroprotector o antiapoptótico del WIN 55,212-2 incluso cuando los cannabinoides son conocidos por su potente eficacia antioxidante y antiinflamatoria (Walter y Stella, 2004). De hecho, en un estudio donde se administró WIN 55,212-2 posterior a la inducción del SE (Suleymanova *et al.*, 2016) se obtuvieron hallazgos similares a los nuestros en cuanto a la neuroprotección evaluada en la región CA3 del hipocampo, demostrando que ésta región es particularmente vulnerable al daño inducido por el SE.

El grupo con Diazepam, al igual que los demás grupos de tratamiento, mostró cambios neurodegenerativos importantes resultando en un número alto de células FJ+ y una alta actividad de caspasas, dados los rápidos cambios de degeneración después del inicio del SE (Bumanglag y Sloviter, 2008; Karlócai *et al.*, 2011). Las benzodiazepinas son muy efectivas cuando se administran de forma temprana, sin embargo, si el tratamiento se aplica a los 30 minutos después del inicio de la convulsión, como es el caso del presente trabajo, las benzodiazepinas son menos efectivas para terminar con la actividad convulsiva inducida por agentes químicos (McDonough *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2012). Este mecanismo se ha asociado a la activación de los receptores de NMDA a través de los cuales aumentan los niveles de calcio intracelular, lo que a su vez conduce a la internalización de los receptores de GABA_A dependientes de la calcineurina, como lo demostraron Joshi *et al.* (2015), utilizando técnicas de grabación de parches de células enteras (*patch-clamp*) de células granulares dentadas en cortes de hipocampo. También se ha descrito que el aumento de la expresión del receptor de NMDA en las células excitatorias (Naylor *et al.*, 2013) y los receptores AMPA (AMPA) pierden su subunidad de GluA2, haciendo que el receptor sea más permeable al calcio. Todos esos cambios pueden contribuir a la acumulación de calcio, lo que posiblemente conduzca a la muerte neuronal (Rajasekaran *et al.*, 2012).

El daño celular a la región del hipocampo CA3 se debe a la alta expresión de los receptores de kainato en las células GABAérgicas, lo que lleva a un mayor

desarrollo de epileptogénesis (Vivash *et al.*, 2011). De hecho, la asociación entre el aumento del calcio intracelular y la muerte celular en los modelos de SE *in vitro* e *in vivo* (Deshpande *et al.*, 2008; Schauwecker, 2010) ha sido documentada ampliamente. Una consecuencia de la acumulación de calcio intracelular por la activación excesiva de los receptores de NMDA es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que a su vez pueden contribuir a la muerte celular a través de la peroxidación lipídica, la inactivación de enzimas, la apertura de mPTP y el daño al ADN, y puede inhibir directamente la actividad del complejo mitocondrial reduciendo la producción de ATP (Walker, 2018). Asimismo, la entrada de calcio puede activar varias enzimas que han estado implicadas en la muerte neuronal por apoptosis a través de la activación de la caspasa 3, así lo informaron Henshall *et al.* (2000) en un modelo de SE inducido con KA.

Teniendo en cuenta los principales mecanismos que caracterizan la fisiopatología del SE, los hallazgos encontrados en este estudio demuestran que el WIN administrado durante el SE, no implica ningún efecto neuroprotector o antiapoptótico y a una dosis de 1.5 mg/Kg puede representar un tratamiento con potencial para el control de la actividad convulsiva durante el *status epilepticus*.

8. Conclusiones

A partir de la evaluación electroencefalográfica del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 administrado durante el *status epilepticus* en un modelo experimental de ácido kaínico en ratas, se puede concluir que es efectivo para el control de las convulsiones en la dosis de 1.5 mg/Kg reduciendo la potencia espectral y aumentando la frecuencia media de la señal de EEG. La actividad electrográfica está relacionada con la dosis de WIN 55,212-2 ya que la dosis de 3 mg/Kg de WIN controló las convulsiones a partir de las 2h posteriores de administración del tratamiento y la dosis de 1.5 mg/Kg lo hizo a partir de 1 h post-tratamiento.

No observamos efecto neuroprotector de WIN 55,212-2 durante el SE evaluado como el número de células piramidales degeneradas en la región CA3 del hipocampo y la gravedad del daño neuronal es nulo, ya que a partir de la técnica de tinción de Fluoro-Jade® B y la medición de actividad de caspasas, no hubo una diferencia entre las células en degeneración del grupo control y de los grupos con tratamiento.

El tratamiento con WIN representa una alternativa para el control de las convulsiones en dosis de 1.5 mg/Kg pero no implica ningún efecto neuroprotector o antiapoptótico.

9. Bibliografía

- Adrian E. D. (1936). The spread of activity in the cerebral cortex. *The Journal of physiology*, 88(2), 127–161. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1936.sp003427>
- Alger B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in neurobiology*, 68(4), 247–286. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(02\)00080-1](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(02)00080-1)
- Ameri A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in neurobiology*, 58(4), 315–348. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00087-2](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00087-2)
- Ameri, A., & Simmet, T. (2000). Effects of 2-arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 361(3), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s002109900200>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & Keefe, J. (2006). The Hippocampus Book. 10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001.
- Aronica, E., & Gorter, J. A. (2007). Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(2), 100–108. <https://doi.org/10.1177/1073858406295832>
- Auclair, N., Otani, S., Soubrie, P., & Crepel, F. (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 83(6), 3287–3293. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.6.3287>
- Azad, S. C., Eder, M., Marsicano, G., Lutz, B., Zieglgänsberger, W., & Rammes, G. (2003). Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 10(2), 116–128. <https://doi.org/10.1101/lm.53303>
- Babu N, A. (2016). *Filling of Gaps in Sea Surface Temperature Using Artificial Neural Network*. University of Hyderabad. India. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33600.64004>
- Bak, P., Tang, C., & Wiesenfeld, K. (1987). Self-organized criticality: An explanation of the 1/f noise. *Physical review letters*, 59(4), 381–384. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.59.381>
- Bal-Price, A., & Brown, G. C. (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *The Journal of neuroscience* :

- the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), 6480–6491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06480.2001>
- Banerjee, S., & Bhat, M. A. (2007). Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annual review of neuroscience*, 30, 235–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094345>
 - Baram TZ, Gerth A, Schultz L. Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997;98(2):265-270. doi:10.1016/s0165-3806(96)00190-3
 - Bartsch, V., Díaz, J., González, I., Cavada, G., Ocampo-Garcés, A., & Wyneken, U. (2014). Electroencephalographic characterization of pentylenetetrazole kindling in rats and modulation of epileptiform discharges by nitric oxide. *Neurochemical research*, 39(2), 408–418. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1237-y>
 - Begg, M., Pacher, P., Bátikai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F. M., Liu, J., & Kunos, G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 106(2), 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.005>
 - Bell, R. M., & Malick, J. B. (1976). Enkephalins and endorphins: a major discovery. *JAMA*, 236(25), 2887–2888.
 - Bellocchio, L., Lafenêtre, P., Cannich, A., Cota, D., Puente, N., Grandes, P., Chaouloff, F., Piazza, P. V., & Marsicano, G. (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nature neuroscience*, 13(3), 281–283. <https://doi.org/10.1038/nn.2494>
 - Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5329), 1094–1097. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1094>
 - Ben-Ari, Y., & Cossart, R. (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends in neurosciences*, 23(11), 580–587. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01659-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01659-3)
 - Ben-Ari, Y., & Lagowska, J. (1978). Action épileptogène induite par des injections intraamygdaliennes d'acide kainique [Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, 287(8), 813–816.
 - Benarroch E. E. (2014). Synaptic effects of cannabinoids: complexity, behavioral effects, and potential clinical implications. *Neurology*, 83(21), 1958–1967. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001013>

- Berg A. T. (2008). The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. *Current opinion in neurology*, 21(2), 173–178. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282f36ccd>
- Besson, P. (2017). *Using of transcranial direct-current stimulation during motor task for a better outcome*. Université Montpellier. Francia.
- Bialer, M., & White, H. S. (2010). Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(1), 68–82. <https://doi.org/10.1038/nrd2997>
- Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., & Howlett, A. C. (1990). Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *Journal of neurochemistry*, 55(1), 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb08815.x>
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E. J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., & Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *The Journal of cell biology*, 163(3), 463–468. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305129>
- Blair, R. E., Deshpande, L. S., Sombati, S., Falenski, K. W., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2006). Activation of the cannabinoid type-1 receptor mediates the anticonvulsant properties of cannabinoids in the hippocampal neuronal culture models of acquired epilepsy and status epilepticus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 317(3), 1072–1078. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.100354>
- Blume, W. T., Lüders, H. O., Mizrahi, E., Tassinari, C., van Emde Boas, W., & Engel, J., Jr (2001). Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, 42(9), 1212–1218. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.22001.x>
- Bonneton, J., Iliadis, A., Genton, P., Dravet, C., Viallat, D., & Mesdjian, E. (1993). Steady state pharmacokinetics of conventional versus controlled-release carbamazepine in patients with epilepsy. *Epilepsy research*, 14(3), 257–263. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(93\)90050-h](https://doi.org/10.1016/0920-1211(93)90050-h)
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *The Biochemical journal*, 312 (Pt 2)(Pt 2), 637–641. <https://doi.org/10.1042/bj3120637>
- Bouchet, C. & Cazauvieilh, J.B. (1825). De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. *Archives générales de médecine*, 9. 510-542.

- Bradford H. F. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress in neurobiology*, 47(6), 477–511. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00030-5](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00030-5)
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90104-I](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90104-I)
- Breivogel, C. S., Griffin, G., Di Marzo, V., & Martin, B. R. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Molecular pharmacology*, 60(1), 155–163.
- Bröer, S., Zolkowska, D., Gernert, M., & Rogawski, M. A. (2013). Proconvulsant actions of intrahippocampal botulinum neurotoxin B in the rat. *Neuroscience*, 252, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.050>
- Buckmaster, P. S., & Dudek, F. E. (1997). Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *The Journal of comparative neurology*, 385(3), 385–404.
- Bumanglag, A. V., & Sloviter, R. S. (2008). Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *The Journal of comparative neurology*, 510(6), 561–580. <https://doi.org/10.1002/cne.21801>
- Buzsáki G. (1997). Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(5), 508–515.
- Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L., & Piomelli, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(12), 3934–3942. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-12-03934.1996>
- Caterina M. J. (2014). TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. *ACS chemical neuroscience*, 5(11), 1107–1116. <https://doi.org/10.1021/cn5000919>
- Cavazos, J. E., & Sutula, T. P. (1990). Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain research*, 527(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91054-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91054-k)
- Chan, P. K., Chan, S. C., & Yung, W. H. (1998). Presynaptic inhibition of GABAergic inputs to rat substantia nigra pars reticulata neurones by a cannabinoid agonist. *Neuroreport*, 9(4), 671–675. <https://doi.org/10.1097/00001756-199803090-00020>
- Chan, P. K., & Yung, W. H. (1998). Occlusion of the presynaptic action of cannabinoids in rat substantia nigra pars reticulata by cadmium.

- Neuroscience letters*, 249(1), 57–60. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00396-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00396-6)
- Chaperon, F., & Thiébot, M. H. (1999). Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Critical reviews in neurobiology*, 13(3), 243–281. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v13.i3.20>
 - Chen, J. W., Naylor, D. E., & Wasterlain, C. G. (2007). Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 186, 7–15.
 - Chen, J. W., & Wasterlain, C. G. (2006). Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *The Lancet. Neurology*, 5(3), 246–256. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70374-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70374-X)
 - Chesher, G. B., & Jackson, D. M. (1974). Anticonvulsant effects of cannabinoids in mice: drug interactions within cannabinoids and cannabinoid interactions with phenytoin. *Psychopharmacologia*, 37(3), 255–264. <https://doi.org/10.1007/BF00421539>
 - Choy, M., Wells, J. A., Thomas, D. L., Gadian, D. G., Scott, R. C., & Lythgoe, M. F. (2010). Cerebral blood flow changes during pilocarpine-induced status epilepticus activity in the rat hippocampus. *Experimental neurology*, 225(1), 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.06.015>
 - Cock, H. R., Tong, X., Hargreaves, I. P., Heales, S. J., Clark, J. B., Patsalos, P. N., Thom, M., Groves, M., Schapira, A. H., Shorvon, S. D., & Walker, M. C. (2002). Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. *Epilepsy research*, 48(3), 157–168. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(01\)00334-5](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(01)00334-5)
 - Colasanti, B. K., Lindamood, C., 3rd, & Craig, C. R. (1982). Effects of marijuana cannabinoids on seizure activity in cobalt-epileptic rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 16(4), 573–578. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90418-x)
 - Compton, D. R., Gold, L. H., Ward, S. J., Balster, R. L., & Martin, B. R. (1992). Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 263(3), 1118–1126.
 - Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37, 205–237. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205>
 - Consroe, P., Martin, P., & Eisenstein, D. (1977). Anticonvulsant drug antagonism of delta9tetrahydrocannabinol-induced seizures in rabbits. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 16(1), 1–13.

- Corcoran, M. E., McCaughran, J. A., Jr, & Wada, J. A. (1973). Acute antiepileptic effects of 9-tetrahydrocannabinol in rats with kindled seizures. *Experimental neurology*, 40(2), 471–483. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(73\)90088-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(73)90088-5)
- Coull, M. A., Johnston, A. T., Pertwee, R. G., & Davies, S. N. (1997). Action of delta-9-tetrahydrocannabinol on GABA(A) receptor-mediated responses in a grease-gap recording preparation of the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology*, 36(10), 1387–1392. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(97\)00110-x](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(97)00110-x)
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), 83–87. <https://doi.org/10.1038/384083a0>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- David, Y., Cacheaux, L. P., Ivens, S., Lapilover, E., Heinemann, U., Kaufer, D., & Friedman, A. (2009). Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis?. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(34), 10588–10599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-09.2009>
- Davis, J.P., & Ramsey, H.H. (1949). Antiepileptic action of marijuana-active substances. *Federation Proceedings, Federation of American Society for Experimental Biology*, 8. 284–285.
- De Lanerolle, N. C., Kim, J. H., Robbins, R. J., & Spencer, D. D. (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain research*, 495(2), 387–395. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90234-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90234-5)
- De Vries, H. E., Kuiper, J., de Boer, A. G., Van Berkel, T. J., & Breimer, D. D. (1997). The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacological reviews*, 49(2), 143–155.
- Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Mu, J., Whyte, A., & Childers, S. (1995). Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 273(2), 734–743.
- Deshpande, L. S., Blair, R. E., Ziobro, J. M., Sombati, S., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2007a). Endocannabinoids block status epilepticus in cultured hippocampal neurons. *European journal of pharmacology*, 558(1-3), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.030>

- Deshpande, L. S., Sombati, S., Blair, R. E., Carter, D. S., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2007b). Cannabinoid CB1 receptor antagonists cause status epilepticus-like activity in the hippocampal neuronal culture model of acquired epilepsy. *Neuroscience letters*, *411*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.09.046>
- Deshpande, L. S., Lou, J. K., Mian, A., Blair, R. E., Sombati, S., Attkisson, E., & DeLorenzo, R. J. (2008). Time course and mechanism of hippocampal neuronal death in an in vitro model of status epilepticus: role of NMDA receptor activation and NMDA dependent calcium entry. *European journal of pharmacology*, *583*(1), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.025>
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, *34*(5), 605–613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *258*(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
- Dewey W. L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological reviews*, *38*(2), 151–178.
- Di Maio, R., Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2015). Post-status epilepticus treatment with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents chronic epileptic hippocampal damage in rats. *Neurobiology of disease*, *73*, 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.018>
- Di Marzo, V., Breivogel, C. S., Tao, Q., Bridgen, D. T., Razdan, R. K., Zimmer, A. M., Zimmer, A., & Martin, B. R. (2000). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *Journal of neurochemistry*, *75*(6), 2434–2444. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0752434.x>
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, *372*(6507), 686–691. <https://doi.org/10.1038/372686a0>
- Diana, M. A., & Marty, A. (2004). Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *British journal of pharmacology*, *142*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705726>
- Diaz-Ruiz, A., Zavala, C., Montes, S., Ortiz-Plata, A., Salgado-Ceballos, H., Orozco-Suarez, S., Nava-Ruiz, C., Pérez-Neri, I., Perez-Severiano, F., &

- Ríos, C. (2008). Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperfusion in rats. *Journal of neuroscience research*, 86(15), 3410–3419. <https://doi.org/10.1002/jnr.21775>
- Diaz-Ruiz, A., Mendez-Armenta, M., Galván-Arzate, S., Manjarrez, J., Nava-Ruiz, C., Santander, I., Balderas, G., & Ríos, C. (2013). Antioxidant, anticonvulsive and neuroprotective effects of dapsone and phenobarbital against kainic acid-induced damage in rats. *Neurochemical research*, 38(9), 1819–1827. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1087-z>
 - Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S., & Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10819–10824. <https://doi.org/10.1073/pnas.152334899>
 - Doherty, J., & Dingledine, R. (2003). Functional interactions between cannabinoid and metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *Current opinion in pharmacology*, 3(1), 46–53. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(02\)00014-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(02)00014-0)
 - Dragoi, G., & Buzsáki, G. (2006). Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron*, 50(1), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.023>
 - Drexel, M., Preidt, A. P., & Sperk, G. (2012). Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology*, 63(5), 806–817. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.009>
 - Duan, Y., Gross, R. A., & Sheu, S. S. (2007). Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *The Journal of physiology*, 585(Pt 3), 741–758. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145409>
 - Dwivedi, C., & Harbison, R. D. (1975). Anticonvulsant activities of delta-8 and delta-9 tetrahydrocannabinol and uridine. *Toxicology and applied pharmacology*, 31(3), 452–458. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(75\)90268-9](https://doi.org/10.1016/0041-008x(75)90268-9)
 - Errante, L. D., & Petroff, O. A. (2003). Acute effects of gabapentin and pregabalin on rat forebrain cellular GABA, glutamate, and glutamine concentrations. *Seizure*, 12(5), 300–306. [https://doi.org/10.1016/s1059-1311\(02\)00295-9](https://doi.org/10.1016/s1059-1311(02)00295-9)
 - Falenski, K. W., Blair, R. E., Sim-Selley, L. J., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2007). Status epilepticus causes a long-lasting redistribution of hippocampal cannabinoid type 1 receptor expression and function in the rat

- pilocarpine model of acquired epilepsy. *Neuroscience*, 146(3), 1232–1244. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.065>
- Falenski, K. W., Carter, D. S., Harrison, A. J., Martin, B. R., Blair, R. E., & DeLorenzo, R. J. (2009). Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB(1) receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain research*, 1262, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.036>
 - Felder, C. C., Briley, E. M., Axelrod, J., Simpson, J. T., Mackie, K., & Devane, W. A. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), 7656–7660. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.16.7656>
 - Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43(5), 729–743. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.011>
 - Fezza, F., Bisogno, T., Minassi, A., Appendino, G., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2002). Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS letters*, 513(2-3), 294–298. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02341-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02341-4)
 - Fisher R. S. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain research. Brain research reviews*, 14(3), 245–278. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(89\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0165-0173(89)90003-9)
 - Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
 - Flores, A., Maldonado, R., & Berrendero, F. (2013). Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Frontiers in neuroscience*, 7, 256. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00256>
 - Foresti, M. L., Arisi, G. M., & Shapiro, L. A. (2011). Role of glia in epilepsy-associated neuropathology, neuroinflammation and neurogenesis. *Brain research reviews*, 66(1-2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.09.002>
 - Franco-Pérez, J., Ballesteros-Zebadúa, P., & Manjarrez-Marmolejo, J. (2015). Anticonvulsant effects of mefloquine on generalized tonic-clonic

- seizures induced by two acute models in rats. *BMC neuroscience*, 16, 7. <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0145-7>
- Freiman, I., & Szabo, B. (2005). Cannabinoids depress excitatory neurotransmission between the subthalamic nucleus and the globus pallidus. *Neuroscience*, 133(1), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.058>
 - Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews*, 83(3), 1017–1066. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2003>
 - Freund, T. F., & Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6(4), 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I)
 - Funada, M., & Takebayashi-Ohsawa, M. (2018). Synthetic cannabinoid AM2201 induces seizures: Involvement of cannabinoid CB₁ receptors and glutamatergic transmission. *Toxicology and applied pharmacology*, 338, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.007>
 - Gaoni, Y. & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*. 86. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>
 - Gerdeman, G., & Lovinger, D. M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *Journal of neurophysiology*, 85(1), 468–471. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.1.468>
 - Gessa, G. L., Mascia, M. S., Casu, M. A., & Carta, G. (1997). Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *European journal of pharmacology*, 327(1), R1–R2. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)89683-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)89683-5)
 - Giang, D. K., & Cravatt, B. F. (1997). Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2238–2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2238>
 - Gidal, B.E., Anderson, G.D., Spencer, N.W., Maly, M.M., Murty, J., Pitterie, M.E., Collins, D.M & Davis, L.A (1996) Valproate-associate weight gain: Potential relation to energy expenditure and metabolism in patients with epilepsy. *Journal of Epilepsy*, 9 (4), 234 – 241. [https://doi.org/10.1016/S0896-6974\(96\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6974(96)00041-2)
 - Gifford, A. N., & Ashby, C. R., Jr (1996). Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55,212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 277(3), 1431–1436.

- Gifford, A. N., Bruneus, M., Gatley, S. J., & Volkow, N. D. (2000). Cannabinoid receptor-mediated inhibition of acetylcholine release from hippocampal and cortical synaptosomes. *British journal of pharmacology*, 131(3), 645–650. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703599>
- Gilliam, F. G., Mendiratta, A., Pack, A. M., & Bazil, C. W. (2005). Epilepsy and common comorbidities: improving the outpatient epilepsy encounter. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*, 7 Suppl 1, S27–S33.
- Glass, M., Dragunow, M., & Faull, R. L. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*, 97(3), 505–519. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00008-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00008-7)
- Glass, M., Faull, R. L., & Dragunow, M. (1993). Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience*, 56(3), 523–527. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90352-g](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90352-g)
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research*, 1071(1), 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.11.035>
- Gowers, W. R. (1881). *Epilepsy and other chronic convulsive diseases: their causes, symptoms, & treatment*. London: Churchill.
- Grabenstatter, H. L., Ferraro, D. J., Williams, P. A., Chapman, P. L., & Dudek, F. E. (2005). Use of chronic epilepsy models in antiepileptic drug discovery: the effect of topiramate on spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia*, 46(1), 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.13404.x>
- Griffith, W. H., & Taylor, L. (1988). Sodium valproate decreases synaptic potentiation and epileptiform activity in hippocampus. *Brain research*, 474(1), 155–164. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90678-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90678-6)
- Gupta, M., Khanna, R., & Rangra, K (2016). Study and Analysis of Human Nervous System and Effects of External EM Signals on Conduction in Human Nerves. *International Journal on Recent and Innovation Trends in Computing and Communication*. 4. 448-458.
- Haj-Dahmane, S., & Shen, R. Y. (2009). Endocannabinoids suppress excitatory synaptic transmission to dorsal raphe serotonin neurons through the activation of presynaptic CB1 receptors. *The Journal of pharmacology and*

- experimental therapeutics*, 331(1), 186–196.
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.153858>
- Hájos, N., & Freund, T. F. (2002a). Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers. *Neuropharmacology*, 43(4), 503–510. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00157-0](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00157-0)
 - Hájos, N., & Freund, T. F. (2002b). Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chemistry and physics of lipids*, 121(1-2), 73–82. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00149-4](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00149-4)
 - Hájos, N., Ledent, C., & Freund, T. F. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience*, 106(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00287-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00287-1)
 - Heneka, M. T., Rodríguez, J. J., & Verkhratsky, A. (2010). Neuroglia in neurodegeneration. *Brain research reviews*, 63(1-2), 189–211. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.004>
 - Hanus, L., Abu-Lafi, S., Fride, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D. E., Kustanovich, I., & Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3662–3665. <https://doi.org/10.1073/pnas.061029898>
 - Hawkins, R. D., Son, H., & Arancio, O. (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Progress in brain research*, 118, 155–172. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)63206-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63206-9)
 - Hayase, T., Yamamoto, Y., & Yamamoto, K. (2001). Protective effects of cannabinoid receptor agonists against cocaine and other convulsant-induced toxic behavioural symptoms. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(11), 1525–1532. <https://doi.org/10.1211/0022357011777891>
 - Hebb, D. O. (1949). *The Organisation of Behaviour*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
 - Heilbroner, P.L & Devinsky, O. (1997). Monotherapy with Gabapentin for partial epilepsy: A review of 30 cases. *Journal of Epilepsy*, 10, 220 – 224. [https://doi.org/10.1016/S0896-6974\(97\)00055-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6974(97)00055-8)
 - Henry, D. J., & Chavkin, C. (1995). Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience letters*, 186(2-3), 91–94. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11289-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11289-9)
 - Henshall, D. C., Chen, J., & Simon, R. P. (2000). Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic

- seizures. *Journal of neurochemistry*, 74(3), 1215–1223. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.741215.x>
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(2), 563–583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>
 - Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R., & Rice, K. C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(5), 1932–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1932>
 - Hermann, H., Marsicano, G., & Lutz, B. (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, 109(3), 451–460. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00509-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00509-7)
 - Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4), 500–544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
 - Hoffman, A. F., & Lupica, C. R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(7), 2470–2479. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-07-02470.2000>
 - Hoffman, A. F., Macgill, A. M., Smith, D., Oz, M., & Lupica, C. R. (2005). Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in the rodent hippocampus. *The European journal of neuroscience*, 22(9), 2387–2391. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04401.x>
 - Hollister L. E. (1986). Health aspects of cannabis. *Pharmacological reviews*, 38(1), 1–20.
 - Holtman, L., van Vliet, E. A., Aronica, E., Wouters, D., Wadman, W. J., & Gorter, J. A. (2013). Blood plasma inflammation markers during epileptogenesis in post-status epilepticus rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 54(4), 589–595. <https://doi.org/10.1111/epi.12112>
 - Hopfield, J. J., & Tank, D. W. (1986). Computing with neural circuits: a model. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4764), 625–633. <https://doi.org/10.1126/science.3755256>
 - Houser C. R. (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain research*, 535(2), 195–204. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91601-c](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91601-c)

- Howlett A. C. (1985). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Molecular pharmacology*, 27(4), 429–436.
- Howlett, A. C., Qualy, J. M., & Khachatrian, L. L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Molecular pharmacology*, 29(3), 307–313.
- Huang, C. C., Lo, S. W., & Hsu, K. S. (2001). Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *The Journal of physiology*, 532(Pt 3), 731–748. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0731e.x>
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J., Krey, J. F., Chu, C. J., Miller, J. D., Davies, S. N., Geppetti, P., Walker, J. M., & Di Marzo, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8400–8405. <https://doi.org/10.1073/pnas.122196999>
- Irving, A. J., Coutts, A. A., Harvey, J., Rae, M. G., Mackie, K., Bewick, G. S., & Pertwee, R. G. (2000). Functional expression of cell surface cannabinoid CB(1) receptors on presynaptic inhibitory terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, 98(2), 253–262. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00120-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00120-2)
- Jackson J. H. (1890). The Lumleian Lectures on Convulsive Seizures. *British medical journal*, 1(1526), 703–707. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.1526.703>
- Jansen, A. H., Reits, E. A., & Hol, E. M. (2014). The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, 73. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00073>
- Jiang, M., & Swann, J. W. (1997). Expression of calretinin in diverse neuronal populations during development of rat hippocampus. *Neuroscience*, 81(4), 1137–1154. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00231-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00231-5)
- Jin, K. L., Mao, X. O., Goldsmith, P. C., & Greenberg, D. A. (2000). CB1 cannabinoid receptor induction in experimental stroke. *Annals of neurology*, 48(2), 257–261.
- Johannessen C. U. (2000). Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochemistry international*, 37(2-3), 103–110. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00013-9)
- Joshi, S., Rajasekaran, K., Hawk, K. M., Brar, J., Ross, B. M., Tran, C. A., Chester, S. J., & Goodkin, H. P. (2015). Phosphatase inhibition prevents the activity-dependent trafficking of GABAA receptors during status epilepticus in

- the young animal. *Epilepsia*, 56(9), 1355–1365. <https://doi.org/10.1111/epi.13098>
- Kaminski, N. E., Abood, M. E., Kessler, F. K., Martin, B. R., & Schatz, A. R. (1992). Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation. *Molecular pharmacology*, 42(5), 736–742.
 - Kapur, J., & Macdonald, R. L. (1997). Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺ sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABAA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(19), 7532–7540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-19-07532.1997>
 - Karler, R., Cely, W., & Turkanis, S. A. (1974). A study of the development of tolerance to an anticonvulsant effect of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 9(1), 23–39.
 - Karler, R., & Turkanis, S. A. (1980). Subacute cannabinoid treatment: anticonvulsant activity and withdrawal excitability in mice. *British journal of pharmacology*, 68(3), 479–484. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1980.tb14562.x>
 - Karler, R., & Turkanis, S. A. (1981). The cannabinoids as potential antiepileptics. *Journal of clinical pharmacology*, 21(S1), 437S–448S. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1981.tb02624.x>
 - Karlócai, M. R., Tóth, K., Watanabe, M., Ledent, C., Juhász, G., Freund, T. F., & Maglóczy, Z. (2011). Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy. *PloS one*, 6(11), e27196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027196>
 - Kathmann, M., Bauer, U., Schlicker, E., & Göthert, M. (1999). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 359(6), 466–470. <https://doi.org/10.1007/pl00005377>
 - Kathmann, M., Weber, B., Zimmer, A., & Schlicker, E. (2001). Enhanced acetylcholine release in the hippocampus of cannabinoid CB(1) receptor-deficient mice. *British journal of pharmacology*, 132(6), 1169–1173. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703987>
 - Katona, I., Rancz, E. A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., & Freund, T. F. (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(23), 9506–9518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-23-09506.2001>

- Katona, I., Sperlágh, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., & Freund, T. F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), 4544–4558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04544.1999>
- Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2006). The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(11), 2991–3001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4872-05.2006>
- Keeler, M. H., & Reifler, C. B. (1967). Grand mal convulsions subsequent to marijuana use. Case report. *Diseases of the nervous system*, 28(7 Pt 1), 474–475.
- Keren, O., & Sarne, Y. (2003). Multiple mechanisms of CB1 cannabinoid receptors regulation. *Brain research*, 980(2), 197–205. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02970-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02970-6)
- Koch, M., Kreutz, S., Böttger, C., Grabiec, U., Ghadban, C., Korf, H. W., & Dehghani, F. (2011). The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels. *Hippocampus*, 21(5), 554–564. <https://doi.org/10.1002/hipo.20772>
- Köfalvi, A., Vizi, E. S., Ledent, C., & Sperlágh, B. (2003). Cannabinoids inhibit the release of [3H]glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. *The European journal of neuroscience*, 18(7), 1973–1978. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02897.x>
- Köfalvi, A., Rodrigues, R. J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E. S., Cunha, R. A., & Sperlágh, B. (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(11), 2874–2884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4232-04.2005>
- Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., & Sugiura, T. (1998). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS letters*, 429(2), 152–156. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00581-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00581-x)

- Koyama, R., & Ikegaya, Y. (2005). To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 11(4), 282–287. <https://doi.org/10.1177/1073858405278266>
- Krall, R. L., Penry, J. K., White, B. G., Kupferberg, H. J., & Swinyard, E. A. (1978). Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia*, 19(4), 409–428. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1978.tb04507.x>
- Kreitzer, A. C., & Regehr, W. G. (2002). Retrograde signaling by endocannabinoids. *Current opinion in neurobiology*, 12(3), 324–330. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(02\)00328-8](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(02)00328-8)
- Kreutzberg G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Lee, C. H., Lee, C. Y., Tsai, T. S., & Liou, H. H. (2008). PKA-mediated phosphorylation is a novel mechanism for levetiracetam, an antiepileptic drug, activating ROMK1 channels. *Biochemical pharmacology*, 76(2), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.04.012>
- Lees, G., & Leach, M. J. (1993). Studies on the mechanism of action of the novel anticonvulsant lamotrigine (Lamictal) using primary neurological cultures from rat cortex. *Brain research*, 612(1-2), 190–199. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91660-k](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91660-k)
- Leppik, I. E., Dreifuss, F. E., Pledger, G. W., Graves, N. M., Santilli, N., Drury, I., Tsay, J. Y., Jacobs, M. P., Bertram, E., & Cereghino, J. J. (1991). Felbamate for partial seizures: results of a controlled clinical trial. *Neurology*, 41(11), 1785–1789. <https://doi.org/10.1212/wnl.41.11.1785>
- Lévénés, C., Daniel, H., Soubrié, P., & Crépel, F. (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *The Journal of physiology*, 510 (Pt 3)(Pt 3), 867–879. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.867bj.x>
- Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 37(10 Pt 2), 2887–2899. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.011>
- Leweke, F. M., Giuffrida, A., Wurster, U., Emrich, H. M., & Piomelli, D. (1999). Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport*, 10(8), 1665–1669. <https://doi.org/10.1097/00001756-199906030-00008>
- Leweke, F. M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C. W., Hoyer, C., Klosterkötter, J., Hellmich, M., & Koethe, D. (2012). Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational psychiatry*, 2(3), e94. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.15>

- Loewe, S., & Goodman, L. S. (1947). Anticonvulsant action of marihuana-active substances. *Federation proceedings*, 6(1), 352.
- López-Meraz, M. L., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2010). Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. *Epilepsia*, 51 Suppl 3(Suppl 3), 56–60. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02611.x>
- Lothman, E. W., Hatlelid, J. M., Zorumski, C. F., Conry, J. A., Moon, P. F., & Perlin, J. B. (1985). Kindling with rapidly recurring hippocampal seizures. *Brain research*, 360(1-2), 83–91. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91223-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91223-5)
- Lowenstein, D. H., & Alldredge, B. K. (1998). Status epilepticus. *The New England journal of medicine*, 338(14), 970–976. <https://doi.org/10.1056/NEJM199804023381407>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lutz B. (2004). On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochemical pharmacology*, 68(9), 1691–1698. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.007>
- Lv, R. J., Wang, Q., Cui, T., Zhu, F., & Shao, X. Q. (2017). Status epilepticus-related etiology, incidence and mortality: A meta-analysis. *Epilepsy research*, 136, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.07.006>
- Macdonald, R. L., & Greenfield, L. J., Jr (1997). Mechanisms of action of new antiepileptic drugs. *Current opinion in neurology*, 10(2), 121–128. <https://doi.org/10.1097/00019052-199704000-00009>
- Mackie, K., Devane, W. A., & Hille, B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Molecular pharmacology*, 44(3), 498–503.
- Mackie, K., & Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), 3825–3829. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3825>
- Mackie K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), 299–325. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_10
- Maillieux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992a). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48(3), 655–668. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90409-u](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90409-u)

- Mailloux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992b). Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neuroscience letters*, *148*(1-2), 173–176. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90832-r](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90832-r)
- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, *25*, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
- Manzoni, O. J., & Bockaert, J. (2001). Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *European journal of pharmacology*, *412*(2), R3–R5. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)00723-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)00723-3)
- Marchi, N., Granata, T., Freri, E., Ciusani, E., Ragona, F., Puvenna, V., Teng, Q., Alexopolous, A., & Janigro, D. (2011). Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. *PloS one*, *6*(3), e18200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018200>
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S. C., Cascio, M. G., Gutiérrez, S. O., van der Stelt, M., López-Rodríguez, M. L., Casanova, E., Schütz, G., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., Behl, C., & Lutz, B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5642), 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.1088208>
- Marsicano, G., & Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *The European journal of neuroscience*, *11*(12), 4213–4225. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00847.x>
- Martin, E. (2020). *The behaviour of neurologic water during axonal and synaptic neurotransmission: An in silico study*. Dalhousie University. Canadá.
- Martin, R., Kuzniecky, R., Ho, S., Hetherington, H., Pan, J., Sinclair, K., Gilliam, F., & Faught, E. (1999). Cognitive effects of topiramate, gabapentin, and lamotrigine in healthy young adults. *Neurology*, *52*(2), 321–327. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.2.321>
- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *The Journal of comparative neurology*, *327*(4), 535–550. <https://doi.org/10.1002/cne.903270406>
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, *346*(6284), 561–564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>

- Maya-López, M., Colín-González, A. L., Aguilera, G., de Lima, M. E., Colpo-Ceolin, A., Rangel-López, E., Villeda-Hernández, J., Rembao-Bojórquez, D., Túnez, I., Luna-López, A., Lazzarini-Lechuga, R., González-Puertos, V. Y., Posadas-Rodríguez, P., Silva-Palacios, A., Königsberg, M., & Santamaría, A. (2017). Neuroprotective effect of WIN55,212-2 against 3-nitropropionic acid-induced toxicity in the rat brain: involvement of CB1 and NMDA receptors. *American journal of translational research*, 9(2), 261–274.
- McBain, C. J., & Fisahn, A. (2001). Interneurons unbound. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/35049047>
- McDonough, J. H., Jr, McMonagle, J., Copeland, T., Zoeffel, D., & Shih, T. M. (1999). Comparative evaluation of benzodiazepines for control of soman-induced seizures. *Archives of toxicology*, 73(8-9), 473–478. <https://doi.org/10.1007/s002040050637>
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain research. Brain research reviews*, 21(2), 195–218. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(95\)00011-9](https://doi.org/10.1016/0165-0173(95)00011-9)
- McLean, M.J. (2002). Oxcarbazepine: mechanism of action. En: Levy. R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S., Perucca, E. (5ª ed.). *Antiepileptic drugs*. (pp. 451–8). EE.UU., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mechoulam, R. (1986). *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. EE.UU., Florida: CRC Press.
- Mechoulam, R. (1ª ed.). (2005). *Cannabinoids as Therapeutics*. Suiza: Birkhauser Verlag.
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1967). The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron letters*, 12, 1109–1111. [https://doi.org/10.1016/s0040-4039\(00\)90646-4](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)90646-4)
- Meldrum B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition*, 130(4S Suppl), 1007S–15S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.1007S>
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A. L., Pillolla, G., & Gessa, G. L. (2004). Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(1), 53–62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4503-03.2004>
- Mita, T., Kawazu, I., Hirano, H., Ohmori, O., Janjua, N., & Shibata, K. (2001). E1 mice epilepsy shows genetic polymorphism for S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Neurochemistry international*, 38(4), 349–357. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(00\)00089-9](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(00)00089-9)

- Monory, K., Tzavara, E. T., Lexime, J., Ledent, C., Parmentier, M., Borsodi, A., & Hanoune, J. (2002). Novel, not adenylyl cyclase-coupled cannabinoid binding site in cerebellum of mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(1), 231–235. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6635>
- Moore, S. A., Nomikos, G. G., Dickason-Chesterfield, A. K., Schober, D. A., Schaus, J. M., Ying, B. P., Xu, Y. C., Phebus, L., Simmons, R. M., Li, D., Iyengar, S., & Felder, C. C. (2005). Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17852–17857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507470102>
- Morales, M., & Bäckman, C. (2002). Coexistence of serotonin 3 (5-HT₃) and CB1 cannabinoid receptors in interneurons of hippocampus and dentate gyrus. *Hippocampus*, 12(6), 756–764. <https://doi.org/10.1002/hipo.10025>
- Moran, M. M., Xu, H., & Clapham, D. E. (2004). TRP ion channels in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 14(3), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.05.003>
- Mori, M., Lapa, R., Amado, D., Funke, M.G., Cavalheiro, E., & Naffah-Mazzacoratti, M. G. (1998). Study of hippocampal synaptogenesis and epilepsy: Experimental model. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. 4. 125-135.
- Morisset, V., & Urban, L. (2001). Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *Journal of neurophysiology*, 86(1), 40–48. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.40>
- Moser E. I. (2011). The multi-laned hippocampus. *Nature neuroscience*, 14(4), 407–408. <https://doi.org/10.1038/nn.2783>
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of aging*, 26(3), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.05.010>
- 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>
- Murakami, S., Takemoto, T., & Shimizu, S. (1953). Studies on the effective principles of *Diagenea simplex* Aq. I Separation of the effective fraction by liquid chromatography. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 73. 1026–1028.
- Nadler, J. V., Perry, B. W., & Cotman, C. W. (1978). Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 271(5646), 676–677. <https://doi.org/10.1038/271676a0>

- Nagarkatti, N., Deshpande, L. S., & DeLorenzo, R. J. (2008). Levetiracetam inhibits both ryanodine and IP3 receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture. *Neuroscience letters*, 436(3), 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.076>
- Nagayama, T., Sinor, A. D., Simon, R. P., Chen, J., Graham, S. H., Jin, K., & Greenberg, D. A. (1999). Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(8), 2987–2995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-08-02987.1999>
- Nakazi, M., Bauer, U., Nickel, T., Kathmann, M., & Schlicker, E. (2000). Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 361(1), 19–24. <https://doi.org/10.1007/s002109900147>
- Naylor, D. E., Liu, H., Niquet, J., & Wasterlain, C. G. (2013). Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiology of disease*, 54, 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.015>
- Neher, E., & Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.019>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N. Y.)*, 308(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.11110647>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>
- Nyíri, G., Cserép, C., Szabadits, E., Mackie, K., & Freund, T. F. (2005). CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, 136(3), 811–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.026>
- O'Shaughnessy, W. B. (1843). On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah: Cannabis Indica Their Effects on the Animal System in Health, and their Utility in the Treatment of Tetanus and other Convulsive Diseases. *Provincial Medical Journal and Retrospect of the Medical Sciences*, 5(123), 363–369.
- Ohshima, M., Tsuji, M., Taguchi, A., Kasahara, Y., & Ikeda, T. (2012). Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Experimental neurology*, 233(1), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.025>

- Ojemann, L. M., Wilensky, A. J., Temkin, N. R., Chmelir, T., Ricker, B. A., & Wallace, J. (1992). Long-term treatment with gabapentin for partial epilepsy. *Epilepsy research*, 13(2), 159–165. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(92\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0920-1211(92)90072-2)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2020). Epilepsia. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*, 54(5), 581–618. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(97\)00085-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(97)00085-3)
- Palva, J. M., Palva, S., & Kaila, K. (2005). Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(15), 3962–3972. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4250-04.2005>
- Pertwee, R. G. (2005) *Cannabinoids*. Alemania, Berlin: Springer.
- Pertwee, R. G. (2004). The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In V. Di Marzo (Ed.), *Cannabinoids* (pp. 32-83). (Neuroscience Intelligence Unit). Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Pertwee, R. G. (2008). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addiction biology*, 13(2), 147–159. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00108.x>
- Pertwee R. G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Current medicinal chemistry*, 17(14), 1360–1381. <https://doi.org/10.2174/092986710790980050>
- Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet. Neurology*, 10(2), 173–186. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70310-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70310-0)
- Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Narkilahti, S., Lukasiuk, K., & Nissinen, J. (2005). Administration of diazepam during status epilepticus reduces development and severity of epilepsy in rat. *Epilepsy research*, 63(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2004.10.003>
- Prather, P. L., Martin, N. A., Breivogel, C. S., & Childers, S. R. (2000). Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55,212-2 produces coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Molecular pharmacology*, 57(5), 1000–1010.
- Puranam, R. S., & McNamara, J. O. (1999). Seizure disorders in mutant mice: relevance to human epilepsies. *Current opinion in neurobiology*, 9(3), 281–287. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(99\)80041-5](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(99)80041-5)
- Racine R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 32(3), 281–294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)

- Rajasekaran, K., Todorovic, M., & Kapur, J. (2012). Calcium-permeable AMPA receptors are expressed in a rodent model of status epilepticus. *Annals of neurology*, 72(1), 91–102. <https://doi.org/10.1002/ana.23570>
- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., & Vezzani, A. (2008). Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*, 29(1), 142–160. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.08.012>
- Reynolds, J. R. (1890) Therapeutic uses and toxic effects of *Cannabis indica*. *Lancet*, 135. 637-638. [10.1016/S0140-6736\(02\)18723-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)18723-X).
- Rho, J. M., Donevan, S. D., & Rogawski, M. A. (1994). Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Annals of neurology*, 35(2), 229–234. <https://doi.org/10.1002/ana.410350216>
- Rigo, J. M., Hans, G., Nguyen, L., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Leprince, P., Moonen, G., Selak, I., Matagne, A., & Klitgaard, H. (2002). The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *British journal of pharmacology*, 136(5), 659–672. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704766>
- Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Santander, I., Barón-Flores, V., Caram-Salas, N., & Diaz-Ruiz, A. (2015). Anti-Apoptotic Effects of Dapsone After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochemical research*, 40(6), 1243–1251. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1588-z>
- Ríos, C., Farfán-Briseño, A. C., Manjarrez-Marmolejo, J., Franco-Pérez, J., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Caballero-Chacón, S., Ruiz-Diaz, A., Baron-Flores, V., & Díaz-Ruiz, A. (2019). Efficacy of dapsone administered alone or in combination with diazepam to inhibit status epilepticus in rats. *Brain research*, 1708, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.017>
- Robbe, D., Alonso, G., Duchamp, F., Bockaert, J., & Manzoni, O. J. (2001). Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(1), 109–116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-01-00109.2001>
- Robson P. (2001). Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 178, 107–115. <https://doi.org/10.1192/bjp.178.2.107>
- Rogoz, K., Andersen, H. H., Kullander, K., & Lagerström, M. C. (2014). Glutamate, substance P, and calcitonin gene-related peptide cooperate in

- inflammation-induced heat hyperalgesia. *Molecular pharmacology*, 85(2), 322–334. <https://doi.org/10.1124/mol.113.089532>
- Rosenthal, F. (1971). *The herb hashish versus medieval Muslim society*. Países Bajos, Leiden: E. J. Brill.
 - Ryan, D., Drysdale, A. J., Lafourcade, C., Pertwee, R. G., & Platt, B. (2009). Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2053–2063. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4212-08.2009>
 - Scharfman H. E. (2007). The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Progress in brain research*, 163, 627–637. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63034-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63034-9)
 - Schauwecker P. E. (2010). Neuroprotection by glutamate receptor antagonists against seizure-induced excitotoxic cell death in the aging brain. *Experimental neurology*, 224(1), 207–218. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.013>
 - Schultz, M. K., Wright, L. K., Stone, M. F., Schwartz, J. E., Kelley, N. R., Moffett, M. C., Lee, R. B., & Lumley, L. A. (2012). The anticholinergic and antiglutamatergic drug caramiphen reduces seizure duration in soman-exposed rats: synergism with the benzodiazepine diazepam. *Toxicology and applied pharmacology*, 259(3), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.017>
 - Shafaroodi, H., Samini, M., Moezi, L., Homayoun, H., Sadeghipour, H., Tavakoli, S., Hajrasouliha, A. R., & Dehpour, A. R. (2004). The interaction of cannabinoids and opioids on pentylentetrazole-induced seizure threshold in mice. *Neuropharmacology*, 47(3), 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.011>
 - Shapiro, L. A., Wang, L., & Ribak, C. E. (2008). Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia*, 49 Suppl 2, 33–41. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01491.x>
 - Sheerin, A. H., Zhang, X., Saucier, D. M., & Corcoran, M. E. (2004). Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia*, 45(10), 1184–1188. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.16604.x>
 - Shen, M., Piser, T. M., Seybold, V. S., & Thayer, S. A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(14), 4322–4334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-14-04322.1996>
 - Shen, M., & Thayer, S. A. (1999). Delta9-tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist to modulate glutamatergic synaptic transmission between rat

- hippocampal neurons in culture. *Molecular pharmacology*, 55(1), 8–13. <https://doi.org/10.1124/mol.55.1.8>
- Siegling, A., Hofmann, H. A., Denzer, D., Mauler, F., & De Vry, J. (2001). Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *European journal of pharmacology*, 415(1), R5–R7. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)00798-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)00798-1)
 - Sik, A., Penttonen, M., & Buzsáki, G. (1997). Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *The European journal of neuroscience*, 9(3), 573–588. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01634.x>
 - Sim, L. J., Selley, D. E., Xiao, R., & Childers, S. R. (1996). Differences in G-protein activation by mu- and delta-opioid, and cannabinoid, receptors in rat striatum. *European journal of pharmacology*, 307(1), 97–105. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00211-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00211-7)
 - Sivilotti, L., & Nistri, A. (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 36(1), 35–92. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90036-z](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90036-z)
 - Snead O. C., 3rd (1995). Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Annals of neurology*, 37(2), 146–157. <https://doi.org/10.1002/ana.410370204>
 - Sofia, R. D., & Barry, H., 3rd (1977). Comparative activity of delta9-tetrahydrocannabinol, diphenylhydantoin, phenobarbital and chlordiazepoxide on electroshock seizure threshold in mice. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 228(1), 73–78.
 - Sofia, R. D., Solomon, T. A., & Barry, H., 3rd (1976). Anticonvulsant activity of delta9-tetrahydrocannabinol compared with three other drugs. *European journal of pharmacology*, 35(1), 7–16. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(76\)90295-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(76)90295-8)
 - Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), 39–44. <https://doi.org/10.1038/417039a>
 - Steele, M. L., & Robinson, S. R. (2012). Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 33(2), . <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.018>
 - Stella, N., Schweitzer, P., & Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388(6644), 773–778. <https://doi.org/10.1038/42015>
 - Stolp H. B. (2013). Neurotrophic cytokines in normal brain development and neurodevelopmental disorders. *Molecular and cellular neurosciences*, 53, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.009>

- Südhof T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375(6533), 645–653. <https://doi.org/10.1038/375645a0>
- Südhof T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience*, 27, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Suleymanova, E. M., Shangaraeva, V. A., van Rijn, C. M., & Vinogradova, L. V. (2016). The cannabinoid receptor agonist WIN55.212 reduces consequences of status epilepticus in rats. *Neuroscience*, 334, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.004>
- Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I., & Ramirez, L. (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Annals of neurology*, 26(3), 321–330. <https://doi.org/10.1002/ana.410260303>
- Syková, E., & Chvátal, A. (2000). Glial cells and volume transmission in the CNS. *Neurochemistry international*, 36(4-5), 397–409. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(99\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(99)00131-x)
- Szabo, B., Dörner, L., Pfreundtner, C., Nörenberg, W., & Starke, K. (1998). Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience*, 85(2), 395–403. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00597-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00597-6)
- Szabo, B., Wallmichrath, I., Mathonia, P., & Pfreundtner, C. (2000). Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, 97(1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00036-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00036-1)
- Takahashi, K. A., & Castillo, P. E. (2006). The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. *Neuroscience*, 139(3), 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.024>
- Takahashi, K. A., & Linden, D. J. (2000). Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *Journal of neurophysiology*, 83(3), 1167–1180. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.3.1167>
- Treiman D. M. (1993). Generalized convulsive status epilepticus in the adult. *Epilepsia*, 34 Suppl 1, S2–S11. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb05902.x>
- Tsacopoulos, M., & Magistretti, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 877–885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-00877.1996>
- Tsien J. Z. (2000). Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Current opinion in neurobiology*, 10(2), 266–273. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00070-2](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00070-2)

- Tsou, K., Mackie, K., Sañudo-Peña, M. C., & Walker, J. M. (1999). Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 93(3), 969–975. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00086-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00086-x)
- Twarog, B. M. (1954). Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *Journal of cellular and comparative physiology*, 44(1), 141–163. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030440112>
- Twitchell, W., Brown, S., & Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology*, 78(1), 43–50. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.1.43>
- Tzavara, E. T., Wade, M., & Nomikos, G. G. (2003). Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(28), 9374–9384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09374.2003>
- Uhlhaas, P. J., & Singer, W. (2006). Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron*, 52(1), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.020>
- Ullian, E. M., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2004). Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, 47(3), 209–216. <https://doi.org/10.1002/glia.20082>
- Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J. S., Marnett, L. J., Di Marzo, V., Pittman, Q. J., Patel, K. D., & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.1115740>
- Verkhratsky, A & Butt, A. (2007), *Glial neurobiology: A textbook*. Estados Unidos, Washington: John Wiley & Sons, Ltd.
- Vermoesen, K., Smolders, I., Massie, A., Michotte, Y., & Clinckers, R. (2010). The control of kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy research*, 90(1-2), 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.04.001>
- Vernadakis A. (1996). Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Progress in neurobiology*, 49(3), 185–214. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00012-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00012-3)
- Vezzani, A., & Granata, T. (2005). Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*, 46(11), 1724–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x>

- Vezzani, A., Ravizza, T., Balosso, S., & Aronica, E. (2008). Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia*, *49 Suppl 2*, 24–32. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01490.x>
- Vincent, P., & Mulle, C. (2009). Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*, *158*(1), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.066>
- Vineyard, C.M., Verzi, S.J., Bernard, M.L., Taylor, S. E., Dubicka, I., & Caudell, T. (2012). A multi-modal network architecture for knowledge discovery. *Security Informatics 1* (20). <https://doi.org/10.1186/2190-8532-1-20>
- Vinogradova, L. V., Shatskova, A. B., & van Rijn, C. M. (2011). Pro-epileptic effects of the cannabinoid receptor antagonist SR141716 in a model of audiogenic epilepsy. *Epilepsy research*, *96*(3), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.06.007>
- Vitkovic, L., Bockaert, J., & Jacque, C. (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?. *Journal of neurochemistry*, *74*(2), 457–471. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740457.x>
- Vivash, L., Tostevin, A., Liu, D. S., Dalic, L., Dedeurwaerdere, S., Hicks, R. J., Williams, D. A., Myers, D. E., & O'Brien, T. J. (2011). Changes in hippocampal GABAA/cBZR density during limbic epileptogenesis: relationship to cell loss and mossy fibre sprouting. *Neurobiology of disease*, *41*(2), 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.021>
- Vogel, Z., Barg, J., Levy, R., Saya, D., Heldman, E., & Mechoulam, R. (1993). Anandamide, a brain endogenous compound, interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase. *Journal of neurochemistry*, *61*(1), 352–355. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03576.x>
- Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*(8), 626–640. <https://doi.org/10.1038/nrn1722>
- Wada, J. A., Sato, M., & Corcoran, M. E. (1973). Antiepileptic properties of 9-tetrahydrocannabinol. *Experimental neurology*, *39*(1), 157–165. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(73\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(73)90048-4)
- Walker, M. C., & Sander, J. W. (1996). Topiramate: a new antiepileptic drug for refractory epilepsy. *Seizure*, *5*(3), 199–203. [https://doi.org/10.1016/s1059-1311\(96\)80036-7](https://doi.org/10.1016/s1059-1311(96)80036-7)
- Walker M. C. (2018). Pathophysiology of status epilepticus. *Neuroscience letters*, *667*, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.044>
- Walker, M. C., Tong, X., Brown, S., Shorvon, S. D., & Patsalos, P. N. (1998). Comparison of single- and repeated-dose pharmacokinetics of diazepam.

- Epilepsia*, 39(3), 283–289. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1998.tb01374.x>
- Wallace, M. J., Blair, R. E., Falenski, K. W., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2003). The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 307(1), 129–137. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051920>
 - Wallace, M. J., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2002). Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *European journal of pharmacology*, 452(3), 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02331-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02331-2)
 - Wallace, M. J., Wiley, J. L., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2001). Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid anticonvulsant effects. *European journal of pharmacology*, 428(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01243-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01243-2)
 - Wallmichrath, I., & Szabo, B. (2002). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience*, 113(3), 671–682. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00109-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00109-4)
 - Walter, L., & Stella, N. (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *British journal of pharmacology*, 141(5), 775–785. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705667>
 - Wang S. J. (2003). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes. *European journal of pharmacology*, 469(1-3), 47–55. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01734-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01734-5)
 - Wartmann, M., Campbell, D., Subramanian, A., Burstein, S. H., & Davis, R. J. (1995). The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS letters*, 359(2-3), 133–136. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00027-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00027-7)
 - Wiley, J. L., & Martin, B. R. (2002). Cannabinoid pharmacology: implications for additional cannabinoid receptor subtypes. *Chemistry and physics of lipids*, 121(1-2), 57–63. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00146-9](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00146-9)
 - Williams, P. A., White, A. M., Clark, S., Ferraro, D. J., Swiercz, W., Staley, K. J., & Dudek, F. E. (2009). Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2103–2112. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0980-08.2009>
 - Willow, M., Gonoï, T., & Catterall, W. A. (1985). Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-

- sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Molecular pharmacology*, 27(5), 549–558.
- Sarne, Y. (2019). Beneficial and deleterious effects of cannabinoids in the brain: the case of ultra-low dose THC. *The American journal of drug and alcohol abuse*, 45(6), 551–562. <https://doi.org/10.1080/00952990.2019.1578366>
 - Yoshida, T. (1998). *Marine algae of Japan*. Tokio: Uchida Rokakuho.
 - Yusta, A. (2005). Crisis convulsivas. Concepto, clasificación y etiología. *Emergencias* 17. S68-S73.
 - Zarrindast, M. R., Nasehi, M., Piri, M., & Bina, P. (2010). Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55,212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 94(3), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.09.021>
 - Zhang, X. M., & Zhu, J. (2011). Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. *Current neuropharmacology*, 9(2), 388–398. <https://doi.org/10.2174/157015911795596540>
 - Zuardi A. W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 28(2), 153–157. <https://doi.org/10.1590/s1516-44462006000200015>
 - Zucker R. S. (1996). Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron*, 17(6), 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80238-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80238-x)
 - Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452–457. <https://doi.org/10.1038/22761>