



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO, OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FÁRMACOS Y BIOMOLÉCULAS

**EFFECTO ANTICONVULSIVO DE CANNABIDIOL SOLO O COMBINADO CON
DAPSONA EN UN MODELO DE EPILEPSIA**

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

PRESENTA

Q.F.B. DIANA ISLAS DÍAZ
MATRÍCULA 2213803075

COMITÉ TUTORIAL

Co-Director: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda
Co-Director: Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruíz
Asesora: Dra. Verónica Tomasa Barón Flores

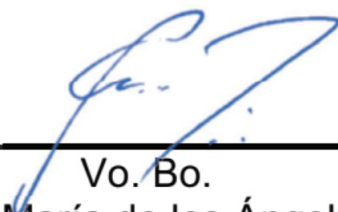
Octubre, 2025

“EFECTO ANTICONVULSIVO DE CANNABIDIOL SOLO O COMBINADO CON
DAPSONA EN UN MODELO DE EPILEPSIA”

Comité tutorial



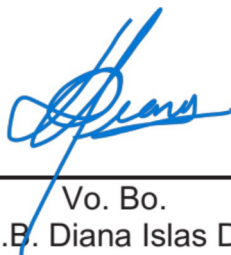
Vo. Bo.
Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda



Vo. Bo.
Dra. María de los Ángeles
Araceli Díaz Ruiz



Vo. Bo.
Dra. Verónica Tomasa Barón
Flores



Vo. Bo.
Q.F.B. Diana Islas Díaz
2213803075

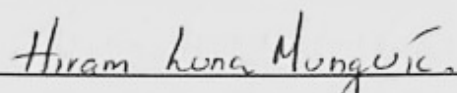
EFFECTO ANTICONVULSIVO DE CANNABIDIOL SOLO O COMBINADO CON
DAPSONA EN UN MODELO DE EPILEPSIA"

Jurado del examen de grado



Vo. Bo. Presidente

Dr. Luis Antonio Tristán López



Vo. Bo. Vocal

Dr. Hiram Luna Munguía



Vo.Bo. Secretario

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda



Vo.Bo. Q.F.B Diana Islas Díaz

2213803075

RESUMEN

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico-degenerativo que afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes, con el riesgo de provocar daño cerebral irreversible e incluso una muerte prematura. Este padecimiento se caracteriza por la recurrencia de crisis convulsivas espontáneas, resultado de una hiperexcitabilidad neuronal y la desregulación de los mecanismos inhibitorios en el cerebro. Actualmente se cuenta con terapias farmacológicas anticonvulsivas, sin embargo, no en todos los casos tienen un efecto neuroprotector. Bajo este panorama surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, por lo tanto, el objetivo de este proyecto de investigación fue evaluar los efectos anticonvulsivo y neuroprotector de la combinación de dos medicamentos, la dapsona (DDS) y el Cannabidiol (CBD) en un modelo preclínico de crisis convulsivas inducidas con pentilentetrazol (PTZ) en ratas. Este modelo permitió reproducir características clave de la ictogénesis, incluyendo el desequilibrio entre la excitación e inhibición neuronal y el aumento del daño oxidante. Los fármacos fueron propuestos por su capacidad para modular tanto la actividad sináptica, así como los procesos inflamatorios, oxidantes y apoptóticos asociados a las crisis convulsivas. Los resultados demostraron que la combinación terapéutica redujo significativamente la severidad y la frecuencia de las crisis convulsivas, además de disminuir el estrés oxidante y la apoptosis dando como resultado mayor sobrevivencia de las neuronas de la región CA3 del hipocampo. Esto resalta el potencial de las estrategias farmacológicas combinadas, que podrían superar las limitaciones de los tratamientos actuales, como los efectos secundarios adversos y la resistencia terapéutica. En conclusión, este estudio demuestra los resultados de la combinación de DDS y CBD y establece la importancia de explorar enfoques terapéuticos dirigidos a múltiples blancos fisiopatológicos. Los hallazgos obtenidos no solo contribuyen a un mayor entendimiento de los mecanismos subyacentes a las crisis convulsivas, sino que también abren la puerta a nuevas estrategias para desarrollar tratamientos más efectivos y seguros que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco donde llevé a cabo mis estudios de maestría en Ciencias Farmacéuticas, al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “MVS” y principalmente a los miembros del departamento de Neuroquímica en dirección de la Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruíz, al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda, al Dr. Luis Antonio Tristán y demás instancias del instituto, la Dra. Marisela Armenta, a la Dra. Norma Serrano, por su apoyo incondicional en el desarrollo del presente, a la Facultad de Medicina de la UNAM, laboratorio de Neuroendocrinología por su apoyo.

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología CONAHCYT por la beca otorgada para la realización del proyecto con número de CVU 1166433, además del apoyo como ayudante de investigador otorgado.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco profundamente a la Dra. Araceli Díaz y al Dr. Camilo Ríos por su paciencia, honorable enseñanza, tiempo y dirección en mi proyecto. También a la Dra. Amairani Ruíz, Dra. Marcela Islas, Dr. Alfonso Mata, Dra. Marisela Armenta, Dra. Norma Serrano, Dr. Alfonso Moreno Rocha y al Dr. Luis Tristán por sus asesorías y amistad en cada laboratorio por su valiosísimo apoyo, tiempo, paciencia y por compartir su experiencia, que son fundamentales para mi vida académica y profesional.

A las ratitas, cuya contribución es esencial para el avance de la ciencia

A mi querida mamá, cuyo amor y apoyo incondicional han sido mi mayor fuente de inspiración y fortaleza. Gracias por creer en mí, por tus sabios consejos y por estar siempre a mi lado. A mi Hermana y a Edwar, gracias por su compañía y ánimo constante.

Pá, te honro con cada recuerdo y cada gesto de amor que compartimos.

Tu legado vive en nuestras acciones y en los corazones de quienes te conocieron.

A mi familia y a todos los que amo, gracias por ser mi refugio y mi inspiración.

Para Sofía... con mucho cariño

Que el amor nos dé la fortaleza para seguir adelante, asumamos con la responsabilidad de nuestras vidas, busquemos mejorar, busquemos crear significado, cuidemos de los demás y busquemos contribuir a que este mundo, sea un lugar mejor

ABREVIATURAS

α -KGDH:	Alfa	cetoglutarato	GPX:	Glutación peroxidasa
deshidrogenasa			ILAE:	Liga Internacional contra la
AC:	Adenilato	ciclasa	Epilepsia	por sus siglas en inglés
ACM:	Arteria cerebral	media	IL-8:	Interleucina - 8
AMG:	Amígdala		IP3:	1,4,5-inositol trifosfato
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5-		LCR:	Líquido cefalorraquídeo
metil-4- isoxazolpropiónico			LTD:	La depresión a largo plazo
AMPc:	Monofosfato de Adenosina	cíclico	LTP:	La potenciación a largo plazo
Apaf-1:			MDA:	Malodialdehído
ATP:	Adenosin	trifosfato	MEC:	Matriz extracelular
BHE:	Barrera hematoencefálica		mGluR:	Receptor metabotrópico de
Ca^{2+} :	Iones Calcio		glutamato	
CAD:	DNasa	activada por caspasa	MMP:	Matriz de
CA:	<i>Cornu Ammonis</i>		metaloproteinas	asmetaloproteinas
CB1:	Receptor cannabinoide	1	MPO:	Mieloperoxidasa
CB2:	Receptor cannabionide	2	NMDA:	N-metil-aspartato
CBD:	Cannabidiol		nNOS:	Especies reactivas de
CE:	Células endoteliales		nitrógeno	
Cl:	Cloro		NO:	Óxido nítrico
CH ₂ :	Grupo metileno		OH ⁻ :	Radical hidroxilo
CYP-450:	Citocromo P450		PABA:	Ácido paraaminobenzoico
DAG:	Diacilglicerol		PTZ:	Pentilentetrazol
DDS:	Dapsona		RCBD:	Receptor cannabinoide
TRADD/FADD:	Dominio de		ROS:	Especies reactivas de oxígeno
	muerte y adaptadores		(siglas en inglés)	
EAAT:	Transportador de		SOD:	Superóxido dismutasa
	aminoácidos excitatorios		SRSs:	Convulsiones espontáneas
ELT:	Epilepsia de lóbulo temporal		recurrentes (siglas en inglés)	
EROs:	Especies reactivas de oxígeno		TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
FAAH:	Hidrolasa de amidas de ácidos		TRPM8:	Receptor de Potencial
grasos			Transitorio	melastatina
FAE:	Fármacos antiepilépticos		TRPV1:	Receptor de
Fe ²⁺ :	Hierro			Potencial Transitorio
FJ:	Fluoro jade		Vaniloide	
GABA:	Ácido gamma aminobutírico			
Gp:	Proteína G			

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1 ELEMENTOS RELEVANTES EN LAS CONVULSIONES Y LA EPILEPSIA	13
2.1.1. Neurona	13
2.1.2. Potencial de acción	14
2.1.3 Transmisión sináptica	16
2.1.4 Glía	18
2.1.5 Barrera hematoencefálica	19
2.1.6 Hipocampo.....	20
2.1.7 Desarrollo del hipocampo	22
2.1.8 Neurotransmisores y Receptores: Síntesis, función y relación en la epilepsia	23
2.1.9 Circuitos neurales: Alteraciones de los circuitos neuronales en la epilepsia.....	24
3.0 MARCO TEÓRICO.....	26
3.1 Historia de la Epilepsia	26
3.2 Epileptogénesis.....	27
3.2 Ictogenesis.....	30
3.3 Clasificación de convulsiones.....	31
3.5 Tipos de crisis convulsivas.....	32
3.6 Síndromes Epilépticos	33
3.7 Modelos animales en el estudio de las crisis convulsivas	34
3.8 kindling químico con Pentilentetrazol (PTZ).....	35
3.9 Cambios en el sistema glutamatérgico	37
3.10 Escala de Racine.....	38

3.11	Consecuencias de la epilepsia.....	39
3.12	Fuentes de generación de las especies reactivas de oxígeno	41
3.13	Especies reactivas de oxígeno.....	42
3.14	Peroxidación lipídica	44
3.15	Defensas antioxidantes	45
3.16	Glutación.....	47
3.17	Apoptosis	49
3.18	Fármacos anticrisis	51
4.1	Cannabidiol.....	52
4.2	Receptores Cannabinoides.....	57
4.3	Dapsona.....	58
5.	<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	62
6.	<i>HIPÓTESIS</i>	62
7.	<i>OBJETIVOS</i>	63
7.1	Objetivo general.....	63
7.2	Objetivos específicos	63
8.	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	63
8.1	Animales	63
8.2	Fármacos	64
8.3	Diseño experimental	64
8.4	Establecimiento de modelo de inducción de convulsiones.....	66
8.5	Estandarización conductual del modelo de inducción de convulsiones con PTZ.....	67
8.6	Análisis isobolográfico	68
8.7	Ensayo de peroxidación lipídica en un modelo de crisis convulsivas con PTZ.....	68
8.8	Ensayo de glutación reducido (GSH) en el modelo de crisis convulsivas con PTZ.	69

8.9	Cuantificación de proteína por el método de Lowry	70
8.10	Cuantificación actividad de caspasas 3, 8 y 9	71
8.11	Ensayo histológico en hipocampo de rata de las combinaciones de CBD-DDS	72
8.12	Ensayo de inmunofluorescencia con Fluoro-Jade B.	73
8.13	Conteo celular	74
8.14	Tinción de Nissl.....	74
8.15	Análisis estadístico	75
9.	RESULTADOS	76
9.1	Estandarización de la intensidad de las crisis convulsivas en el modelo	76
9.2	Cuantificación de los productos finales de lipoperoxidación en modelo de crisis convulsivas con PTZ.....	79
9.3	Cuantificación de glutatión reducido (GSH) en hipocampo de rata en un modelo de crisis convulsivas con PTZ	83
9.4	Cuantificación de la actividad enzimática para caspasas 3 en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ.....	86
9.5	Cuantificación de la actividad enzimática para caspasa 8 en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ.....	88
9.6	Cuantificación de la actividad enzimática para caspasa 9 en un modelo de crisis convulsivas inducida con PTZ.....	90
9.7	Evaluación de células viables mediante la tinción de Nissl en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ.....	92
9.8	<i>Determinación del efecto neuroprotector de células degeneradas en hipocampo mediante técnica de Fluoro- Jade B.</i>	97
10.	DISCUSIÓN	100
12.	REFERENCIAS	107
13.	ANEXOS: DE PRESENTACIÓN DE LOS AVANCES DEL PROYECTO	123

1. INTRODUCCIÓN

Una convulsión se considera un evento de actividad eléctrica anormal, excesiva y sincrónica en el cerebro, que podría provocar movimientos involuntarios, alteraciones en la conciencia, cambios en la percepción sensorial o respuestas autonómicas descontroladas, mientras que la epilepsia, es un trastorno neurológico crónico caracterizado por la predisposición a presentar crisis epilépticas recurrentes (dos o más convulsiones no provocadas con al menos 24 horas de diferencia), éstas crisis pueden deberse a una disfunción en la actividad eléctrica cerebral y pueden manifestarse de diversas formas, desde episodios de ausencia hasta convulsiones tónico-clónicas generalizadas (Fisher et al., 2005) (Aaberg, K et al., 2017).

Esta enfermedad implica la transformación de una red neuronal normal en una red hiperexcitable, lo que está relacionado con alteraciones en la homeostasis iónica extracelular, el metabolismo energético, la función de los receptores y la neurotransmisión. El equilibrio adecuado entre neurotransmisores excitatorios e inhibitorios es fundamental para mantener el correcto funcionamiento del potencial de acción neuronal (McCandless, 2012).

En adultos sin una predisposición genética a la epilepsia, las etiologías comunes de las convulsiones incluyen encefalitis o meningitis, lesión cerebral traumática y tumores cerebrales (Bosak, M et al., 2019). En los pacientes de edad avanzada, la epilepsia suele ser el resultado de trastornos neurodegenerativos primarios, traumatismo craneal y tumores cerebrales (Falco-Walter et al., 2020).

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés), su última actualización se llevó a cabo en abril de 2025 indicando qué se mantiene el marco fundamental para clasificar las crisis epilépticas, indicando que las principales clases de crisis son focales, generalizadas, desconocidas (ya sean focales o generalizadas) y no clasificadas (Beniczky S et al., 2025).

Para comprender el desarrollo de la epilepsia, es importante mencionar que se lleva a cabo a través de tres fases:

- 1) Fase pre-ictal o aura: Primer fase de la crisis, inicia inmediatamente antes de la fase ictal de una convulsión y puede durar desde unos pocos segundos hasta una hora. La mayoría de las personas son conscientes de sus propios síntomas durante un aura convulsiva. Puede o no tener un aura antes de sus convulsiones (Epilepsy Foundation Australia, s/f).

- 2) Fase Ictal: Durante la convulsión, se pueden experimentar alteraciones en la conciencia, movimientos involuntarios o ambos. Una convulsión puede describirse como una convulsión (con movimientos temblorosos o espasmódicos) o una convulsión de ausencia (sin movimientos físicos inusuales). Los movimientos involuntarios pueden afectar todo el cuerpo o un lado de la cara, el brazo o la pierna. Por lo general, los movimientos musculares son rítmicos y repetitivos, suele durar entre unos segundos y unos minutos (Epilepsy Foundation Australia, s/f).
- 3) Fase Pos-ictal: Después del evento, comienza cuando remite una convulsión y finaliza cuando el paciente recupera su estado normal, suele durar entre 5 y 30 minutos y se caracteriza por síntomas desorientadores como confusión, somnolencia, hipertensión, cefalea, náuseas, etc (Abood W et al., 2023).

Ahora bien, conociendo la definición de convulsiones como evento, la epilepsia como la enfermedad, la epileptogénesis se refiere al proceso a través del cual un cerebro normal desarrolla alteraciones que contribuye a la formación de epilepsia, aludiendo a la transformación del cerebro que previamente funcionaba normalmente (Sumadewi et al., 2023) Un cerebro que se convierte en cerebro epiléptico es capaz de generar repetidas convulsiones, debido a los cambios moleculares, estructurales y funcionales ocurridos durante el proceso de epileptogénesis (Blauwblomme et al., 2014). La epileptogénesis está influenciada por el estrés oxidativo, alteraciones neuroquímicas en el cerebro debido a neurotransmisores y canales iónicos, fluctuaciones en la concentración de iones, variaciones en los receptores de la superficie celular y la presencia de inflamación (Sumadewi et al., 2023).

La epilepsia puede reducir significativamente la calidad de vida, ya que limita las actividades diarias e incluso las oportunidades laborales. Además, esta enfermedad ha causado alrededor de 50 casos nuevos en 100,000 poblaciones cada año. Alrededor del 75% de estos casos comienzan en la infancia, lo que indica la mayor vulnerabilidad del desarrollo cerebral para experimentar convulsiones (Sumadewi, K et al., 2023) (Senn et al., 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 50 millones de personas en el mundo viven con epilepsia. Más del 75% de estos casos se encuentran en países en desarrollo, donde el acceso a servicios médicos es limitado. La mayoría de las convulsiones comienzan durante la infancia (McCandless, 2012).

En México, la epilepsia afecta al 1-2% de la población, con una prevalencia de 11 a 20 casos por cada 1000 habitantes. Solo en la Ciudad de México, esto representa entre 95,000 y 177,000 personas con esta enfermedad (Valdés et al., 2019).

Por todo ello, es necesario buscar alternativas terapéuticas que sean seguras y efectivas, y que su uso impacte de manera positiva, brindando efecto neuroprotector a los pacientes. En este estudio, se propone evaluar el efecto del tratamiento combinado de cannabidiol (CBD) y dapsona (4-4' diaminodifenil sulfona) en un modelo de kindling químico establecido con pentilentetrazol (PTZ) en ratas.

2. ANTECEDENTES

2.1 ELEMENTOS RELEVANTES EN LAS CONVULSIONES Y LA EPILEPSIA

2.1.1. Neurona

Las neuronas son las unidades fundamentales para el procesamiento de información en el sistema nervioso central (SNC). Son células excitables que pueden transmitir y procesar información a través de señales eléctricas o químicas, principalmente por medio de sinapsis. A diferencia de otras células, las neuronas tienen prolongaciones especializadas: las dendritas, que reciben señales y las llevan al cuerpo celular, y el axón, que transmite señales hacia otras células. Este axón se inicia en el hilillo axónico y puede conectarse con otras neuronas o con células como las musculares. Mientras una neurona puede tener múltiples dendritas, solo tiene un axón. Además, muchas neuronas están recubiertas por una vaina de mielina, una capa de grasa que aumenta significativamente la velocidad de transmisión del impulso nervioso (Bredlove et al., 2013).

Dentro del conjunto de neuronas, se destacan las interneuronas, que son células de pequeño tamaño con axones cortos. Estas se dedican a la transmisión y modulación de impulsos a nivel local, facilitando la integración y coordinación de la información dentro de circuitos neuronales específicos. A diferencia de otras células del organismo, la mayoría de las neuronas tienen una capacidad regenerativa muy limitada (National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (s.f.).

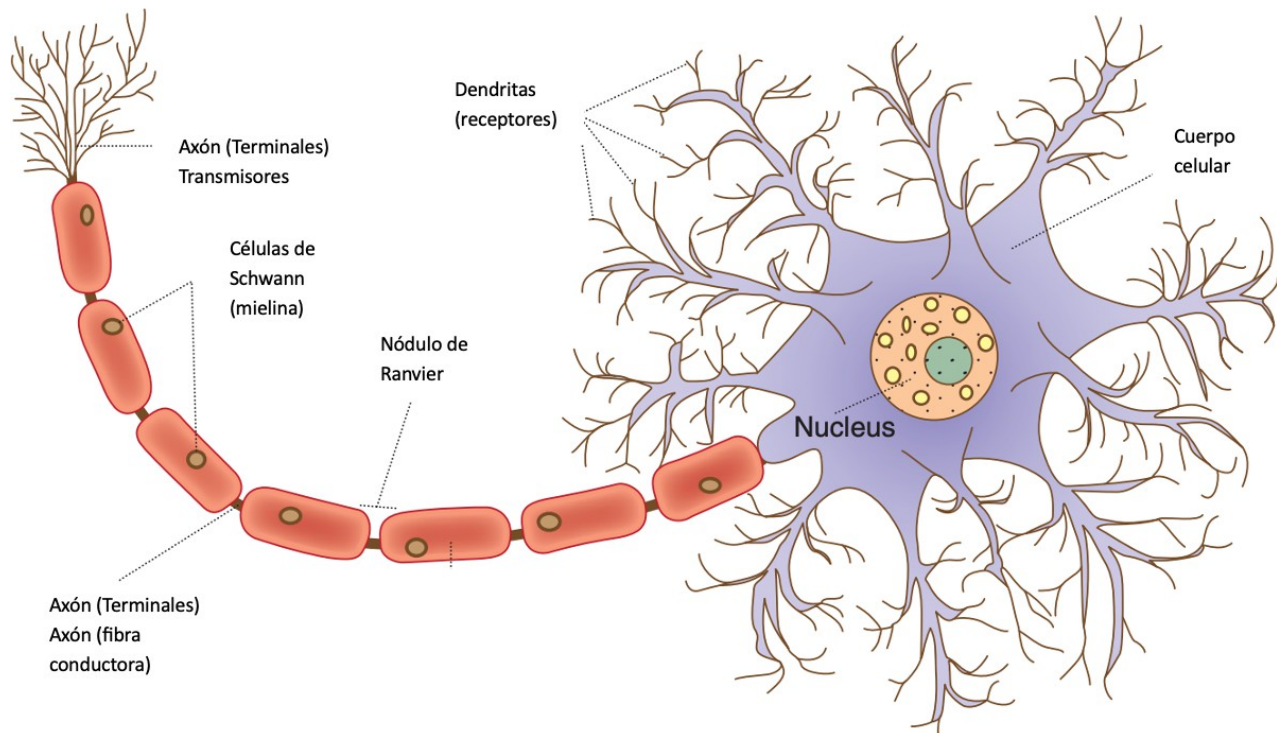


Figura 1: Representación ilustrada de una neurona indicando el nombre de sus organelos y las estructuras que la conforman. Recuperado y modificado de (Bredlove et al., 2013).

2.1.2. Potencial de acción

El potencial de acción (PA) es un proceso eléctrico que permite a las neuronas transmitir información rápidamente a través del axón. Se inicia cuando un estímulo provoca la despolarización de la membrana neuronal, gracias a la entrada de iones de sodio (Na^+), lo cual cambia el voltaje interno de la célula. Si este cambio alcanza un umbral entre -40 y -55 mV, se genera el PA, que puede llegar hasta +40 mV (Chen et al., 2023). Posteriormente, se cierran los canales de Na^+ y se abren los de potasio (K^+), lo que causa la repolarización e incluso una posible hiperpolarización temporal. Este proceso, que ocurre en milisegundos, se propaga por el axón y finaliza con la liberación de neurotransmisores en la sinapsis, permitiendo la comunicación entre neuronas (Kandel et al., 2000).

Este mecanismo es esencial en el sistema nervioso central, ya que regula la actividad neuronal. Sin embargo, alteraciones en los canales iónicos o desequilibrios en neurotransmisores como glutamato (excitador) y GABA (inhibidor) pueden provocar una excitación excesiva o fallos en la repolarización, afectando la función neuronal normal (Chen y Lui, 2024). Los canales iónicos (Na^+ y K^+), pueden funcionar de manera anormal. Por

ejemplo, un incremento en la apertura de canales de sodio puede llevar a una despolarización sostenida, mientras que una disminución en la apertura de los canales de K^+ puede reducir la capacidad de la neurona para repolarizarse. Además, los receptores de neurotransmisores como el glutamato (excitatorio) y el GABA (inhibitorio) pueden estar desbalanceados, favoreciendo la excitación excesiva (Kandel et al., 2000).

Un potencial de acción neuronal tiene tres etapas principales: despolarización, repolarización e hiperpolarización. La despolarización inicial está determinada por el voltaje umbral de la célula, el potencial de membrana al cual los canales de sodio dependientes por voltaje (Nav) se abren para permitir la entrada de iones de Na^+ , el flujo de los iones hacia la célula provoca una mayor despolarización de la membrana, abriendo así más canales de sodio dependientes por voltaje en un ciclo de retroalimentación positiva. La despolarización en neuronas maduras dura aproximadamente 1 ms, momento en el cual los Nav se inactivan y dejan de ser capaces de transportar iones. La repolarización comienza con la apertura de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), como la cinética del canal de potasio es mucho más lenta, después de aproximadamente 1 ms, se produce una apertura de los canales Kv, más lentos, que coincide con la inactivación de los canales Nav, más rápidos (Grider MH et al., 2023).

El flujo de iones potasio fuera de la célula produce una disminución del potencial de membrana hacia el voltaje de reposo celular.

Cuando el potencial de membrana cae por debajo del umbral, tanto los Nav como los Kv comienzan a cerrarse. Sin embargo, los Kv tienen una cinética lenta y permanecen abiertos un poco más del tiempo necesario para que la célula recupere el voltaje de membrana en reposo. La breve caída del potencial de membrana por debajo del voltaje de reposo normal se denomina hiperpolarización (Grider MH et al., 2023).

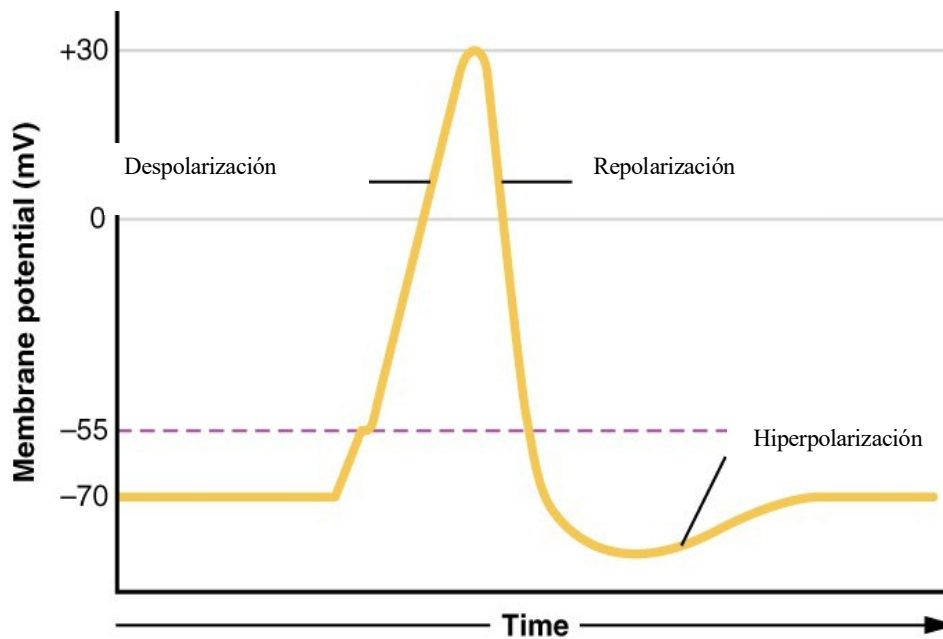


Figura 2: Representación de potencial de acción. Open Oregon State. (s.f). The action potential. En Anatomy and Physiology. <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/12-5-the-action-potential/>

2.1.3 Transmisión sináptica

Una sinapsis está formada por una terminal presináptica y una postsináptica. En la terminal presináptica (ubicada al final del axón), la señal eléctrica se convierte en señal química mediante la liberación de neurotransmisores. Estos atraviesan rápidamente el espacio sináptico (de menos de 50 nanómetros) y se unen a receptores específicos en la membrana postsináptica. El tipo de neurotransmisor y los receptores involucrados determinan la calidad e intensidad de la señal. La neurona postsináptica integra todas las señales recibidas para decidir su respuesta, como generar o no un nuevo impulso eléctrico. (Caire, M et al., 2023)

Las alteraciones en cualquiera de sus etapas ya sea por un aumento de la excitación, una disminución de la inhibición o cambios en la plasticidad sináptica pueden desencadenar una actividad neuronal desregulada, lo que es un factor central en la aparición de convulsiones.

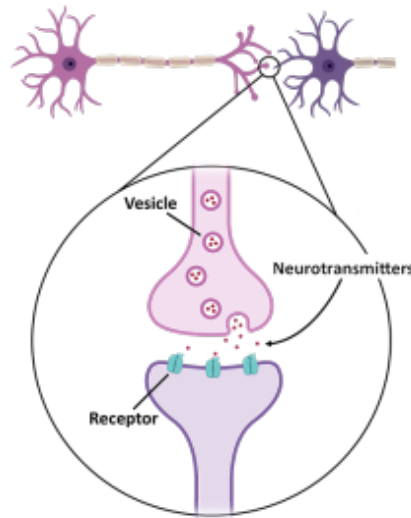


Figura 3: Ilustración sobre sinapsis neuronal, cuando la señal llega al final del axón, estimula la liberación de neurotransmisores a partir de vesículas en la hendidura sináptica, al cruzar la sinapsis se unen a receptores generando una particular respuesta en la célula. Recuperado de Caire M., 2023 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/>

Los astrocitos desempeñan un papel en la regulación de la homeostasis sináptica mediante la recaptación de neurotransmisores y la modulación de la excitabilidad neuronal. Disfunciones en los astrocitos pueden contribuir a la epileptogénesis. Los astrocitos son un tipo de células gliales altamente especializadas que superan en número a las neuronas por más de cinco veces. Estas células cubren de forma continua todo el sistema nervioso central (SNC) y desempeñan múltiples funciones esenciales y complejas para mantener su salud y funcionamiento normal (Caire, M et al., 2023).

Cuando el SNC sufre algún tipo de daño o lesión, los astrocitos reaccionan a través de un proceso llamado astrogliosis reactiva. Esta respuesta se ha convertido en un marcador patológico característico de las lesiones estructurales del SNC (Sofroniew et al., 2010). Se ha identificado que los astrocitos reactivos poseen un amplio repertorio molecular para responder a las lesiones, y los modelos experimentales con ratones transgénicos están permitiendo estudiar aspectos específicos de este proceso, incluyendo la formación de cicatrices gliales. Un descubrimiento clave es que la astrogliosis reactiva no es un fenómeno uniforme, sino un proceso gradual y dependiente del contexto, regulado por señales moleculares específicas. Este proceso puede variar desde cambios reversibles, como la modificación en la expresión génica y el aumento del tamaño celular (hipertrofia), hasta alteraciones permanentes, como la

reestructuración del tejido y la formación de cicatrices duraderas que afectan la arquitectura del SNC (Sofroniew et al., 2010).

La evidencia indica que la astrogliosis reactiva puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. Por un lado, puede representar una respuesta protectora. Por otro, puede contribuir o incluso ser causa primaria de ciertas enfermedades neurológicas, ya sea por la pérdida de funciones normales de los astrocitos o por la ganancia de funciones anormales (Sofroniew et al., 2010).

2.1.4 Glía

Las células gliales con células especializadas y superan a las neuronas en la corteza cerebral en más de 3:1 según algunas estimaciones, con los oligodendrocitos aproximadamente el 75% de la glía cortical, seguido de los astrocitos 17% y la microglía 6.5%, la glía ejerce diversas funciones neuronales y está involucrada en el control activo de la actividad neuronal y la plasticidad, apoya la homeostasis del microambiente extracelular a través del buffer iónico y el reciclaje de neurotransmisores, mantiene la integridad y función de la permeabilidad de la BHE, controla la inflamación y promueve la respuesta inmune y la restauración de la función neuronal de las células cerebrales (Peng Chen et al., 2022).

La desregulación de las funciones gliales puede causar o promover el desencadenamiento de convulsiones, mediante un aumento de la excitabilidad y la inflamación (Sokolova et al., 2022). En los focos epilépticos, los astrocitos sufren cambios en su morfología, composición molecular y proliferación, este proceso es conocido como 'astrogliosis reactiva', y representa un espectro de cambios que dependen de la naturaleza y severidad de las lesiones. En el cerebro epiléptico, los astrocitos reactivos muestran cambios fisiológicos y moleculares, como la reducción de la corriente rectificadora interna de K^+ o alteraciones en los transportadores o sistemas enzimáticos que pueden estar detrás de la hiperexcitabilidad epiléptica. Las glías reactivas liberan citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y otras moléculas para mitigar o prevenir el daño cerebral regulando la respuesta inflamatoria, eliminando desechos e induciendo la plasticidad sináptica y la remodelación del tejido. Sin embargo, una gliosis reactiva descontrolada puede causar una inflamación excesiva, muerte neuronal y daño tisular (Patel et al., 2019).

2.1.5 Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera de difusión que impide el flujo al parénquima cerebral de ciertas moléculas con base en su polaridad y tamaño (Sofroniew et al., 2010). Está formada por células endoteliales vasculares cerebrales que forman una capa continua, que separa la circulación periférica del sistema nervioso central. Las células endoteliales están en estrecho contacto con astrocitos, pericitos y neuronas, manteniendo una interacción intercelular cooperativa para mantener la homeóstasis cerebral, controlar selectivamente el suministro de nutrientes y solutos transportados por la sangre a parénquima cerebral, también participan en la modulación de la expresión funcional de las maquinarias de transporte selectivo de entrada y salida de nutrientes y fármacos., las pequeñas moléculas hidrófilas polares (aminoácidos , y carbohidratos) explotan los sistemas de transporte SLC facilitadores o pasivos, mientras que para las macromoléculas utilizan vías que involucran transportador mediado por receptor (TMR) (Van Vliet et al., 2014) (Bara, J et al., 2016). Algunos fármacos son inefectivos debido a que dado sus propiedades no logran atravesar la barrera, éstos pueden ser neuropéptidos, proteínas y agentes quimioterapéuticos, la disfunción de la BHE se ha implicado en la fisiopatología de varios trastornos neurológicos, incluida la epilepsia, en la que puede contribuir a la progresión de la enfermedad y a la resistencia a los fármacos (Loch-Neckel G et al., 2010).

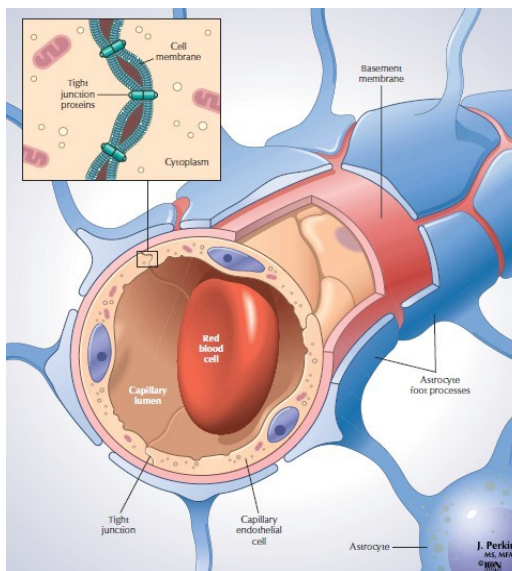


Figura 4: Ilustración de barrera hematoencefálica con sus componentes recuperada de <https://www.rit.edu/spotlights/blood-brain-barrier>

Cuando la BHE se daña se pueden filtrar sustancias provocando cambios en el potencial de acción y la entrada de albúmina y zinc alterando el equilibrio químico y eléctrico de las neuronas, cómo se revisó en el apartado del potencial de acción, el K^+ es el principal ion que regula la excitabilidad neuronal para repolarizar rápidamente las neuronas excitadas, además de los mecanismos energéticos propios de la neurona, es necesaria la acción de los astrocitos, que amortiguan el exceso de K^+ pero cuando falla aumenta la excitabilidad y las crisis, y como también hay paso a la albúmina interfiere con la regulación de potasio y glutamato (Han, J. et al., 2024). Por ejemplo, en la epilepsia del lóbulo temporal mesial (ELTM), la esclerosis hipocampal es el cambio patológico más común, y de acuerdo con Guan, Z y cols. se han observado anomalías en la vasculatura y los astrocitos en las lesiones de esclerosis hipocampal, lo que indica que se ha interrumpido la función normal de la BHE, pudiendo estar asociado con numerosas lesiones del tejido cerebral, que pueden resultar del inicio de las convulsiones (Guan, Z et al., 2024).

Existen diversas rutas para que los fármacos logren atravesar la BHE, sin embargo, los más investigados son los transportadores ABC que abarca alrededor de 48 transportadores distintos categorizados en 7 familias, y el más investigado es el codificado por el gen ABCB1, es decir, la glicoproteína P (P-GP o MDRP1), proteína de resistencia a fármacos, a través de la exportación de diversos xenobióticos y metabolitos tóxicos ya que transporta diversos sustratos a través de la BHE (Bara, J et al., 2016).

2.1.6 Hipocampo

El hipocampo, ubicado profundamente en la parte medial del tálamo, desempeña un papel importante en el procesamiento de la memoria, las emociones, la navegación espacial y el aprendizaje. El hipocampo es parte de un conjunto funcional de estructuras cerebrales conocido como la formación hipocampal, que también incluye el giro dentado, el subículo, el presubículo, el parasubículo y la corteza entorrinal. Este sistema tiene una estructura neuroanatómica característica, las vías excitatorias progresan de manera unidireccional, conectando diferentes partes de la formación hipocampal y creando un circuito conocido como trisimpático. La corteza entorrinal es la principal puerta de entrada para la información sensorial que llega al hipocampo, actuando como el inicio del circuito trisimpático. Desde la

capa II de la corteza entorrinal, los axones se extienden a través del subículo hacia el giro dentado y la región CA3 del hipocampo ver figura 4 (Li, et al., 2009).

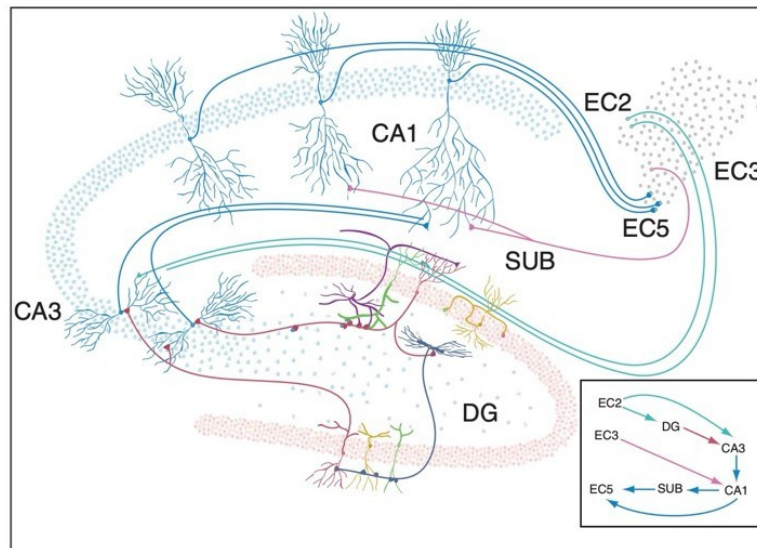


Figura 5: Señalización de las estructuras del hipocampo, CA: Cornu Ammonis: Regiones CA1, CA2 y CA3 , DG: Giro Dentado; SUB: Subículo, EC (por sus siglas en inglés): Corteza Entorrinal, Regiones EC 2, EC 3 y EC 5. Tomado de Li, et al., 2009.

Las proyecciones de la corteza entorrinal hacia el giro dentado forman parte de la principal vía de entrada al hipocampo, conocida como la vía perforante. La proyección de la corteza entorrinal medial termina en la porción media de la capa molecular del giro dentado, mientras que la proyección de la corteza entorrinal lateral termina en el tercio exterior de la capa molecular. Estas dos partes de la vía perforante también terminan en un patrón laminar en el estrato *lacunosum-moleculare* de las regiones CA3 y CA2. Las neuronas de la capa III de la corteza entorrinal proyectan hacia CA1 y el subículo. Las proyecciones que surgen de la corteza entorrinal medial terminan en el estrato *lacunosum-moleculare* de CA1, cerca de CA3; mientras que las proyecciones de la corteza entorrinal lateral terminan en la porción del estrato *lacunosum-moleculare* que se encuentra en el límite entre CA1 y el subículo (Li et al., 2009). El hipocampo es una zona del cerebro especialmente vulnerable a diversos factores dañinos que pueden desencadenar el desarrollo de la epilepsia. Es un elemento central en la fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal (ELT), motivo por el cual, en casos de TLE farmacorresistente, a menudo se opta por su extirpación quirúrgica. Debido a su papel crucial

en los trastornos convulsivos, se ha dedicado mucha investigación a analizar detalladamente la estructura y función de las diferentes áreas que lo componen (Lanerolle et al., 2009). Los impulsos sensoriales provenientes de la corteza cingulada posterior, el hipocampo contralateral, los lóbulos occipital, temporal y parietal convergen en el hipocampo a través de las vías perforantes laterales y mediales. Se sabe que las convulsiones pueden causar neurogénesis anormal en el hipocampo y formar circuitos defectuosos que interrumpen su función (Chauhan et al., 2022). El término esclerosis hipocampal (HS, por sus siglas en inglés) y epilepsia del lóbulo temporal mesial (MLTE, por sus siglas en inglés) se utilizan de manera sinónima y están involucrados en la disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia. La esclerosis es un término macroscópico y descriptivo, que indica encogimiento e induración de la estructura y pérdida neuronal selectiva con proliferación astrogliar secundaria que afecta varios sectores del hipocampo. Las señales entrantes desde la corteza entorrinal se transmiten de manera unidireccional a través del hipocampo mediante un “bucle trisimpático” que consiste en sinapsis entre células principales en tres subcampos principales: el giro dentado, CA3 y CA1 (Thom et al., 2014).

2.1.7 Desarrollo del hipocampo

El hipocampo se desarrolla durante la etapa prenatal, a partir de la proliferación y migración de células progenitoras en la región del lóbulo temporal. Durante el desarrollo, las neuronas se organizan en capas específicas, formando las distintas subregiones que son: giro dentado, CA1, CA2, CA3 y subículo Li et al., (2009). Este proceso está regulado por una compleja interacción de factores genéticos y ambientales, así como por la actividad sináptica que contribuye a la maduración de las conexiones neuronales. El hipocampo, en el lóbulo temporal, es filogenéticamente una de las partes más antiguas del cerebro y forma parte del sistema límbico. El hipocampo propiamente dicho está definido por la circunvolución dentada y *Cornu Ammonis* (CA). Mientras que la circunvolución dentada contiene la fascia dentata y el hilio, la CA es anatómica y funcionalmente diferenciado en distintos subcampos denominados CA1, CA2, CA3 y CA4. La región CA3 ha atraído una gran atención en los últimos años por su papel específico en los procesos de memoria, la susceptibilidad a las convulsiones y la neurodegeneración (Cherubini et al., 2015).

2.1.8 Neurotransmisores y Receptores: Síntesis, función y relación en la epilepsia

Los neurotransmisores son sustancias químicas endógenas que transmiten señales a través de la sinapsis y regulan las funciones neuronales excitatorias/inhibitorias al unirse a sus respectivos receptores. Generalmente se almacenan en vesículas sinápticas, terminales axónicas y se liberan en la sinapsis después de una señal adecuada. Los neurotransmisores liberados cumplen la función de conectarse a través de la hendidura sináptica y unirse a receptores específicos. El principal neurotransmisor excitatorio es el glutamato, el cual tiene un papel importante en el balance de la excitación e inhibición del cerebro, sus efectos dependen de la activación de diversos tipos de receptores de membrana (GluR), tres de estos son ionotrópicos (iGluR) nombrados por agonistas selectivos y que actúan como canales de sodio/calcio dependientes de ligando: N-metil-D-aspartato (NMDA); alfa-amino-3-hidroxi- 5-metil-isoxazolpropionato (AMPA); kainato y ocho son del tipo metabotrópico (mGluR), que dependen de proteínas G. Por otro lado, el neurotransmisor GABAérgico interactúa con dos tipos de receptores: uno ionotrópico, o receptor ionotrópico de ácido gamma- aminobutírico familia A (GABA_A), que funciona como un canal de cloruro controlado por ligando, y otro metabotrópico, o receptor ionotrópico de ácido gamma-aminobutírico familia B (GABA_B), dependiente de proteínas G. Los cambios pueden afectar la señalización neuronal mediada por los neurotransmisores mencionados como en la síntesis de sus transportadores o degradación, en consecuencia, disminuyendo la inhibición neuronal y aumento de la excitación generando mayor susceptibilidad a que el cerebro tenga convulsiones y desarrolle epileptogénesis.

Las crisis epilépticas ocurren debido a una sincronización súbita y temporal de la actividad neuronal. Los neurotransmisores que permiten la transmisión de señales entre las neuronas tienen efectos cruciales en la patogénesis de la epilepsia. La transmisión de impulsos en el sistema nervioso está modulada por neurotransmisores excitatorios e inhibitorios. Las crisis representan el resultado de un desequilibrio en la estimulación eléctrica. Los cambios entre el principal neurotransmisor excitatorio, el glutamato, y el inhibitorio, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), desempeñan un papel crítico en el equilibrio de la excitabilidad celular. Diversos modelos preclínicos, tanto in vitro como in vivo, han demostrado que el equilibrio entre GABA y glutamato se ve alterado, inclinándose hacia una mayor excitación, lo que resulta en la aparición de convulsiones.

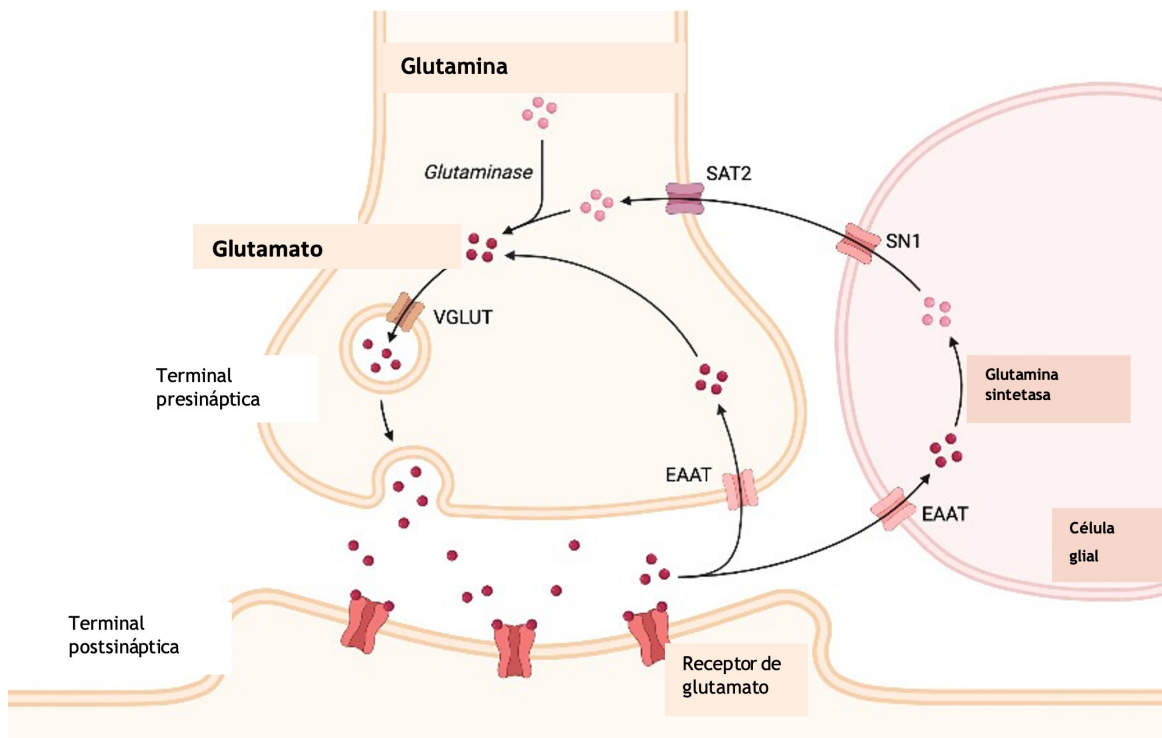


Figura 6: Síntesis de glutamato: La glutamina es transportada desde las células gliales hacia la terminal presináptica neuronal a través del transportador SAT2. En la terminal presináptica, la enzima glutaminasa convierte la glutamina en glutamato, éste es transportado hacia las vesículas sinápticas mediante un transportador (VGLUT), Transportador de aminoácidos excitatorios (EAAT). Los receptores presentes en la superficie celular participan en las funciones celulares mediadas por el glutamato. Imagen tomada y modificada de bioRender: <https://www.biorender.com/template/glutamate-synthesis-and-cycling>.

2.1.9 Circuitos neurales: Alteraciones de los circuitos neuronales en la epilepsia

Los circuitos neurales son redes de neuronas interconectadas que trabajan juntas para procesar información y generar respuestas en el sistema nervioso. En el contexto de las crisis convulsivas, los circuitos neurales desempeñan un papel crucial, ya que estas crisis suelen ser el resultado de actividad eléctrica anormal y excesiva en el cerebro. podemos identificar cuatro componentes principales de la anatomía funcional de la convulsión: 1) el foco de la convulsión, 2) el circuito iniciador, 3) las vías de propagación o reclutamiento y 4) los centros moduladores. El foco de la convulsión es el sitio que en dónde se lleva a cabo el impulso donde inicia la convulsión. Puede ser pequeño o grande, pero sin el foco, las convulsiones no comenzarán. El circuito iniciador es el conjunto de regiones interconectadas que son

necesarias para soportar el inicio del foco y convertirla en una convulsión. Si una convulsión se propaga fuera del circuito iniciador, tiene que reclutar otras regiones a través de vías definidas. Un centro modulador es cualquier región fuera del circuito iniciador o las vías de propagación que influyen en el umbral de convulsión. La ubicación de los cuatro componentes varía según el tipo de convulsión, pero hay datos que respaldan su existencia. El lóbulo temporal alberga estructuras críticas para la propagación y generalización de las crisis convulsivas, como el hipocampo, la amígdala y la corteza entorrinal. En la ELT, estas áreas pueden exhibir hiperexcitabilidad neuronal y sincronización anormal de la actividad eléctrica. La desregulación de los circuitos neuronales en el lóbulo temporal puede ser desencadenada por varios factores, incluyendo lesiones cerebrales traumáticas, infecciones, malformaciones corticales o predisposiciones genéticas (Spencer, 2002).

- Canales Iónicos y Neurotransmisores

La disfunción de los canales iónicos juega un papel crucial en la fisiopatología de la ELT. Los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} son fundamentales para la generación y propagación de los potenciales de acción. En la ELT, se ha observado una alteración en la expresión y función de estos canales, lo que contribuye a la excitabilidad neuronal excesiva (Rogawski y Löscher, 2004). Además, los neurotransmisores son clave en la modulación de la actividad neuronal. El desequilibrio entre los neurotransmisores excitatorios e inhibitorios puede facilitar la aparición de crisis convulsivas. En la ELT, se ha observado una disfunción en la liberación y recepción de estos neurotransmisores, lo que resulta en una predisposición a la hiperexcitabilidad neuronal (Cossart et al., 2005).

- Plasticidad Sináptica

La plasticidad sináptica, que incluye procesos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), también está implicada en la ELT. Estos procesos son fundamentales para la adaptación y el fortalecimiento de las sinapsis neuronales. En la ELT, la plasticidad sináptica puede estar desregulada, llevando a una reorganización anormal de las conexiones sinápticas y contribuyendo a la perpetuación de la actividad epiléptica (Beck y Yaari, 2008).

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Historia de la Epilepsia

La historia de la epilepsia ha sido un gran camino ya que abarca miles de años y está profundamente entrelazado con la historia de la humanidad. Los primeros informes sobre la presente enfermedad neurológica se remontan a civilizaciones antiguas, con referencias encontradas en textos de las culturas asiria, babilónica y griega antigua. Desde una perspectiva histórica, el estudio de la epilepsia ha evolucionado considerablemente, desde las interpretaciones míticas en la antigüedad hasta los avances científicos modernos, la percepción y comprensión. En las culturas antiguas, las crisis epilépticas se atribuían a fuerzas místicas o posesiones demoniacas, incluso, en la antigua Grecia, la epilepsia se conocía como “la enfermedad sagrada” y se vinculaba con el Dios de la curación, Asclepio. Los tratamientos a menudo involucraban rituales espirituales y prácticas supersticiosas (Kaculini et al., 2021). Durante la Edad Media, las interpretaciones de la epilepsia se volvieron más sombrías, asociándola a menudo con la brujería y maleficios, el desconocimiento de las causas reales de las convulsiones llevó a estigmatizar a las personas con epilepsia, considerando que estaban poseídas o castigadas por sus supuestos pecados (Patel et al., 2020).

El renacimiento marcó el comienzo de una transición hacia una comprensión más científica, el médico Thomas Willis, en el siglo XVII, realizó observaciones detalladas sobre las convulsiones y reconocieron que la epilepsia tenía raíces neurológicas. No obstante, persistieron ideas erróneas, como la creencia de que las personas con epilepsia eran peligrosas o mentalmente enfermas, lo que llevó a su comprensión significativa durante los siglos XVIII y XIX, a medida que los avances médicos emanciparon el estudio de la epilepsia de las supersticiones religiosas. Médicos como William Cullen, Samuel A. Tissot y la escuela de medicina francesa hicieron importantes contribuciones a la comprensión científica de la epilepsia, categorizando diferentes formas de la afección y enfatizando la importancia de los estudios clínicos y postmortem (Magiorkinis et al., 2014).

A medida que avanzaba la medicina en los siglos XVIII y XIX, se produjo una mayor aceptación de las bases biológicas de la epilepsia. Figuras como John Hughlings Jackson contribuyeron al entendimiento de la actividad cerebral anormal que subyace a las convulsiones, sus estudios patológicos y anatómicos sentaron las bases científicas de la epileptogénesis, y su definición de epilepsia como "descargas ocasionales, repentinas, excesivas, rápidas y locales

de materia gris" proporcionó un marco significativo para futuras investigaciones. No obstante, la estigmatización social y la falta de tratamientos efectivos continuaron siendo desafíos. El siglo XX marcó un hito con el advenimiento de la electroencefalografía (EEG), que permitió registrar la actividad eléctrica del cerebro y revolucionó el diagnóstico de la epilepsia. El descubrimiento de medicamentos antiepilépticos, como la fenitoína, en la década de 1930, proporcionó opciones de tratamiento más efectivas, además, la investigación sobre los factores genéticos que contribuyen a las convulsiones epilépticas amplió aún más nuestra comprensión de la afección. En las últimas décadas, la investigación genética y los avances en neurociencia han arrojado luz sobre las bases moleculares y genéticas de la epilepsia, permitiendo enfoques más precisos en diagnóstico y tratamiento (Magiorkinis et al., 2014). Aunque se ha progresado significativamente en el conocimiento y manejo de la enfermedad, persisten desafíos, incluida la erradicación del estigma social y el desarrollo de terapias más personalizadas. La historia refleja el viaje desde explicaciones mitológicas hasta un entendimiento más profundo y científico, destacando la importancia de la investigación continua en este campo. En general, la historia de la epilepsia refleja la búsqueda permanente para comprender, tratar y, en última instancia, conquistar esta compleja afección neurológica, y cada época contribuye al conocimiento acumulado y al progreso en el campo.

3.2 Epileptogénesis

La epileptogénesis se refiere a un proceso dinámico, que en algunas ocasiones es iniciado por un estímulo que altera las características normales del cerebro y lo conduce a un estado de convulsiones crónicas. La epilepsia es un trastorno progresivo asociado a la pérdida continua de tejido y función cerebral, convulsiva inducida por descargas eléctricas anormales, provocando una respuesta motora incontrolada, asociada a cambios en la función sináptica. Dependiendo de la región del cerebro donde ocurra la hiperexcitabilidad, las convulsiones epilépticas consisten (entre otros síntomas) en pérdida de conciencia, o breve pérdida de conciencia, temblores corporales, confusión, y dificultad para responder, síntomas visuales o sensoriales enfermedad (Lukasiuk., 2014).

El término epileptogénesis describe el proceso patológico que sufre el cerebro hasta transformarse en un cerebro epiléptico, es decir, capaz de generar espontáneamente las crisis convulsivas, haciendo referencia a la latencia desde el daño ocasionado (lesión traumática cerebral, convulsiones febriles, infarto, infección, *status epilepticus* o hemorragia intracerebral)

hasta la aparición de crisis convulsivas espontáneas y como tal el diagnóstico de la enfermedad (Lukasiuk., 2014).

En tales casos, un evento inicial induce una cascada compleja de cambios en el cerebro que desencadena una secuencia dinámica de eventos que incluye cambios estructurales, celulares y moleculares en el tiempo, pero no está claro cuáles causan el desarrollo de la epilepsia (Lukasiuk., 2014). La esclerosis hipocámpal, caracterizada por la pérdida de neuronas piramidales e inhibitorias en las regiones CA1-CA3 del hipocampo es común en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ELT), la forma más prevalente de epilepsia. La patología predominante en estos pacientes es la pérdida de neuronas en el hilio, conocida como esclerosis del endofolio. La lesión cerebral y la neurodegeneración van acompañadas de la activación de las células gliales (gliosis). Las células gliales pueden contribuir al proceso epileptogénico de varias maneras. Los astrocitos participan en la regulación de K^+ extracelular, la captación de glutamato y sus concentraciones sinápticas, además de producir y secretar varias moléculas, incluidas proteasas o mediadores inflamatorios. Las alteraciones en la función de los astrocitos pueden resultar en modificaciones de la transmisión sináptica y llevar a un aumento de la actividad convulsiva, además de que pueden formar una cicatriz que impide el crecimiento de axones y vasos sanguíneos en la zona del cerebro dañada.

La microglía también se activa en respuesta a la lesión cerebral y lleva a la eliminación de células dañadas del tejido, una vez activada la microglía libera mediadores inflamatorios, proteasas o factores tróficos, algunos pueden ser dañinos para las neuronas (interleucina-1, interleucina-6, factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) y sus receptores, proteasas y óxido nítrico). Otros pueden ser neuroprotectores (factor de crecimiento transformante beta, factor neurotrófico derivado del cerebro, neurotrofina-3 o factor de crecimiento nervioso) (Lukasiuk., 2014).

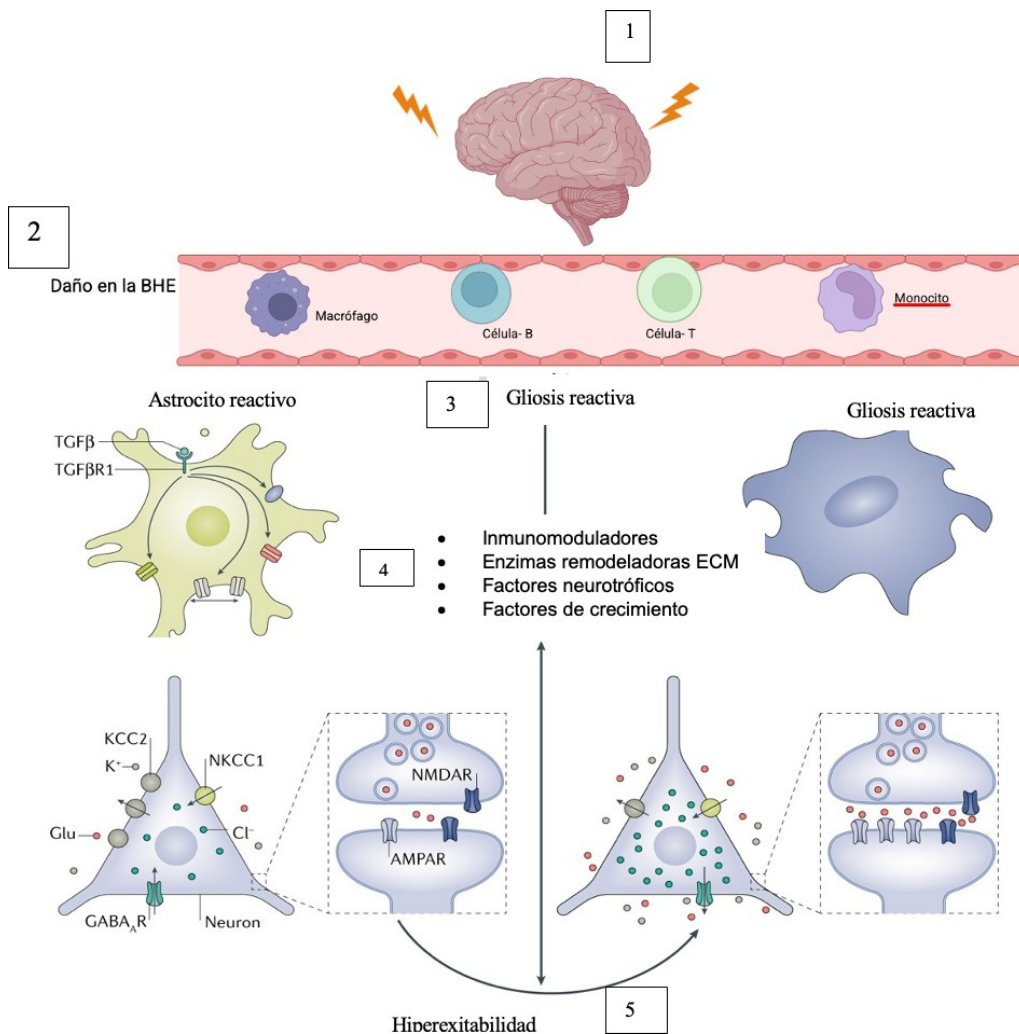


Figura 7: Las causas que pueden llevar al desarrollo de la epileptogénesis son diversas, (1) desde una lesión traumática cerebral, hasta las convulsiones febriles, infarto cerebral, neuroinfecciones, *status epilepticus* o hemorragia intracerebral, además de causar alteraciones de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). (2) El daño a la BHE incrementa su permeabilidad y promueve la extravasación de albúmina sérica, células inmunes periféricas (macrófagos, monocitos, células B y células T) y quimiocinas hacia el parénquima cerebral, donde, junto con la agresión directa al SNC, inducen gliosis reactiva. (3) La respuesta inflamatoria promueve alteraciones en las células gliales que se conoce como gliosis reactiva que se refiere a cambios morfológicos (hipertrofia de los cuerpos y procesos celulares) y fisiológicos (cambios en la expresión y funciones de muchas proteínas gliales) en las células gliales en respuesta a diversas lesiones del SNC. (4) La glía reactiva libera enzimas remodeladoras de la matriz extracelular (MEC), como las metaloproteinasas de matriz (MMP), factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) e inmunomoduladores como citoquinas que modulan

la expresión y función de receptores, transportadores, enzimas y otras moléculas implicadas en las funciones de la neurotransmisión excitadora e inhibidora mediante una variedad de mecanismos. Las MMP pueden agravar el deterioro de la BHE al dañar las conexiones de las uniones estrechas (TJ) y promover la infiltración de proteínas séricas en el cerebro. Además del TGF β , se sabe que la albúmina sérica activa la señalización del receptor 1 de TGF β (TGF β R1) en los astrocitos al interactuar directamente con el TGF β R1. En consecuencia, la expresión en la membrana del canal de potasio rectificador interno 4.1 (K $_{ir}$ 4.1), el transportador de aminoácidos excitadores 2 (EAAT2) y la proteína de unión comunicante conexina 43 (Cx43) disminuyen. La activación de TGF β R1 también cambia el tráfico y la expresión superficial de la acuaporina 4 (AQP4). Como resultado, aumentan las concentraciones extracelulares de K $^{+}$ y glutamato (Glu), lo que promueve la hiperexcitabilidad de la red. El control de la concentración de Cl $^{-}$ también es crucial para regular la hiperexcitabilidad. El cotransportador K $^{+}$, Cl $^{-}$ (KCC2; un exportador de cotransportador Na $^{+}$ -K $^{+}$ + -Cl $^{-}$ - (NKCC1; un importador de Cl $^{-}$) desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de una baja concentración de Cl $^{-}$ intracelular que es esencial para mantener la actividad inhibidora de la neurotransmisión GABAérgica. BDNF disminuye la expresión de membrana de KCC2, lo que provoca una acumulación neta de Cl $^{-}$ intracelularmente y la inversión del flujo de Cl $^{-}$ a través del receptor GABA tipo A (GABAA). Por tanto, la activación de GABAA paradójicamente, el receptor GABAA provoca hiperexcitación. Las citocinas (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF) liberadas por la glía reactivada pueden aumentar la densidad postsináptica de los receptores AMPA y la neurotransmisión excitadora. (5) Como consecuencia, se producen hiperexcitabilidad de la red y convulsiones debido a la alteración de K $^{+}$, Cl $^{-}$ y amortiguación de glutamato y al desequilibrio en la neurotransmisión excitadora e inhibidora. Es importante destacar que las convulsiones pueden agravar la condición gliótica al aumentar aún más la liberación de moléculas neuromoduladoras, estableciendo el círculo vicioso de gliosis y convulsiones. Recuperado y modificado de Patel *et al* 2019 (Patel, 2019).

3.2 Ictogenesis

Ictogenesis describe el proceso de transición del estado interictal a la convulsión. Es el proceso donde un cerebro se convierte en epileptogénico, se considera que ocurre rápidamente, en periodos de segundos a minutos y es más difícil de detectar por signos clínicos o actividad eléctrica.

Las descargas preictales desencadenan convulsiones, estas involucran redes distintas para la generación de eventos interictales, las señales glutamatérgicas son generadas por el disparo de las células piramidales y la mayoría de las células piramidales subiculares se activan durante el estallido preictal.

La señalización glutamatérgica es crucial en la ictogenesis, desde el bloqueo de los receptores AMPA típicamente suprime los eventos ictales, en el subiculum los receptores antagonistas de NMDA

suprimen la convulsión inicial por descargas preictales, aunque éstas no son bloqueadas (Blauwblomme et al., 2014).

3.3 Clasificación de convulsiones



Figura 8 : Clasificación extendida de las crisis convulsivas, que incluye descriptores que son características clínicas importantes de las crisis que, junto con otros datos y modalidades clínicas, contribuyen indirectamente a dar forma al manejo del paciente. Recuperado y Modificado de Beniczky, S et al., 2025. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.18338>

Tabla 1. Clasificación de las crisis convulsivas

Crisis Focales	
Tipo	Descripción
Inician en una región o red limitada de un hemisferio cerebral.	Pueden ser motoras o no motoras y se subdividen en: Crisis Focales Aware: El paciente conserva la conciencia. Crisis Focales Impaired Awareness: La conciencia está alterada. Crisis Generalizadas: Inician y afectan redes neuronales de ambos hemisferios cerebrales simultáneamente, pueden ser motoras o no motoras.
Crisis Motoras Generalizadas	
Incluyen crisis tónico-clónicas, clonías, tónicas, atónicas, mioclonías y espasmos epilépticos.	
Crisis No Motoras Generalizadas (Ausencias)	
Se subdividen en típicas, atípicas, con mioclonías y con ausencias palpebrales.	
Crisis de Origen Desconocido	
Cuando el inicio de la crisis no puede determinarse como focal o generalizado. Pueden ser motoras (por ejemplo, tónico-clónicas) o no motoras.	

3.5 Tipos de crisis convulsivas

Las epilepsias se clasifican con base en la combinación de tipos de crisis, datos clínicos, antecedentes familiares y estudios diagnósticos (por ejemplo, EEG, neuroimagen). Se identifican cuatro tipos principales (ver tabla 2).

Tabla 2. Tipos de epilepsia de acuerdo con su etiología.

Tipo de crisis convulsiva	Descripción	Etiología
Epilepsia focal	Crisis que se originan en una región específica del cerebro.	Incluyen lesiones estructurales, genéticas, infecciosas, metabólicas, inmunológicas e idiopáticas.
Generalizada	Crisis que afectan redes neuronales de ambos hemisferios cerebrales desde el inicio.	Frecuentemente genéticas y se presentan sin evidencia de una lesión estructural focal.
Combinada Generalizada y Focal	Presencia de ambos tipos de crisis (focales y generalizadas).	Pueden tener una base genética o ser resultado de condiciones adquiridas que afectan múltiples redes neuronales.
Desconocida	Cuando no es posible determinar si la epilepsia es focal, generalizada o combinada.	

3.6 Síndromes Epilépticos

Son un conjunto de características clínicas y electroencefalográficas que ocurren juntas. Los síndromes ayudan a guiar el diagnóstico y tratamiento:

- Epilepsia Rolándica Benigna: Una epilepsia focal benigna de la infancia que se resuelve espontáneamente.
- Síndrome de Lennox-Gastaut: Una forma grave de epilepsia infantil que incluye múltiples tipos de crisis y un EEG característico con puntas y ondas lentas.
- Síndrome de West: Caracterizado por espasmos infantiles, un patrón EEG llamado hirsarritmia y retraso en el desarrollo psicomotor.

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es una forma de epilepsia focal que se origina en uno o ambos lóbulos temporales del cerebro. Este trastorno neurológico es uno de los más comunes de epilepsia y puede ser muy resistente al tratamiento. La ELT se caracteriza por crisis convulsivas que pueden afectar la memoria, el comportamiento y las emociones debido a la función crítica del lóbulo temporal en estos procesos, su fisiopatología implica una compleja interacción de alteraciones

estructurales, funcionales y bioquímicas en el cerebro. Una de las características más notables de la ELT es la esclerosis del hipocampo, que se refiere a la pérdida de neuronas y la gliosis (proliferación de células gliales) en el hipocampo. Este fenómeno se ha asociado con una mayor propensión a las crisis convulsivas debido a la disfunción de los circuitos neuronales en esta región (Engel., 2001).

3.7 Modelos animales en el estudio de las crisis convulsivas

Como se ha mencionado, la epilepsia es uno de los trastornos neurológicos que afecta a personas de todas las edades, de forma general, se caracteriza por la presencia de espontáneas y recurrentes convulsiones, si bien, hay fármacos para el control de las convulsiones en un tercio de la población estos son ineficaces para el control de estas, desde hace muchos años con motivo de desarrollar estrategias terapéuticas eficaces la comprensión del desarrollo de la epilepsia (epileptogénesis) es crucial para el estudio de los cambios que ocurren en el cerebro después de la lesión o el daño o antes de que se desencadene el trastorno. Como sabemos, no es posible desarrollar estos cambios en tejido humano por obvias razones éticas, sin embargo, los modelos animales han contribuido inmensamente en mejorar nuestro entendimiento en el mecanismo tanto de la epileptogénesis como en la generación de convulsiones. Existen modelos animales que son capaces de replicar al menos algunas características de la epilepsia en humanos. (Raol et al., 2012)

Desde que Tracy Putnam y H. Houston Merritt descubrieron la actividad anticonvulsiva de la fenitoína en un modelo animal en 1937, los modelos animales tienen un rol crucial para el conocimiento del mecanismo de la epilepsia y para el desarrollo de nuevos tratamientos. Las convulsiones pueden inducirse en modelos in vivo e in vitro que son capaces de replicar algunos de los síndromes o características de la epilepsia en humanos, en los modelos in vivo encontramos el kindling químico y eléctrico. El fenómeno conocido como “kindling” consiste en la estimulación repetida de una estructura del sistema límbico, generalmente la amígdala o el hipocampo, mediante la aplicación de un agente químico o eléctrico. Aunque inicialmente el estímulo es subconvulsivante, con el tiempo provoca un aumento en la excitabilidad neuronal y, en consecuencia, una reducción del umbral

para desencadenar convulsiones. En los modelos de kindling eléctrico, se implantan crónicamente electrodos de estimulación en estructuras del sistema límbico u otras áreas del cerebro, siendo la amígdala una de las regiones más sensibles a este procedimiento. Para el kindling deben satisfacerse los criterios siguientes (Raol et al., 2012, Sarkisian, 2001)

- Fenotipo de la convulsión y características del electroencefalograma (EEG)
- Patrones electrofisiológicos similares a los observados en humanos.
- El modelo debe responder a los fármacos anticonvulsivos de manera similar en humanos.
- Las características de comportamiento deben reflejar las observadas en humanos.
- El modelo debe replicar los cambios patológicos específicos observados en humanos.

El kindling fue descubierto por Graham Goddard en 1969 mientras estimulaba eléctricamente la amígdala una vez al día para interrumpir el proceso de aprendizaje en ratas. Al seguir estas observaciones, tomó diferentes intensidades de corriente y estimuló eléctricamente varias regiones subcorticales del cerebro, y observó que los animales desarrollaron convulsiones tónico-clónicas generalizadas en dos semanas. Curiosamente, algunas regiones del cerebro eran más receptivas a la estimulación eléctrica que otras, ya que el hipocampo y la corteza entorrinal se estimularon completamente en 53 días, mientras que la amígdala tardó sólo 15 días en activarse por completo (Singh et al., 2021). Entre las sustancias empleadas en el kindling químico se encuentran la pilocarpina, el ácido kaínico, toxina tetánica, y el pentilinetetrazol (PTZ).

3.8 kindling químico con Pentilinetetrazol (PTZ)

El PTZ es una molécula que bloquea de forma selectiva los canales de cloro (Cl-) acoplados al receptor GABAA y es asociado con la reducción en la neurotransmisión mediada por GABA en el sistema nervioso central (Gilbert et al., 2006), las características del modelo de convulsiones con PTZ son fácilmente identificable, pues aparece gradualmente la capacidad de respuesta a las convulsiones y, con

suficientes repeticiones, la mayoría de los animales progresan a convulsiones clónicas y las mantienen una mayor susceptibilidad en menor tiempo y menor mortalidad (Gilbert et al., 2006, Samokhina, E et al., 2018)

Se utiliza en modelos de epileptogénesis, comorbilidades asociadas a la epilepsia y la epilepsia refractaria, estudios reportados por Singh y colaboradores reportaron que en 1972 Mason y Cooper administraron PTZ (20 mg/kg) cada 48 h, lo que provocó espasmos mioclónicos y, finalmente, convulsiones tónico-clónicas generalizadas en ratas, implementando por primera vez el kindling químico con PTZ, Karler en 1989 reprodujo este modelo en ratones e inyectaron dosis crecientes de PTZ (40, 45, 50, 80, 85, 90 mg/kg s.c) en diferentes cohortes de animales. La administración de PTZ (50 mg/kg) cada 24 h y 48 h logró el kindling en el 80% de los animales después de 15 inyecciones (Chakraborty, S et al 2022).

Por ejemplo, una inyección aguda de PTZ en roedores a una dosis umbral (60 a 100 mg/kg, i.p. o s.c.) provoca sacudidas mioclónicas, *clonus* y extensión tónica. Sin embargo, la administración repetida de PTZ a dosis inferiores al umbral (20 a 40 mg/kg, i.p.) puede inducir fenómenos de ignición (Dhir et al., 2012). Las dosis repetidas del proconvulsivo afecta el sistema GABAérgico y glutamatérgico en diversas áreas del cerebro, como el hipocampo, estudios previos señalan que en el cerebelo se generan especies reactivas de oxígeno (Hansen et al., 2004). Recientemente, se ha mostrado que la administración de dosis convulsivas de PTZ causan un incremento significativo en la oxidación de los ácidos grasos del cerebro, sin embargo, no hay cambios en los niveles de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) o la glutatión peroxidasa (GPX) en hipocampo de rata. Con respecto al hipocampo, se ha demostrado que las actividades de las enzimas metabólicas clave del cerebro de la rata están alteradas con respecto a las observadas en el kindling con PTZ, y estos cambios aparecieron principalmente en el hipocampo y en la corteza frontal. Sin embargo, las convulsiones agudas de la misma intensidad inducidas por el tratamiento con PTZ o el tratamiento con dosis subconvulsiva, no indujeron estas alteraciones metabólicas (Nikolaos et al., 2004).

La aplicación de PTZ causa atrofia del hipocampo en ratas por la pérdida neuronal selectiva y la astrocitosis. Además, en los estudios de resonancia magnética (RMN) es visible una disminución en el volumen del cerebelo (Postnikova et al., 2022).

También se ha descrito que el PTZ es un bloqueador del canal de cloruro del receptor GABA_A que tiene efectos convulsivos después de la administración de dosis repetidas o únicas y también afecta a diversos sistemas de neurotransmisores, como los sistemas GABAérgico y glutamatérgico. Tanto los receptores GABA_A como los GABA_B que están implicados en el control de la excitabilidad neuronal y la epileptogénesis, aunque se ha descrito el mecanismo de inhibición de los receptores GABA_A en el control de las crisis convulsivas generalizadas, se conoce poco sobre el papel del receptor GABA_{B1} en la epilepsia y su posible expresión y distribución molecular (Naseer et al., 2009). El kindling producido por PTZ se relaciona con la atenuación permanente de la función inhibitoria del sistema GABAérgico en el cerebro. Se afirma que el PTZ ejerce su actividad a través de la inhibición de los canales activados por GABA, por lo que, se sugiere que su actividad se debe especialmente al bloqueo de los receptores GABA_A. Éstos tienen sitios de unión alostéricos y hay fármacos que pueden bloquear la entrada de Cl⁻ a través de estos sitios de unión, donde el PTZ muestra su actividad uniéndose al sitio donde se une la picrotoxina (PTX) en los receptores GABA_A y probablemente ejerce su actividad a través de la interacción con el segundo dominio transmembrana (TM2). Hay hallazgos sobre alteraciones en el mecanismo del receptor GABA_B durante el kindling generado con PTZ de acuerdo con resultados de estudios sobre aprendizaje y memoria, además se reporta que los niveles de los transportadores de GABA puede ser determinante para la vulnerabilidad a crisis convulsivas y a la epileptogénesis (Erkeç & Arihan, 2015).

3.9 Cambios en el sistema glutamatérgico

La administración de PTZ en ratas causa alteración en la densidad y sensibilidad en los subtipos de receptores de glutamato, el aumento en la densidad del glutamato en el hipocampo, cambios neuroquímicos, conductuales y neurofisiológicos que son causados durante el kindling con PTZ como el aumento de la densidad de

receptores metabotrópicos e IP3 (trifosfato de inositol), se ha reportado previamente que los cambios en la expresión molecular en los transportadores de glutamato en el proceso de ignición pueden desencadenar el desarrollo de epileptogénesis, además de que la participación del N-metil-D-aspartato (NMDA) desempeña un papel en la epileptogénesis (Erkeç & Arihan, 2015).

También se ha descrito que la plasticidad neocortical a largo plazo provocada por kindling con PTZ; puede generarse por una alteración en el delicado equilibrio entre la inhibición y la excitación neuronal (una disminución relativa de la inhibición y un aumento relativo de la excitación o una combinación de ambas). Debido al que el kindling provoca un aumento en la liberación de GABA en el hipocampo y una disminución en la sensibilidad de los receptores de GABA. Las convulsiones inducidas por PTZ comienzan por la activación del receptor de glutamato y la inhibición de los neurotransmisores inhibidores de GABA y pasan a forma generalizada, con el colapso de la inhibición mediada por GABA_A, se atribuye a la activación del receptor NMDA. Además, el ácido α -amino-3- hidroxil-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), que se encuentra entre los receptores ionotrópicos de glutamato, parece desempeñar un papel en los mecanismos epileptogénicos. En un estudio relacionado, se reportó que los receptores AMPA desempeñan un papel en la corteza y los ganglios basales para mantener el fenómeno de kindling de PTZ (Erkeç & Arihan, 2015).

3.10 Escala de Racine

Para evaluar las alteraciones conductuales en los modelos de epilepsia se utiliza la escala de Racine, que fue originalmente estandarizada para evaluar los diferentes estadios del desarrollo de convulsiones en el modelo de kindling de amígdala y fue estandarizada utilizando estudios de EEG. En general, diferentes regiones del cerebro (corteza, cerebelo, regiones protuberil-medulares y ganglios basales (núcleo *caudatus*, putamen), son evaluadas para caracterizar los cambios fisiológicos en el modelo de PTZ Sin embargo, en todos los estudios la región del hipocampo se considera que tiene una participación muy importante en el desarrollo de crisis convulsivas (Erkeç & Arihan, 2015).

La escala de Racine, es una de las herramientas más utilizadas para evaluar la intensidad de una convulsión en modelos experimentales de epilepsia en roedores, tanto en modelos químicos y eléctricos (kindling), uno de ellos es la administración de PTZ, ya que puede generar convulsiones agudas o crónicas, con propiedades de bloquear selectivamente los canales de cloruro acoplados al receptor GABA_A su acción pro- convulsiva se debe a que es un antagonista del receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA_A), y suprime la función de las sinapsis inhibitoras, lo que conduce a un aumento de la actividad neuronal. Esta regulación provoca convulsiones generalizadas en animales (Shimada et al., 2018). Por otro lado, la escala de Racine es muy útil para evaluar la intensidad de las convulsiones en modelos de roedores, y consta de cinco niveles de intensidad de acuerdo con el comportamiento repetitivo de los animales como se describe a continuación:

- Etapa de intensidad 1- Movimientos faciales
- Etapa 2- Cabeceo
- Etapa 3- *Clonus* en patas delanteras
- Etapa 4- Convulsiones caracterizadas por levantamiento en dos patas.
- Etapa 5- Convulsiones caracterizadas por el levantamiento en dos patas y caída. (Lüttjohann et al., 2009).

3.11 Consecuencias de la epilepsia

El estrés oxidante es uno de los principales mecanismos de daño que se observan en diversas patologías, entre ellas la epilepsia y ocurre cuando el equilibrio normal entre los eventos pro-oxidantes y las defensas antioxidantes se ve alterados, ya sea por la pérdida de agentes reductores/enzimas antioxidantes o por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) o de nitrógeno (Bains et al., 1997).

El cerebro tiene diversas características que lo hacen especialmente vulnerable al daño causado por ERO: (1) su elevado consumo de energía y demanda metabólica, lo que hace que incluso pequeños desequilibrios puedan provocar lesiones tisulares y activar procesos de neuroinflamación; (2) el consumo neuronal de oxígeno es alto (representando el 20% del oxígeno total que ingresa al cuerpo), lo cual está

vinculado a una alta actividad mitocondrial y a la consiguiente producción de especies reactivas de oxígeno (ERO); (3) la alta concentración de lípidos en las membranas neuronales, especialmente ácidos grasos poliinsaturados, las hace muy susceptibles a la peroxidación lipídica mediada por ERO y metales con actividad redox como cobre, hierro o zinc; y finalmente (4) las neuronas a diferencia de otras células tienen defensas antioxidantes limitadas, baja capacidad de regeneración y mecanismos de apoptosis muy restringidos, lo que favorece su supervivencia, pero las deja vulnerables al daño (Sienes et al., 2022).

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que contienen un electrón no apareado en su estructura molecular, lo cual las hace extremadamente inestables. Estas moléculas pueden reaccionar con otras moléculas cercanas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, generando una cascada de reacciones en cadena que pueden causar daño a múltiples biomoléculas. En un sistema biológico, los radicales libres, especialmente el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$), son particularmente importantes debido a su capacidad para causar daño oxidante a las células. Estos radicales se forman en procesos como el ciclo redox del hierro, donde el hierro libre (Fe^{2+}) reacciona con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la reacción de Fenton y el ciclo de Haber-Weiss, que produce Fe^{2+} a partir de la reacción del superóxido con hierro férrico (Fe^{3+}). Además del hierro, otros metales de transición como cobre, también pueden contribuir a la formación de radicales OH en las células (Ayala et al., 2014).

El exceso de radicales libres y el daño oxidante a las biomoléculas de las células se conoce como estrés oxidante. Este fenómeno incluye la interrupción de los circuitos redox de los grupos tioles y la activación de vías de señalización celular aberrantes, lo que puede llevar a disfunciones celulares y a la progresión de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, y diversas condiciones dolorosas, incluyendo el dolor neuropático e inflamatorio. Los radicales libres, especialmente los radicales OH, juegan un papel crucial en el daño oxidante a las células y están estrechamente asociados con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y otros trastornos relacionados con el estrés oxidante en el cuerpo humano.

El estrés oxidante puede provocar hiperexcitabilidad y muerte de las neuronas mediante diversos mecanismos, uno de los cuales es el daño a las proteínas de la membrana, como los receptores de neurotransmisores y los canales iónicos. En las epilepsias adquiridas y en modelos animales de estas condiciones, se ha observado consistentemente que el estrés oxidante no solo es una consecuencia de la actividad convulsiva, sino que también puede empeorar los efectos de las convulsiones, como la pérdida de neuronas y el deterioro cognitivo (Ayala et al., 2014). En resumen, el estrés oxidante desempeña un papel significativo en la progresión y agravamiento del daño cerebral asociado con las convulsiones.

3.12 Fuentes de generación de las especies reactivas de oxígeno

Las mitocondrias son fundamentales en la producción y regulación de la energía celular y de la transducción de señales de muerte celular. Además de producir adenosín trifosfato (ATP), las mitocondrias también son la principal fuente de producción de EROS, estas incluyen la respiración celular y los procesos metabólicos, y en algunos casos, se ha reportado que pueden generarse a través de la exposición a radiación (Brieger et al., 2012). En las mitocondrias es donde se lleva a cabo la cadena de transporte de electrones, que transfiere electrones de la nicotinamida adenina fosfato dinucleótido en su forma reducida (NADPH^+) y del succinato a lo largo de una ruta redox controlada que termina en la reducción de cuatro electrones del oxígeno molecular O_2 a H_2O durante la síntesis respiratoria de ATP (Dickinson y Chang, 2011). Durante el proceso de respiración celular, el oxígeno (O_2) mitocondrial es reducido por la transferencia masiva de electrones individuales, esta transferencia no es totalmente eficiente y la fuga de electrones da como resultado la formación de O_2^- (anión superóxido) (Burton y Jauniaux, 2011). Se estima que alrededor de 2% es utilizado en la formación de ERO, principalmente a nivel del complejo I y del complejo III de la cadena respiratoria (Circu y Aw, 2010). En este mismo sentido, se puede generar O_2^- a través de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones dentro del retículo endoplásmico generándose un proceso oxidante, esto se realiza mediante la formación de enlaces disulfuro durante el plegamiento de las proteínas, y alrededor del 25% del O_2^- (anión

superóxido) es generado dentro del retículo endoplásmico (Burton y Jauniaux, 2011). Por otra parte, las NADPH⁺ oxidasas y las oxidasas duales representan otra fuente importante de EROS en forma de O²⁻ y H₂O₂ en membranas celulares, para fagocitar a patógenos durante la respuesta inmune (Dickinson y Chang, 2011). Existen otros mecanismos de generación de ERO en el organismo, entre los que se incluyen, los complejos enzimáticos del ciclo de Krebs, como la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α - KGDH), la enzima piruvato deshidrogenasa y la enzima intermembranal p66shc (gen que regula el nivel de especies reactivas de oxígeno) las cuales han sido implicadas como importantes fuentes mitocondriales de O₂⁻ y H₂O₂ (Circu y Aw, 2010). La generación intracelular de EROS per se es un proceso inevitable. Para contrarrestarlo, las mitocondrias y las células en general poseen numerosos sistemas de defensa antioxidantes (Andreyev et al., 2005). En este mismo sentido, en el presente trabajo de investigación nos centraremos en el daño oxidante producido a los ácidos grasos de las membranas (peroxidación lipídica) que se describe a continuación.

3.13 Especies reactivas de oxígeno

Un radical libre es una molécula química altamente reactiva con un electrón no apareado en su órbita más externa. Esta configuración electrónica lo hace sumamente inestable, generando energía que se libera a través de reacciones con moléculas adyacentes como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Rahman, 2007). Los radicales libres participan en reacciones en cadena en las que un solo evento de iniciación puede propagarse para dañar múltiples moléculas. En un sistema biológico, un radical libre implica que el oxígeno (O₂) se encuentra en su forma más reactiva denominándose EROS y se encuentran clasificadas en función de sus propiedades químicas, por ejemplo, moléculas neutras (H₂O₂), iones (radical O₂⁻) radical hidroxilo (OH⁻), peroxilo (RO₂) y alcoxilo (RO), (peróxidos de lípidos (ROOH) y debido a su alta reactividad tienen la capacidad de realizar transiciones de una especie a otra (Brieger et al., 2012). Cabe señalar, que los radicales OH cobran mayor importancia porque causan daño oxidante a las células por atacar de forma inespecífica a las biomoléculas; estas se forman mediante el ciclo redox por

la reacción de Fenton, donde el hierro libre (Fe^{2+}) reacciona con el H_2O_2 y la de Haber-Weiss que produce Fe^{2+} cuando el superóxido reacciona con el hierro férrico (Fe^{3+}). Además, otros metales de transición, incluidos el cobre, níquel, cobalto y vanadio, pueden ser responsables de la formación del radical $\text{OH}^\cdot$ en las células (Ayala et al., 2014). El exceso de generación de estas moléculas y el daño oxidante en los componentes celulares llamados estrés oxidante, que incluye, el daño macromolecular considerado en mecanismos oxidantes ligados a los radicales libres y la interrupción de los circuitos redox de tior, lo que lleva a una señalización celular aberrante y un control redox disfuncional (Jones, 2008). En concentraciones elevadas, las EROS reaccionan fácilmente con proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, a menudo induciendo alteraciones funcionales irreversibles o incluso destrucción completa (Brieger et al., 2012), por ejemplo: 1) la apertura de canales iónicos que conducen a la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, con la liberación de iones Ca^{2+} del retículo endoplásmico que incluyen el inositol-1,4,5 trifosfato (IP_3) y el receptor de rianodina (Burton y Jauniaux, 2011); 2) la peroxidación lipídica generada por los radicales $\text{OH}^\cdot$ al sufrir un daño oxidante en los ácidos grasos poliinsaturados (abundantes en las membranas celulares) en consecuencia de la generación de reacciones en cadena de radicales libres cuando se exponen al O_2 en presencia de iones metálicos (Jones, 2008); 3) modificaciones de proteínas, en donde el peroxinitrito reaccionará con los residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosina que participa en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Burton y Jauniaux, 2011) y 4) oxidación del ácido desoxirribonucleico (ADN), que es atacado principalmente por radicales $\text{OH}^\cdot$ formándose roturas de las cadenas que interfieren con el plegamiento de la cromatina, la reparación y la transcripción del ADN, lo que induce la generación de mutaciones o una expresión génica aberrante (Burton y Jauniaux, 2011). En contraste, a niveles homeostáticos, las ERO tienen diversas acciones sobre la función celular, incluida la activación de factores de transcripción sensibles a redox como AP-1, p53 y el factor nuclear kappa beta ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) que regulan la expresión de citocinas proinflamatorias, la diferenciación celular y la apoptosis y la activación de proteína quinasas que en condiciones normales promueven la supervivencia y proliferación celular (Burton y

Jauniaux, 2011). Los factores desencadenantes del estrés oxidante pueden ser diversos, desde defectos genéticos hereditarios o adquiridos (mutaciones) o factores ambientales (radiación o toxinas) hasta eventos relacionados con las fluctuaciones metabólicas (Andreyev et al., 2005).

3.14 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica altera la estructura de las membranas y provocan cambios en la permeabilidad celular, así como en el funcionamiento de las proteínas de la membrana, lo que conduce a la hiperexcitabilidad, en el cerebro y al posterior daño oxidante a las membranas neuronales que tiene puede tener efectos profundos en la recaptura y liberación de neurotransmisores, además de afectar el mantenimiento de los gradientes iónicos adecuados, provocando nuevamente la excitabilidad neuronal (Pearson-Smith et al., 2017).

La lipoperoxidación es un proceso bioquímico donde los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) que son abundantes en las membranas celulares del SNC, sufren oxidación debido a la acción de radicales libres, especialmente el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$). Este proceso es parte del fenómeno más amplio conocido como estrés oxidante y se compone de tres procesos: el inicial, la propagación y la terminación (Nam et al., 2011). Los mediadores de lípidos oxigenados y las EROS juegan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio homeostático en condiciones normales, sin embargo, la generación excesiva de radicales libres con el agotamiento de las reservas de antioxidantes da como resultado la peroxidación de lípidos, que tienen estrecha relación en la muerte celular, incluyendo apoptosis, autofagia y ferroptosis (Anthonymuthu et al., 2016), Estos mecanismos propician la propagación de reacciones en cadena en donde el oxígeno se combina con los lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono para generar hidroperóxidos lipídicos a través de la formación intermedia de radicales peroxilo, los cuales atacan a las membranas celulares debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados con átomos de hidrógeno bis-alílico lábiles, los cuales son altamente susceptibles a la peroxidación lipídica (Conrad et al., 2018). La peroxidación lipídica es un proceso en el que los radicales libres oxilo,

peróxido e hidroxilo eliminan a los electrones para generar productos intermedios con el subsecuente daño celular (Su et al., 2019) alterando el ensamblaje, la composición, la estructura y la dinámica de las membranas lipídicas, ADN y proteínas. Los peróxidos lipídicos se pueden dividir en dos clases generales: endoperóxidos lipídicos e hidroperóxidos lipídicos (Gaschler y Stockwell, 2017).

3.15 Defensas antioxidantes

El estrés oxidante ocurre cuando existe un desequilibrio entre la formación excesiva de EROS y la capacidad que tienen los sistemas biológicos para neutralizarlos o reparar el daño que estos ocasionan (Liguori et al., 2018). Por lo tanto, el estrés oxidante refleja una actividad reducida del sistema de defensas antioxidantes protectoras (Pisoschi, 2015).

Los antioxidantes endógenos, que son productos del metabolismo del cuerpo, pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Uno de los antioxidantes enzimáticos que desempeña un papel importante en la primera línea de defensa es la superóxido dismutasa (SOD). La SOD cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Otros antioxidantes enzimáticos importantes en la primera línea de defensa incluyen la catalasa (CAT), el glutatión peroxidasa (GPx), el glutatión reductasa (GR) y las peroxirredoxinas (Prxs). Estas enzimas neutralizan el peróxido de hidrógeno, produciendo agua (catalasa, glutatión peroxidasa) y molécula de oxígeno (catalasa). Las sustancias no enzimáticas que participan en la primera línea de defensa pertenecen a los antioxidantes preventivos y en el plasma sanguíneo están representadas por ceruloplasmina, ferritina, transferrina y albúmina. Estas proteínas inhiben la formación de nuevas especies reactivas al unirse a iones metálicos de transición (por ejemplo, hierro y cobre). Además, la metalotioneína juega un papel esencial en la prevención contra especies reactivas. Sus propiedades antioxidantes primarias se derivan de la presencia de un gran número de grupos tiol (SH) (Mirończuk- Chodakowska et al., 2018).

Los antioxidantes enzimáticos incluyen la participación de: 1) superóxido dismutasa (SOD), esta enzima convierte dos radicales superóxido en una molécula de oxígeno y peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular, así mismo, hay tres tipos

de SOD, incluyendo la dependiente de cobre (Cu-SOD) que está en el citosol, la dependiente de manganeso (Mn-SOD2) que está en la matriz mitocondrial y la dependiente de zinc extracelular (Zn-SOD3) (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018; Pisoschi y Pop, 2015); 2) catalasa (CAT), encargada de reducir el H_2O_2 en agua y se está en los peroxisomas de la mayoría de las células, órganos y tejidos en concentraciones elevadas; 3) glutatión peroxidasa (GSH-Px), es una enzima dependiente de selenio encargada de catalizar la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos en agua y a otros alcoholes correspondientes (Pisoschi y Pop, 2015); 4) peroxiredoxinas (Prxs), controlan el nivel de peróxidos inducidos por citocinas involucrados en la señalización celular; 5) el sistema tiorredoxina (Trx) y glutaredoxinas (Grx) son una familia de proteínas que restauran los enlaces disulfuro en otras proteínas oxidadas mediante el intercambio de disulfuro (Belinskaia et al., 2020).

Particularmente, en los pacientes que sufren de ELT, su sistema antioxidante como el glutatión y la SOD están alteradas, indicando la presencia de estrés oxidante en curso, inclusive se ha detectado daño oxidante en biomoléculas de tejido cerebral de pacientes y se sugiere que contribuye a la hiperexcitabilidad y degeneración neuronal (Pearson- Smith et al., 2017).

En la epilepsia, los mediadores clave de la muerte neuronal son la necrosis iniciada por excitotoxicidad del glutamato y la apoptosis. El estrés oxidante y las mitocondrias contribuyen tanto a la excitotoxicidad del glutamato como a la muerte celular por apoptosis. El papel del estrés oxidante en la muerte celular neuronal inducida por convulsiones está bien establecido. De hecho, se ha demostrado que el tratamiento con varios compuestos que actúan para disminuir el estrés oxidante (antioxidantes, inhibidores de la NADPH oxidasa, etc.) protege contra la muerte neuronal inducida por convulsiones. La muerte neuronal, particularmente en el hipocampo, es una característica común de la epilepsia adquirida y se piensa que contribuye a la disfunción cognitiva. Es importante destacar que la atenuación del daño oxidante en modelos de epilepsia adquirida parece proteger contra la disfunción cognitiva, así como conferir neuroprotección. Por lo tanto, el daño oxidante resulta de la actividad convulsiva en la epilepsia adquirida y parece

contribuir a la pérdida neuronal inducida por convulsiones y la disfunción cognitiva (Pearson-Smith et al., 2017).

3.16 Glutación

El glutatión, un tripéptido compuesto por L-glutamato, L-cisteína y glicina, se considera el compuesto tiol/sulfhidrilo no proteico intracelular más prevalente e importante en las células de mamíferos. La importancia del GSH es como eliminador de radicales libres, particularmente efectivo contra el radical $\text{OH}^\cdot$. Como se mencionó anteriormente, no existen defensas enzimáticas conocidas contra ~~es~~ especie de radical. La capacidad del GSH para eliminar de forma no enzimática tanto el oxígeno singlete (es un estado del oxígeno cuando ha ganado un e^- y es altamente reactivo para oxidar moléculas biológicas) como el radical $\text{OH}^\cdot$, proporciona una primera línea de defensa antioxidante (Bains et al., 1997). Adicionalmente, se trata del principal tiol no proteico en organismos aeróbicos, desempeñando un papel fundamental en diversos procesos celulares, ya sea como antioxidante directo o como sustrato en distintos mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante. Su función directa en las convulsiones epilépticas ha sido evidenciada tanto por la reducción de convulsiones inducidas por PTZ en ratones tras la administración de este compuesto, como por el incremento en la frecuencia de convulsiones debido a la disminución de los niveles de GSH en el cerebro. Esto se debe a que una reducción aguda del GSH cerebral resulta en un aumento de especies reactivas de oxígeno (EROS). Además, el GSH puede interactuar con sus propios receptores o influir en la neurotransmisión mediante reacciones con neurotransmisores y sus sitios de unión, como los receptores NMDA y GABAA (Patsoukis et al., 2004).

El glutatión se sintetiza y se degrada en la mayoría de las células mediante una serie de reacciones enzimáticas bien caracterizadas. Existe tanto en forma reducida (generalmente abreviada como GSH) como en forma de dímero oxidado (GSSG), siendo la primera, con mucho, la fracción más grande en una proporción aproximada de (98:2) GSH y GSSG son interconvertibles por la acción de dos enzimas, el glutatión peroxidasa (GSH-Px) y el glutatión reductasa (GSH-R). El GSH reducido

modula fuertemente el estado redox, la relación de equivalentes oxidantes a reductores de la célula, un papel que es crítico para la supervivencia celular. El GSSG se forma en reacciones antioxidantes que involucran GSH y puede acumularse con un aumento del procesamiento oxidante en la célula. La proporción de GSSG/GSH sirve como un índice sensible del estrés oxidante. El GSSG se reduce para regenerar GSH en una reacción catalizada por GSH-R y que requiere fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida (NADPH) como donante de hidrógeno. Además de estas acciones antioxidantes, el GSH está involucrado en una serie de otras tareas esenciales, incluyendo la síntesis y reparación del ADN, la síntesis de proteínas, el transporte de aminoácidos, la mejora de la función inmunológica y la activación enzimática. Los roles específicos del sistema nervioso parecen incluir acciones como modulador redox de algunas corrientes de receptores ionotrópicos y como un potencial neurotransmisor.

Se ha demostrado el papel directo del GSH en las convulsiones epilépticas, ya sea por la inhibición de convulsiones inducidas por PTZ en ratones después de la administración de este tiol, o por el aumento en la tasa de convulsiones inducidas por los niveles disminuidos de GSH en el cerebro. Esto se atribuye al hecho de que la disminución aguda de GSH cerebral genera niveles más altos de EROS. Además, el GSH puede unirse a su propia población de receptor(es) o puede influir en la neurotransmisión al reaccionar con neurotransmisores y sus sitios de unión (es decir, receptores NMDA y GABAA) (Patsoukis et al., 2004). La actividad de la enzima glutatión peroxidasa depende de la presencia de glutatión reducido (GSH) como donador de hidrógeno. Es considerado buffer de importancia redox de tioles en las células y se sintetiza en el citosol a partir de l-glutamato, l-cisteína y glicina. El GSH participa en un gran número de reacciones de desintoxicación, formando disulfuro de glutatión, que se convierte nuevamente en GSH gracias a la acción de la enzima glutatión reductasa, a expensas del NADPH. Este último se genera a través de la vía de las pentosas fosfato, cuya primera enzima es la glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa (Burton & Jauniaux, *et al.*, 2011).

3.17 Apoptosis

Este proceso se describe como un tipo de muerte celular programada, y es normal en el cerebro en desarrollo, ya que más del 50% de las neuronas originales deben someterse a la muerte celular programada o apoptosis. Las mitocondrias juegan un papel importante en la apoptosis bajo una variedad de condiciones proapoptóticas, así como el estrés oxidante, la liberación del citocromo-c mitocondrial es un evento clave en la activación de la caspasa-3 y un paso fundamental para iniciar la apoptosis, la neurodegeneración se manifiesta como una reducción de la masa cerebral y alteraciones neuroconductuales en muchos trastornos neurológicos, incluyendo la epilepsia y el síndrome de alcoholismo fetal (FAS). La muerte celular parece estar asociada con la activación de las caspasas-3, una proteasa ejecutora que se activa durante la muerte celular por apoptosis (Elmore et al., 2007).

El proceso de apoptosis suele ocurrir a través de la vía intrínseca y extrínseca de Ca^{2+} . La primera, se inicia cuando las mitocondrias están expuestas a una sobrecarga patológica de 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. En este sentido, la activación de la apoptosis depende de la activación inducida por $\text{TNF-}\alpha$ de la caspasa 8 y 3 (Ríos et al., 2015), y los genes que regulan la apoptosis: las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2.

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas específicas de aspartato. Hasta ahora, se han identificado catorce caspasas en mamíferos, que según los esquemas de clasificación comunes se dividen en caspasas inflamatorias/procesadoras de citocinas que incluyen 1, 5 y 11, y caspasas reguladoras de apoptosis que incluyen 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 (Thornberry y Lazebnik, 1998).

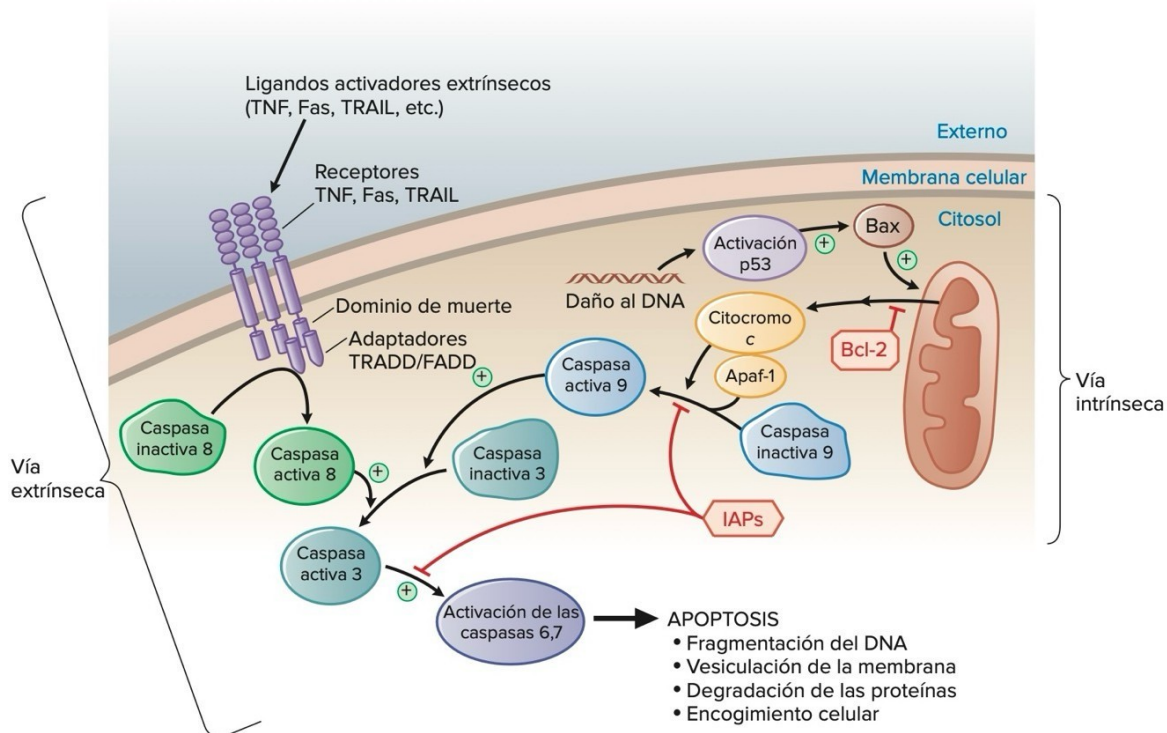


Figura 9: La imagen representa el proceso de las dos vías participantes de la apoptosis que se lleva a cabo en el citosol la vía extrínseca e intrínseca, en la primera se observan los ligandos que actúan como activadores (TNF, Fas, TRAIL, etc.), sus receptores se localizan en la membrana celular y se reconocen, después de la unión del ligando hay adaptadores como TRADD/FADD que se reclutan para transmitir la señal de apoptosis, aquí la caspasa 8 se activa, lo que lleva a la activación de la caspasa 3. Estas caspasas son proteasas que desencadenan la cascada de eventos que conducen a la apoptosis. Por su parte, en la vía intrínseca el daño al ADN puede activar la proteína p53, que es un regulador clave de la apoptosis, la activación de p53 induce la activación de Bax, una proteína pro- apoptótica que facilita la liberación de citocromo c desde la mitocondria, el citocromo c liberado se une a Apaf-1 y caspasa inactiva 9, formando el apoptosoma, que activa la caspasa 9 por último el gen Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica que inhibe la liberación de citocromo c, regulando negativamente la vía intrínseca de la apoptosis (Recuperado de Brunton et al., 2019).

La apoptosis neuronal y la neuroinflamación desempeñan un papel importante en la epileptogénesis, además del estrés oxidante y la pérdida de neuronas inhibitorias o excitatorias. La caspasa-3 es una caspasa efectora que activa la endonucleasa CAD (DNasa activada por caspasa), causando roturas del ADN en las regiones internucleosomales y conduciendo a la destrucción y muerte de las células. La

neuroinflamación, estrechamente asociada con la muerte celular, está regulada principalmente por citocinas. El sistema de citocinas puede modular la actividad funcional de las células inmunocompetentes y tener efectos citotóxicos y proapoptóticos. Las citocinas pueden migrar entre la sangre y el cerebro en ambas direcciones. Las citocinas activan monocitos/macrófagos, etc., y juntas contribuyen a la apoptosis (Sokolova et al., 2022). La vía intrínseca (mitocondrial) de la apoptosis se inicia por anomalías intracelulares, como daño al ADN, sobrecarga de calcio y estrés oxidante. Si estas anomalías son suficientes para inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, esto señala la liberación subsecuente de proteínas pro-apoptóticas (citocromo c, factor inductor de apoptosis, etc.) y la activación posterior de la muerte celular dependiente e independiente de caspasas (Brunton et al., 2019) (Siegel et al., 2006).

3.18 Fármacos anticrisis

En la clínica, El tratamiento con fármacos antiepilépticos, más recientemente denominados fármacos anticrisis (FAC), por su acción sobre la prevención de crisis epilépticas y no sobre la patogenia de la enfermedad, viene determinado por el riesgo de recurrencia de las mismas, aconsejándose cuando este supera el 60%, como es haber sufrido al menos 2 crisis epilépticas no provocadas o una primera crisis con presencia de actividad epileptiforme en un electroencefalograma (EEG) o de una lesión potencialmente epileptógena en una prueba de neuroimagen.

Los medicamentos para el tratamiento de la epilepsia se toman de forma crónica para prevenir la aparición de convulsiones, no hay profilaxis ni cura efectiva disponible. La adherencia a los regímenes de tratamiento prescritos es un problema importante, debido a la necesidad de terapias a largo plazo y a los efectos no deseados de muchos de los fármacos empleados (Brunton et al., 2019).

1. **Fármacos anticrisis: Modulación de los canales iónicos dependientes del voltaje:** El primero implica la regulación de los canales catiónicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), lo que puede abarcar la extensión del período inactivo de los canales de Na^+ dependientes del voltaje, la potenciación

de los canales de K^+ y la inhibición de los canales de Ca^{2+} , como la carbamazepina, fenitoína, lamotrigina, oxcarbamazepina, lacosamida y topiramato.

2. **FAC Modulación de la liberación de neurotransmisores:** Pregabalina (PGB) y gabapentina (GBP) actúan sobre los canales de Ca^{2+} tipo P/Q. Al evitar la entrada de Ca^{2+} en la terminación presinápticas, la cual también se puede modular a través de la unión a sub-unidades específicas (SV2A), como es el caso de levetiracetam (LEV) y brivaracetam (BRV).
3. **A nivel sináptico:** En la mejora de la neurotransmisión del GABA, actuando sobre los receptores $GABA_A$, modulando el metabolismo del GABA y bloqueando su recaptación en la terminal sináptica como son las benzodiazepinas (diazepam, clonazepam), o barbituratos (Fenobarbital y vigabatrina) (Rogawski et al., 2016).
4. El cuarto mecanismo consiste en la reducción de la excitación sináptica mediada por los receptores ionotrópicos del glutamato, como los receptores AMPA (Porter et al., 2012). (valproato, felbamato, topiramato, zonisamida)

4.1 Cannabidiol

El *cannabis* es considerada una de las plantas más antiguas cultivadas para uso humano. Evidencia arqueológica sugiere que se cultivaba como fibra y cuerda desde el 12,000 a.C, para hacer tela de cáñamo u otras presentaciones de cáñamo en muchas partes de China. En las farmacopeas chinas se ha descrito que el *cannabis* se empleaba como tratamiento para diversas enfermedades desde el siglo II a.C., y se atribuyen al Emperador Shen Nung, quien vivió alrededor del 2700 a.C. y es reconocido como el padre de la medicina china por su exploración sistemática de remedios herbales (Friedman et al., 2017). Los papiros egipcios también describen el uso de una planta medicinal (muy probable, el cannabis) para diversas molestias como las convulsiones nocturnas, infecciones, analgesia y contracciones vaginales aproximadamente en 1800 a.C. En el año 1500 a.C hay textos de la India que mencionan efectos ansiolíticos y para los siglos I y II d.C donde África incorporó

el *cannabis* en su arsenal terapéutico. En la era victoriana, el físico William O'Shaughnessy viajó a la India y estudió la medicina tradicional, al regresar a Europa promovió el uso terapéutico del Cannabis en forma de tintura, y publicó sus propios casos de estudios en desórdenes de perros con reumatismo, tétanos, cólera y convulsiones infantiles (Friedman et al., 2017).

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoides presente en la planta de *cannabis sativa* y se ha señalado como un fármaco destacado para el tratamiento de ciertos síndromes epilépticos (Lennox–Gastaut syndrome (LGS), Dravet syndrome (DS), and more recently tuberous sclerosis complex (TSC) (Borowicz et al., 2024) especialmente en humanos con epilepsias farmacorresistentes, la evidencia de que el CBD tiene actividad terapéutica se deriva en gran medida de estudios preclínicos celulares (como en neuroprotección, y en roedores (Britch et al., 2021).

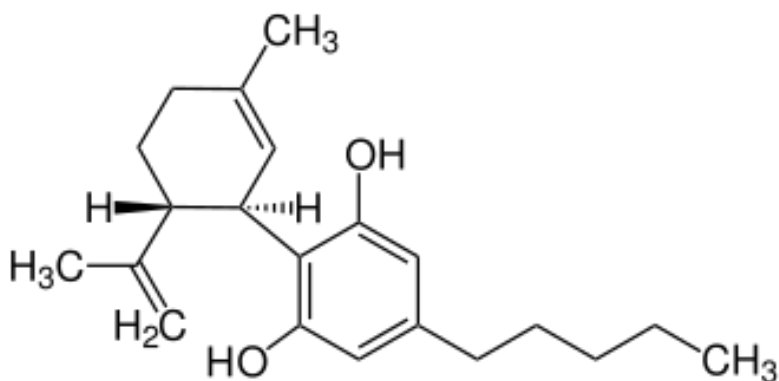


Figura 10: Estructura química del cannabidiol, nombre IUPAC : 2-[(1R,6R)-3-metil-6-propil-1-ciclohexen-1-il]-5-pentilbenceno-1,3-diol Imagen tomada de wikipedia.

El CBD es un terpenofenol altamente lipofílico con amplios efectos farmacológicos sin consecuencias psicoactivas, se clasifica como compuesto de Clase II en el sistema de clasificación biofarmacéutica debido a su alta permeabilidad, baja solubilidad en agua y a que se elimina ampliamente a través del metabolismo, sin embargo, el amplio metabolismo de primer paso y la absorción variable restringen la biodisponibilidad del CBD a aproximadamente un 6 % cuando se administra por vía oral. Debido a su naturaleza lipofílica, se acumula en tejidos grasos y penetra

en tejidos altamente vascularizados, lo que influye en su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Su administración puede ser oral, intravenosa, transdérmica o por inhalación, y más del 95% se une a proteínas. El CBD tiene una vida media larga y se metaboliza rápidamente en el hígado, excretándose principalmente por las heces. Por lo tanto, se han investigado vías de administración alternativas con sistemas de administración de fármacos adecuados o preparaciones para la administración de CBD (Tabboon et al., 2022). Cabe mencionar que el CBD sufre metabolismo hepático conjugativo y oxidante por medio de enzimas específicas del citocromo P450, como CYP3A4, CYP2C19, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A5 dando pie a considerar las posibles interacciones con otros fármacos y las enzimas que participan para evitar modificación en su biodisponibilidad, y aunque se ha indicado que tiene baja toxicidad, de acuerdo con Devinsky et al., (2018) reporta que hay niveles crecientes de enzimas hepáticas como la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato transferasa (AST) sugiriendo daño hepático. Por otro lado, los efectos adversos generados por el uso prolongado de CBD incluyen dolor de cabeza, disminución del apetito, diarrea, salpullido, fatiga y trastornos del sueño (Zavala-Tecuapetla et al., 2022).

La importancia del uso de CBD radica en la capacidad de interactuar con una gran variedad de blancos moleculares como enzimas, transportadores, receptores, canales iónicos entre otros, interactuando en diversos mecanismos y vías de señalización otorgándole los efectos terapéuticos que éste posee como antiinflamatorios, inmunomodulador, neuroprotector (al disminuir la excitabilidad neuronal y evitar la muerte celular en hipocampo de rata en modelos de epilepsia de lóbulo temporal), antioxidante, anticonvulsivo y antiapoptótico como se mencionó anteriormente.

El CBD posee la capacidad de interactuar en diversos blancos moleculares como, receptores cannabinoides, receptores de adenosina, serotoninérgicos, dopaminérgicos, receptores acoplados a proteína G, receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), receptores GABA, receptores a opioides, canales del Receptor Transitorio Potencial Vanilloide (TRPV) y canales iónicos. Es

importante destacar que a partir de las interacciones del CBD y el efecto inhibitor resultante sobre la actividad celular, se podría explicar la eficacia del CBD como fármaco para controlar las convulsiones.

Se ha reportado que el CBD no promueve una activación directa de los receptores de cannabinoides 1 (RCBD1), más bien es indirectamente, mediante la inhibición de la recaptación de anandamida y su degradación por la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), lo que provoca un aumento en el tono cannabinoide endógeno, y este efecto podría suprimir la hiperactividad neuronal protegiéndose de convulsiones y prevenir las alteraciones del receptor CB1 en las estructuras cerebrales líbicas, lo que favorece la actividad neuronal normal.

Respecto a los receptores de dopamina, el CBD actúa como un agonista parcial del receptor D2, y posiblemente sus efectos anticonvulsivos se deban en parte a sus acciones sobre el sistema dopaminérgico, ya que las alteraciones en este sistema se han vinculado con la epilepsia. Por otro lado, el receptor GPR55, que regula la liberación de glutamato a través de un mecanismo dependiente del Ca^{2+} que modula la excitabilidad neuronal, puede reducir la liberación de glutamato y ejercer efectos anticonvulsivos a ser antagonizado por el cannabidiol. Además, las anomalías en la transmisión GABAérgica están asociadas con el desarrollo de la epilepsia. Se ha descrito que el CBD actúa como un modulador alostérico positivo de los receptores GABAA, lo que podría mejorar la transmisión inhibitoria GABAérgica y explicar algunos de sus efectos anticonvulsivos.

Respecto a los canales TRPV1, su activación aumenta la excitabilidad neuronal y facilita las convulsiones, a pesar de ello, induce una rápida desensibilización que podría reducir indirectamente la excitabilidad neuronal y explicar sus efectos anticonvulsivos. El CBD inhibe los canales de calcio tipo T y los canales de Na^+ dependientes de voltaje que regulan la excitabilidad celular y están implicados en la epilepsia, lo que podría mediar sus efectos anticonvulsivos. Además, se ha demostrado que el CBD mejora la corriente M neuronal, una corriente de K^+ cuya activación podría contribuir a su eficacia anticonvulsiva.

Se propone que el CBD muestra una modulación positiva y efectos agonistas en el receptor de ácido γ -aminobutírico tipo A (GABAA), lo que conduce a una activación

de la movilización de GABA en las sinapsis inhibitorias. El CBD activa y desensibiliza el receptor potencial transitorio vaniloide tipo 1 y 2 (TRPV1/2), reduciendo la entrada de Ca^{2+} extracelular y disminuyendo la concentración de Ca^{2+} (Senn et al., 2019). Inclusive, se ha reportado que el CBD desempeña potente actividad antioxidante, modulando la expresión del óxido nítrico sintasa y la nitrotirosina, así como reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Silvestro, 2019). Su efecto anticonvulsivo se ha estudiado en modelos agudos de convulsiones audiogénicas, sin embargo, el CBD muestra una baja afinidad para los receptores endocannabinoides CB1 y CB2, llevando a cabo sus mecanismos de acción interactuando con otros blancos moleculares. Uno de los objetivos de canal iónico más importantes hacia los que el CBD muestra una alta afinidad es el Vanilloide potencial del receptor transitorio (TRPV). En concreto, TRPV1 es un canal no selectivo que muestra una alta permeabilidad al Ca^{2+} y está implicado en la modulación de las convulsiones y en la epilepsia. De hecho, cuando está activo, promueve la liberación de glutamato y el aumento de Ca^{2+} con la consiguiente excitabilidad neuronal (Britch et al., 2021). Sin embargo, los efectos del CBD en otros tipos de epilepsia resistente a los medicamentos no son concluyentes debido a la presencia de sujetos que no responden al tratamiento.

EL CBD tiene baja afinidad a los receptores CB1 y CB2 induciendo antagonismo, actúa como agonista parcial en receptores D2 y 5HT1A, como agonista de los canales TRPV1 y activador de los canales TRPV2, modulador alostérico para los receptores opioides μ - y κ -. También induce el bloqueo en estado de reposo de los canales de Na^+ y bloquea la subunidad Kv2.1 de los canales de K^+ activados por voltaje, y también produce neuroprotección por la activación de los receptores CB2 y adenosina A2, de acuerdo a lo reportado por Rocha et al 2019 (Rocha et al., 2019).

El CBD podría desempeñar un papel importante en la neurotransmisión glutamatérgica, aunque los resultados son variados. Se ha demostrado que tiene efectos antidepresivos al aumentar la neurotransmisión de serotonina y glutamato, reduce la actividad excesiva de los receptores NMDA antagonizando los receptores sigma 1, disminuye la liberación de glutamato y protege contra convulsiones

inducidas por cocaína. Estos efectos son significativos porque niveles elevados de glutamato están relacionados con convulsiones recurrentes y epilepsia crónica, y el bloqueo de los receptores NMDA puede prevenir o revertir algunas condiciones neurológicas, además, el CBD también actúa mediante receptores acoplados a la proteína G que integran el sistema endocannabinoide, conocidos como CB1 (predominantemente en las neuronas del sistema nervioso central y periférico) y CB2 (principalmente en las células del sistema inmunitario). Los receptores CB1 reducen la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores al modular la apertura de canales de potasio y bloquear los canales de calcio, y a diferencia del THC, el CBD muestra una afinidad muy baja por los receptores CB1 y CB2, lo que justifica su escasa actividad psicotrópica. Por ello, se plantea que el mecanismo antiepiléptico del CBD opera de manera independiente al sistema endocannabinoide (Espinosa, 2020).

4.2 Receptores Cannabinoides

Los receptores CB1 y CB2, activan proteínas Gi/o, conduciendo a la hiperpolarización de la membrana y a una disminución en la liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas. Aunque el CBD muestra una baja afinidad por ambos receptores CB1 y CB2, actúa como un modulador alostérico negativo no competitivo de los receptores CB1, mientras que con los receptores CB2, el CBD actúa como un agonista inverso, pero solo a concentraciones altas, Además, se ha informado que el CBD inhibe la recaptación de anandamida y su degradación por la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), lo que aumenta el tono cannabinoide endógeno; de esta manera, el CBD activa indirectamente los receptores CB1 (Zavala-Tecuapetla et al., 2022)

Se sabe que los receptores cannabinoides están ampliamente distribuidos en todo el cuerpo, y consisten en subtipos de receptores, la mayoría de los cuales están acoplados a proteínas G, siendo CB1R y CB2R los más estudiados. También hay una gran variedad de endocannabinoides que pueden considerarse como mensajeros retrógrados, ya que son sintetizados y liberados desde las terminales

postsinápticas para completar su función en las terminales presinápticas, como se describió anteriormente.

El CBD tiene una baja afinidad por los sitios ortostéricos (el sitio del receptor donde interacciona la sustancia endógena, la mayoría de fármacos actúa aquí) de los receptores cannabinoides (CBDR). Diversos mecanismos han sido propuestos para lograr explicar su efecto anticonvulsivo y aunque aún se desconoce, éste comparte blancos moleculares con algunos fármacos antiepilépticos (FAE) como la etosuximida y la zonisamida disponibles en la actualidad al bloquear el flujo Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo T (Ross et al. 2008). Actualmente, el cannabidiol “Epidiolex” ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y por la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) para el tratamiento de síndromes epilépticos como Dravet y Lennox-Gastaut y para la esclerosis tuberosa compleja. Diferentes estudios clínicos han sido realizados para evaluar su seguridad, tolerabilidad y eficacia en humanos, principalmente en pacientes con epilepsia severa y resistente o los síndromes mencionados. Patel et al., ha reportado que con la administración de CBD en pacientes con epilepsia farmacorresistente por diferentes etiologías el control de las convulsiones no pierde su eficacia en un periodo de tratamiento de 60 meses. Por otro lado, el tratamiento con CBD ha sido bien tolerado en diferentes poblaciones incluyendo niños, adolescentes y adultos jóvenes, con eventos adversos en su mayoría leves o moderados en severidad, durante el tratamiento de convulsiones resistentes a fármacos asociadas con estas formas graves de epilepsia (Chesney et al, 2020).

4.3 Dapsona

La dapsona (4,4'-diamino-difenilsulfona) fue sintetizada por primera vez en 1908 por Eric Fromm y J. Wittmann, químicos de la Universidad de Freiburg (Barr, 2010) su estructura química consiste en un átomo de azufre unido a dos átomos de carbono, es clasificada como un antibiótico y sulfona con espectro antimicrobiano similar a las sulfonamidas, para tratar enfermedades infecciosas debido a bacterias, levaduras y parásitos (Díaz- Ruiz et al., 2022). En la década de 1940, se utilizó como quimioterapia para el tratamiento de infecciones por *Mycobacterium leprae* y

Pneumocystis carinii ya que es un antagonista competitivo del PABA (ácido paraaminobenzoico) por lo que evita que las bacterias lo utilicen en la síntesis de ácido fólico y en el tratamiento de diversas enfermedades de la piel, aprovechando sus acciones antiinflamatorias (Leoung et al., 1986), pues se ha demostrado que es capaz de antagonizar los efectos neurotóxicos de los ácidos kaínico y quinolínico, ambos agonistas de los receptores de aminoácidos excitadores (Santamaría et al., 1997). Entre los diversos estudios realizados por investigadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en nuestro país, descubrieron que la DDS tiene efectos neuroprotectores en un modelo de isquemia aguda en ratas, lo que conduce a una mejor recuperación funcional y preservación del tejido nervioso en los animales tratados con dapsona 30 minutos después de establecer isquemia mediante la oclusión de su arteria cerebral media (Rios et al., 2004) (Díaz-Ruiz et al., 2008).

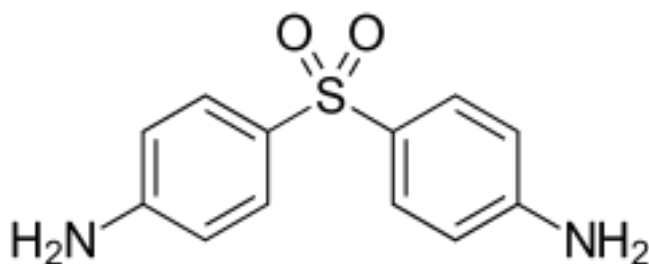


Figura 11: Estructura química de la Dapsona, nombre IUPAC : 4-(4-aminofenil)sulfonilánilina Imagen tomada de wikipedia.

Actualmente, la dapsona es uno de los fármacos componentes del régimen para la lepra, también utilizado en la profilaxis de la malaria, desórdenes dermatológicos, artritis reumatoide y en medicina veterinaria (Tristán-López et al., 2003). A principios de los años noventa Hamada y cols., así como Altagracia y cols. descubrieron que la DDS tenía efecto anticonvulsivo en modelo experimental de epilepsia provocada por ácido kaínico en gatos y ratas Wistar respectivamente, reduciendo en un 82% las convulsiones evaluadas a una dosis de 12.5mg/kg y un 52% a una dosis de 9.375mg/kg, generando diversas hipótesis de su acción como antagonista de los efectos neurodegenerativos inducidos por NMDA, identificándose como una

molécula interesante para lograr neuroprotección al inhibir excitotoxicidad mediada por glutamato, así como la respuesta inflamatoria después de un estímulo isquémico en el cerebro. Las propiedades neuroprotectoras de la DDS se han mostrado en un estudio experimental de oclusión aguda y permanente de la arteria cerebral media (ACM) en ratas, sin embargo, su mecanismo aún se desconoce (Ríos et al., 2019). Por otra parte, se sabe que la dapsona puede regular a la baja la interleucina 8 (IL-8), que juega un papel principal en inflamación mediada por neutrófilos, regulando las funciones de los linfocitos y monocitos. Además, se ha encontrado que causa un efecto dependiente de la dosis al inhibir la formación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la generación de productos leucotrienos en leucocitos polimorfonucleares (Ghaoui et al., 2020).

La biodisponibilidad del fármaco es de aproximadamente 70-80%, y alcanza la concentración máxima de 2-6 horas después de una dosis de 100 mg. En contraste, el tiempo de vida media depende de la dosis y, en adultos, varía de 20 a 30 horas, sin embargo, puede durar hasta 80 horas en condiciones de sobredosis (Barclay et al., 2011). Su farmacocinética indica que a concentraciones serológicas ha logrado entre 2 a 8 horas después de su administración y que su eliminación toma de 10 a 50 horas (Ahmad et al., 1980 ; Pieters et al., 1986). Una vez absorbida, se distribuye en el organismo, su vida media de eliminación es de 10 a 50 h. Contraindicada en caso de hipersensibilidad a dapsona (o sulfonamidas), debe emplearse con precaución en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, anemia preexistente, la DDS pasa por la circulación enterohepática y es metabolizada en el hígado, la inactivación metabólica es llevada a cabo por el CYP 450 en los hepatocitos, sin embargo, las células polimorfonucleares y monocitos también pueden contribuir al metabolismo. En los hepatocitos el metabolismo puede ocurrir por dos vías, la primera por la N-acetilación (por la N- acetiltransferasa) o bien en la segunda por la N- hidroxilación (por isoformas de CYP-450 como 2E1 y CYP2C). La primera genera la mono y la di-acetildapsona y la hidroxilación produce la N-hidroxilamina de la dapsona, la dapsona se distribuye por todos los órganos y es excretada por la orina y las heces (Díaz Ruíz et al., 2022).

Entre otras propiedades reportadas se encuentran sus efectos antiinflamatorios lo que lleva a la inhibición de la formación de EROs, así como la inhibición de la mieloperoxidasa (MPO) que es la enzima responsable de producir ácido hipocloroso (HClO), un compuesto altamente reactivo y citotóxico, disminuyendo la peroxidación lipídica generada por el agonismo en el receptor NMDA (Rodríguez et al., 1999; Santamaría et al., 1997), y la muerte neuronal en un modelo de excitotoxicidad inducida por glutamato (Mahale et al., 2020) y aumentando su efecto neuroprotector cuando se administra para el tratamiento de la isquemia (Díaz-Ruiz et al., 2016; Mahale et al., 2020), epilepsia (Hamada et al., 1991; Ishida et al., 1992; Ríos et al., 2019) y lesión traumática de médula espinal (LTME) (Díaz-Ruiz et al., 2011; Díaz-Ruiz 2015).

Los efectos adversos reportados ocurren dentro del 0.5-3.6% en el control de infecciones, siendo la más común y preocupante la metahemoglobinemia, donde la metahemoglobina posee una alta afinidad por el hierro molecular, desencadenando hipoxia. Otros efectos adversos relevantes tienen lugar en el sistema gastrointestinal (náuseas, dolor abdominal), así como en la piel (erupción cutánea). Entre otros efectos secundarios de menor importancia, encontramos, la aparición de tinnitus, vértigo, visión borrosa, dolor de cabeza e insomnio (Wolf et al., 2002) (Ghaoui et al., 2020), sin embargo, la metahemoglobinemia se presenta de una manera reversible y es tratable con azul de metileno (violeta de anilina, cloruro de metiltionina, 1-2 mg / kg de Solución al 1 %, I.V.) que actúa *in vivo* mediante la conversión de metahemoglobina a oxihemoglobina (Barclay et al., 2011).

Tanto el CBD como la DDS son fármacos que han demostrado regular los mecanismos que llevan a la generación de crisis convulsivas por diferentes vías, pero además inciden sobre eventos de daño que se observan como resultado de la hiperexcitabilidad neuronal. Como se mencionó, el hipocampo es la región más vulnerable al daño y es por esta razón que la evaluación del efecto del tratamiento combinado en dicho tejido, es motivo de estudio.

Es importante destacar que el CBD y la DDS tienen mecanismos neuroprotectores distintos, por lo que una terapia combinada, podría tener mejores efectos terapéuticos. Con base en lo anterior, en este trabajo evaluamos el efecto

anticonvulsivo y neuroprotector de la terapia combinada de CBD y DDS en un modelo de convulsiones inducidas por PTZ en ratas.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento farmacológico para el control de las crisis convulsivas que se observan en pacientes con epilepsia es un gran desafío. A pesar de que existen diversos tratamientos, algunos presentan efectos adversos y a pesar de su uso no han demostrado ser efectivos en una amplia cantidad de pacientes que son fármaco-resistentes. Además, la mayoría de los tratamientos son anticonvulsivos, pero no neuroprotectores, por lo que los procesos de daño siguen alterando la función nerviosa llevando a la neurodegeneración, teniendo como consecuencia deterioro cognitivo grave. Es por ello, que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas farmacológicas que sean eficaces para el control de las crisis convulsivas, y lograr disminuir el daño causado por la hiperexcitabilidad, como son: el estrés oxidante y la degeneración neuronal, además de tener la menor cantidad de efectos adversos, logrando la disminución y duración de las convulsiones, y que a su vez brinden neuroprotección contra el daño que cada episodio provoca. Tomando en consideración las propiedades farmacológicas del CBD y la DDS el presente proyecto propone la evaluación de dichas moléculas solas o en combinación, de sus propiedades anticonvulsivas, así como neuroprotectoras y antioxidantes en un modelo de crisis convulsivas provocadas con pentilentetrazol (PTZ) en rata, evaluando su potencial como una alternativa viable para el tratamiento farmacológico de las convulsiones.

6. HIPÓTESIS

Si el CBD tiene efectos agonistas en el receptor de ácido g-aminobutírico A (receptor GABA_A), va a activar las sinapsis inhibitorias y por lo tanto las crisis convulsivas van a disminuir, y por medio de los ensayos histológicos se demostrará sinergismo por las propiedades neuroprotectoras y antioxidantes que ambos poseen, dado que la

dapsona es un antagonista de los receptores NMDA favorecerá la inhibición de las convulsiones.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluación del efecto anticonvulsivo de cannabidiol solo o en combinación con dapsona en un modelo de epilepsia.

7.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar con la escala de Racine la intensidad de las crisis convulsivas inducidas con pentilentetrazol (PTZ) en ratas.
- II. Evaluar el efecto neuroprotector de la administración de cannabidiol en combinación con dapsona en un modelo de epilepsia en rata.
- III. Evaluar marcadores de muerte celular por apoptosis con caspasas y tinción de fluoro-jade en un modelo de epilepsia en rata.
- IV. Evaluar el efecto antioxidante de cannabidiol y dapsona a través de la cantidad de productos finales de la lipoperoxidación presente en el tejido dañado de un modelo de epilepsia en rata.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Animales

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las especificaciones técnicas de la Norma Oficial Mexicana NOM 0062-ZOO-1999 y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma Metropolitana (Número de Registro: 262), siguiendo los lineamientos institucionales y las especificaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (EE. UU.). Para la realización de este proyecto, se utilizaron ratas Wistar macho de 300 ± 50 g de peso corporal, alojadas en condiciones de bioterio con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y con

libre acceso a alimento y agua, los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

8.2 Fármacos

El pentilentetrazol (PTZ) adquirido de Sigma- Aldrich (St. Louis, MO), se diluyó en solución salina al 0.9% para su administración a dosis de 10 a 90 mg/Kg. El tratamiento de dapsona (DDS) se preparó para su administración a dosis de 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 disuelto en vehículo (15% de etanol, 40% de propilenglicol y 0,9% de solución salina al 0.9% NaCl), el cannabidiol (CBD) fue adquirido de STI Pharmaceuticals (Essex, UK) (CBD) y para el tratamiento de CBD se prepararon soluciones para su administración de 2.5, 5, 10, 20 y 40 a un volumen de 2mL por Kg, en el mismo vehículo, y el kit colorimétrico de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 fue adquirido de Merck Millipore (Burlington, MA, USA).

8.3 Diseño experimental

Para el diseño del presente proyecto de investigación los grupos de estudio se distribuyeron como se muestra en la tabla 3

Tabla 3. Distribución del diseño experimental (PTZ: Pentilentetrazol, DDS: Dapsona, CBD: Cannabidiol, LPO: Peroxidación de lípidos, GSH: Glutación reducido)

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	N° de animales	Pruebas	Notas
0	Sham	N/A	10	Evaluación conductual e histología	Histología: Técnica de Fluoro-jade b y Tinción de Nissl
I	PTZ/ VEH	Vehículo	10	Evaluación conductual, isoblograma e histología	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
II	PTZ/ DDS	40mg/kg + 1.562 mg/kg	4	Evaluación conductual, análisis isoblográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
III	PTZ/ DDS	40mg/kg + 3.125 mg/kg	4	Evaluación conductual, análisis isoblográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
IV	PTZ/ DDS	40mg/kg + 6.25 mg/kg	4	Evaluación conductual, análisis	Pruebas bioquímicas:

				isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
V	PTZ/ DDS	40mg/kg + 12.5 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
VI	PTZ/ DDS	40mg/kg + 25 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
VII	PTZ/ DDS	40 mg/kg + 50 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
VIII	PTZ/ CBD	40 mg/ kg + 1.25 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
IX	PTZ/ CBD	40 mg/ kg + 2.5 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
X	PTZ/ CBD	40 mg/ kg + 5 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
XI	PTZ/ CBD	40 mg/ kg + 10 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
XII	PTZ/ CBD	40 mg/ kg + 20 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
XIII	PTZ/ CBD	40 mg/ kg + 40 mg/kg	5	Evaluación conductual, análisis isobolográfico, y pruebas bioquímicas.	Pruebas bioquímicas: Peroxidación de lípidos y Glutación reducido
XIV	PTZ/ DDS + CBD	40mg/kg / 1.33 mg/kg+ 0.63 mg/kg	10	Evaluación conductual e histología	Histología: Técnica de Fluoro-jade b y Tinción de Nissl
XV	PTZ/ DDS + CBD	40mg/kg / 2.37 mg/kg+ 1.12 mg/kg	10	Evaluación conductual e histología	Histología: Técnica de Fluoro-jade b y Tinción de Nissl

XVI	PTZ/ DDS + CBD	40mg/kg / 4.22 mg/kg+ 2 mg/kg	10	Evaluación conductual e histología	Histología: Técnica de Fluoro-jade b y Tinción de Nissl
XVII	PTZ/ DDS + CBD	40mg/kg / 7.5 mg/kg + 3.56 mg/kg	10	Evaluación conductual e histología	Histología: Técnica de Fluoro-jade b y Tinción de Nissl
XVII	PTZ/ DDS + CBD	40mg/kg / 13.64 mg/kg + 6.32 mg/kg	10	Evaluación conductual e histología	Histología: Técnica de Fluoro-jade b y Tinción de Nissl

8.4 Establecimiento de modelo de inducción de convulsiones

De acuerdo con Javela (2011), a las ratas Wistar se les administró por vía intraperitoneal (i.p.) una dosis única de tratamiento (dependiendo del grupo: DDS, CBD o la combinación). Treinta minutos después, se inició el kindling químico mediante la administración intraperitoneal de 40 mg/kg de PTZ. En los siguientes 10 minutos, la rata debía presentar la fase V de la escala de Racine (crisis generalizadas); de no ocurrir, se administraba una nueva dosis de 20 mg/kg de PTZ y se esperaba nuevamente 10 minutos. Si aún no se lograba, se aplicaba una dosis adicional de 10 mg/kg. En caso de no observar crisis, se repetía la aplicación de PTZ (10 mg/kg) hasta alcanzar un máximo acumulado de 90 mg/kg. En la figura siguiente se muestra un diagrama de decisiones que representa el procedimiento para establecer el modelo de kindling químico con PTZ (ver figura 12).

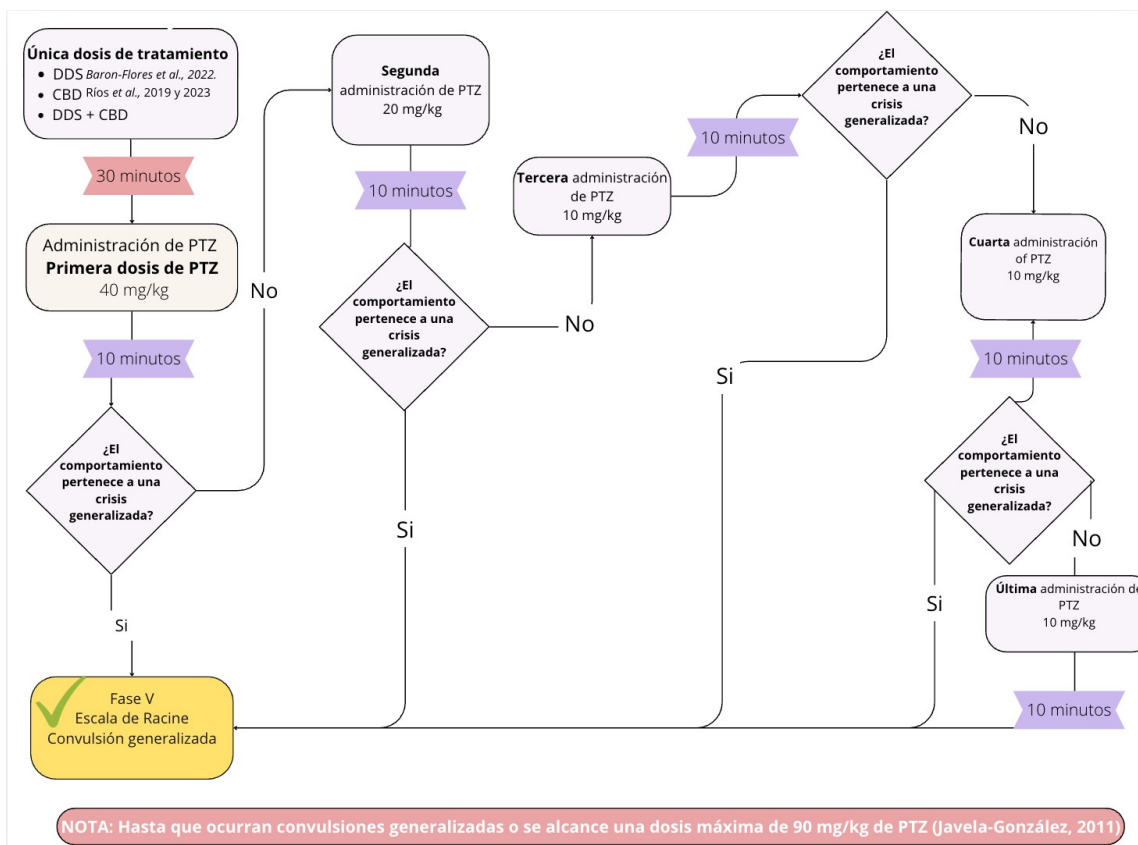


Figura 12: Esquema ilustrativo del establecimiento del modelo de inducción de crisis convulsivas con pentilentetrazol.

8.5 Estandarización conductual del modelo de inducción de convulsiones con PTZ.

Una vez que cada una de las ratas Wistar había logrado el comportamiento de las crisis convulsivas tónico-clónica generalizadas fase V de de la escala de Racine (Van Erum et al., 2019 se consideraron los siguientes parámetros:

Latencia: Tiempo en minutos a partir de la primera administración de PTZ hasta el establecimiento de la crisis convulsiva tónico-clónica generalizada.

Duración: Tiempo en minutos de inicio de la crisis tónico-clónica convulsiva generalizada (ictogénesis) hasta que entrara en periodo posictal.

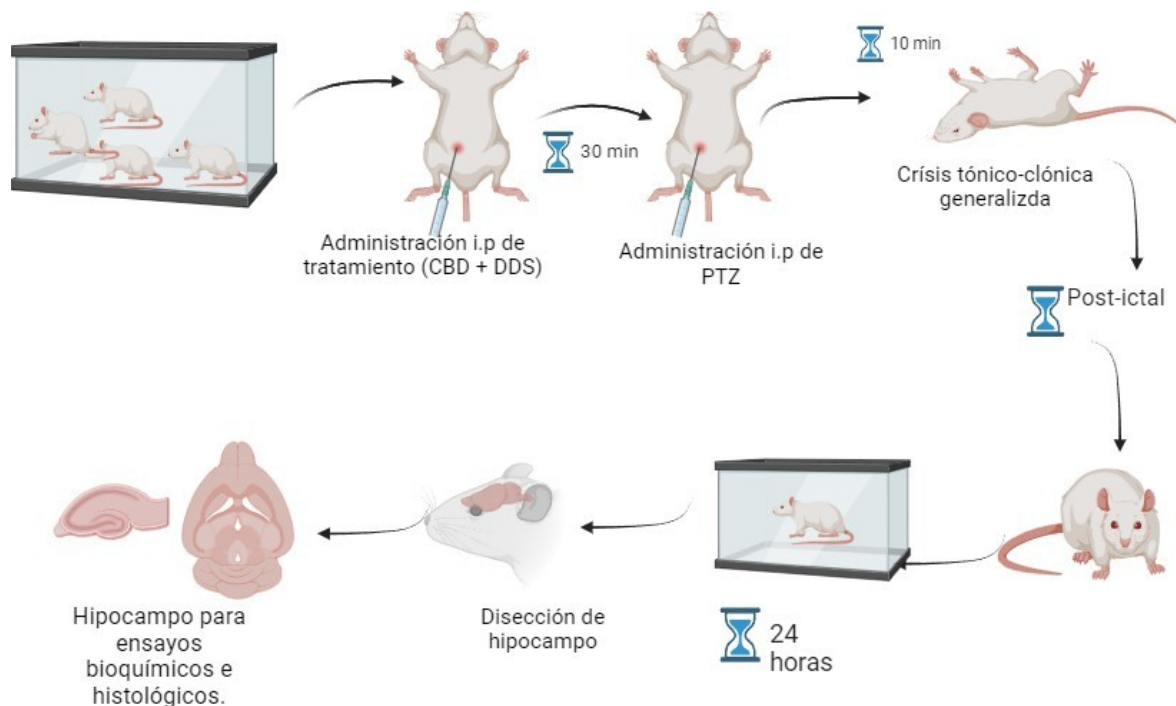


Figura 13: Ilustración de la estandarización del modelo de crisis convulsivas inducidas bajo la administración intraperitoneal de PTZ hasta la toma de muestra para análisis de muestras.

8.6 Análisis isoblográfico

Este análisis se realizó para conocer las interacciones farmacológicas entre DDS y CBD, siguiendo la metodología descrita por Tallarida (2011). El isoblograma fue realizado en Microsoft Office Excel versión 2021, iniciando con la determinación a partir de la curva dosis-respuesta de cada fármaco (DDS o CBD) la dosis que resulta en el 50% del efecto DE50.

8.7 Ensayo de peroxidación lipídica en un modelo de crisis convulsivas con PTZ.

Para este estudio, se obtuvieron muestras de hipocampo de las ratas previamente sacrificadas 24 horas después de que se establecieron las crisis convulsivas tónico-clónicas generalizadas por medio de decapitación. Las muestras se congelaron en

nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso para medir la peroxidación lipídica, según la técnica descrita por Triggs y Willmore (Triggs y Willmore, 1984) y modificada por Diaz-Ruiz et al. (Diaz-Ruiz et al., 1999) (ver figura 14).

Cada muestra de hipocampo se homogeneizó en 3 ml de solución salina (NaCl al 0,9%). Se añadieron alícuotas de un mililitro del homogeneizado a 4 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2: 1, v / v). Luego, la mezcla se agitó seguido de un intervalo de enfriamiento con hielo de 30 min para permitir la separación de fases. La fluorescencia de la capa de cloroformo se midió en un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin- Elmer LS50B a 370 nm (excitación) y 430 nm (emisión). Se utilizó una solución estándar de quinina (0,1 g / ml) para ajustar la sensibilidad del espectrofotómetro a 150 unidades de fluorescencia. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia / g de tejido. La significancia estadística de las diferencias de la peroxidación lipídica entre grupos se determinó mediante el análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey, utilizando el software IBM SPSS 25.0 (Diaz-Ruiz et al., 1999).

8.8 Ensayo de glutatión reducido (GSH) en el modelo de crisis convulsivas con PTZ.

El contenido de glutatión reducido contenido en el hipocampo fue determinada mediante el método descrito por Hissin y Hilf en 1976 (Hissin y Hilf, 1976). El estándar de GSH se preparó diariamente en fosfato de sodio 0.1 M, buffer de EDTA 5 mM (pH 8) y se mantuvo en hielo hasta su uso. La solución de O-ftalaldehído (OPA) se preparó diariamente en metanol absoluto de grado reactivo justo antes de su uso. Las muestras de hipocampo se homogeneizaron en 3.75 mL de buffer de EDTA-fosfato (pH 8,0) más 1 mL de HPO_3 (25%). Los homogeneizados se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min y se separaron los sobrenadantes. Se añadieron 500 μL de alícuotas de sobrenadante a 4.5 mL de buffer de fosfato más 100 μL de O-ftalaldehído. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min y sus señales fluorescentes se registraron en un espectrofotómetro de fluorescencia marca Perkin Elmer LS50B a 350 nm de excitación y 420 nm de longitud de onda de emisión. Los resultados se expresaron como las moles de glutatión por gramo de tejido húmedo (Diaz-Ruiz et al., 2009).



Figura 14: Representación ilustrativa de la metodología empleada para cada una de las técnicas bioquímicas aplicables al análisis de hipocampo.

8.9 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

El ensayo de Lowry (Lowry et al., 1951) funciona en condiciones alcalinas y consta de dos pasos:

1. Reacción de Biuret: Se basa en la reducción del Cu^{2+} , que luego se une a la proteína formando un complejo Cu^{1+} -péptido.
2. Reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por este complejo

En su versión original, el método de Lowry podía sobrestimar la concentración de proteína en presencia de polifenoles, ya que estos también reducen el reactivo de Folin- Ciocalteu, generando una absorbancia en la misma región del espectro (~750 nm) que los complejos proteína-reactivo (Lowry et al., 1951).

Previo a realizar el ensayo de caspasas, determinamos las concentraciones de proteína de cada muestra utilizando el método de Lowry como se describe: cada muestra se diluyó 1:50 (50 μ L de homogeneizado + 950 μ L de agua), 0.4 mL de la muestra diluida se pipeteó y se adicionaron 2 mL de la siguiente solución: 49 mL de Na_2CO_3 al 2% + 0.5 mL de CuSO_4 al 1%, 10 min después se adicionó el reactivo folin fenol 1:1 (0.2 mL por muestra) y 30 min después las muestras fueron leídas en espectrofotómetro de UV/visible Perkin-Elmer lambda 20, a 550 nm. Es importante mencionar que la concentración de proteínas necesaria para realizar la prueba de actividad de caspasas en el hipocampo debe ser de 250 μ g por muestra.

8.10 Cuantificación actividad de caspasas 3, 8 y 9.

De las muestras que se obtuvieron por disección de hipocampo 24 h después del daño y que se encontraban en preservación a -20°C se llevó a cabo el ensayo utilizando un kit colorimétrico (APT 171 Merck Millipore) por cada caspasa, siguiendo el método descrito por Díaz-Ruiz et al., (2008). Las muestras de tejido se homogeneizaron en 50 μ L de buffer de lisis y posteriormente se incuban en hielo por 10 min, después se centrifugó el homogenado a 10000 rpm durante 10 min a 4°C . Al término de ese tiempo se adicionó 50 μ L del buffer de reacción (que contiene 10 mM DTT) a cada muestra y 5 μ L del sustrato a una concentración de 1 mM de IETD–AFC, se incubó a 37°C por dos horas. Las muestras se colocaron en un lector de placas de ELISA por fluorescencia a una longitud de onda de 400 nm de excitación y 505 nm de emisión. Para determinar la concentración de proteína requerida para este ensayo (50 a 200 μ g) se utilizó la técnica de Lowry. Se realizaron dos lecturas, la primera al inicio de la reacción y la segunda dos horas después, la actividad de las caspasas se determinó restando el valor de la primera lectura a la segunda (Díaz-Ruiz et al., 2015).

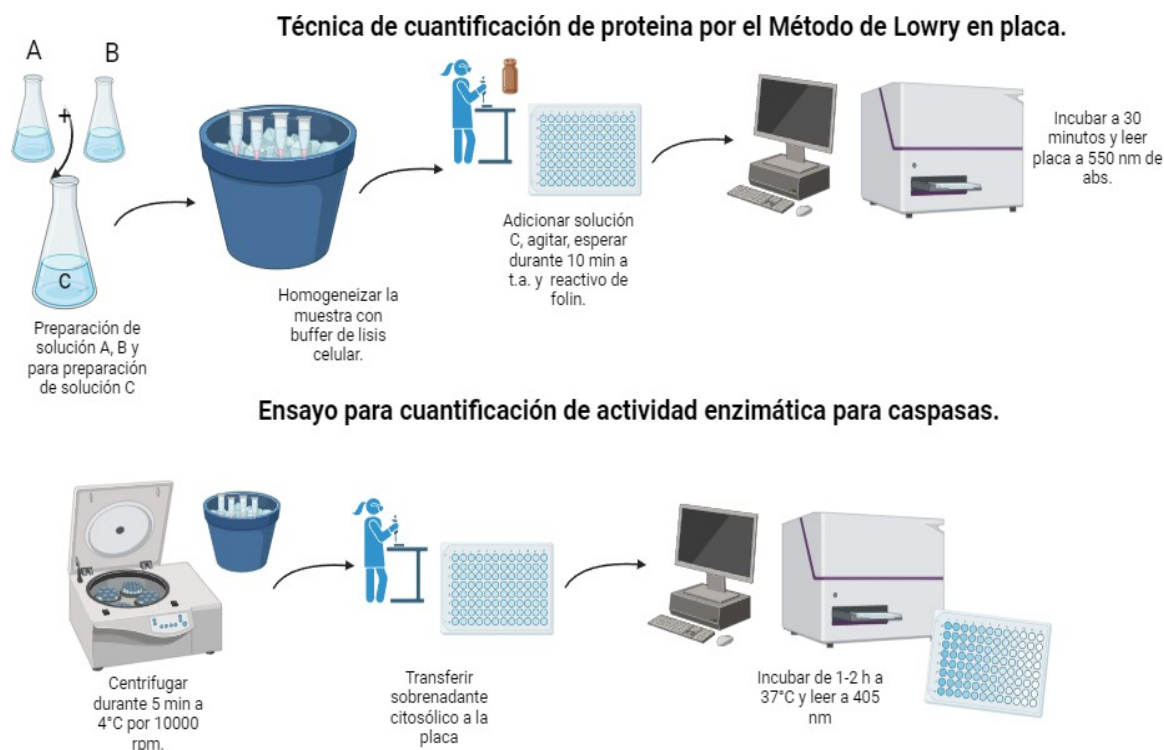


Figura 15: Representación gráfica de los métodos de análisis bioquímicos, A) Técnica de cuantificación de proteína por método de Lowry, B) Ensayo de cuantificación de actividad enzimática para caspasa 3, 8 y 9 en hipocampo izquierdo, creado en biorender.com.

8.11 Ensayo histológico en hipocampo de rata de las combinaciones de CBD-DDS

Una vez transcurridas 24 horas después las crisis convulsivas, las ratas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (10 mg/kg, i.p.) y se perfundieron transcardiacamente a través de la aorta ascendente con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) fría y paraformaldehído al 4% utilizando una bomba peristáltica a 30mL/min. Los cerebros se extrajeron del cráneo y se mantuvieron en paraformaldehído al 4% hasta llevar a cabo el proceso histológico e inclusión en parafina, con el fin de que tengan la consistencia adecuada para obtener los bloques con las muestras, éstos se cortaron en micrótomos a 5 µm de grosor, y se continuó con el proceso de acuerdo con cada técnica. (García-Martínez et al., 2019).

8.12 Ensayo de inmunofluorescencia con Fluoro-Jade B.

La técnica de Fluoro-Jade® B es una herramienta de inmunohistoquímica que se efectuó para evaluar el efecto neuroprotector de la combinación de ambos fármacos ya que sirve para evidenciar células en degeneración. Para este ensayo se utilizaron los hemisferios congelados que se prepararon anteriormente, los cuales fueron cortados en secciones longitudinales (5 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 NaOH 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 KMnO₄ 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 24 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 resina para posteriormente colocar un cubreobjetos y completar su montaje, después de secarse, se visualizaron en microscopio de fluorescencia (Leica Alemania).

8.13 Conteo celular

Las neuronas positivas a Fluoro-Jade (FJ+) se contaron en la región CA3 del hipocampo mediante el método descrito por Drexel *et al.*, 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 y se calculó la densidad celular (células/mm). Los conteos fueron realizados por un examinador cegado a los grupos experimentales.

8.14 Tinción de Nissl

Para llevar a cabo la tinción, primeramente, se realizó desparafinación a cada portaobjeto que contiene el tejido para lograr un teñido adecuado, debido a que los colorantes no son miscibles en parafina, se ocuparon agentes aclarantes para reemplazar la parafina, posteriormente se rehidrató mediante la inmersión en alcohol en concentración decreciente. Se procedió a realizar su tinción con violeta de cresilo durante 10 minutos a 37°C, enseguida se realizó diferenciación con etanol al 95%, se deshidrató con etanol al 100% y aclaró con tres cambios de xileno de 10 minutos cada uno, y se concluyó con montaje de resina y cubreobjetos.

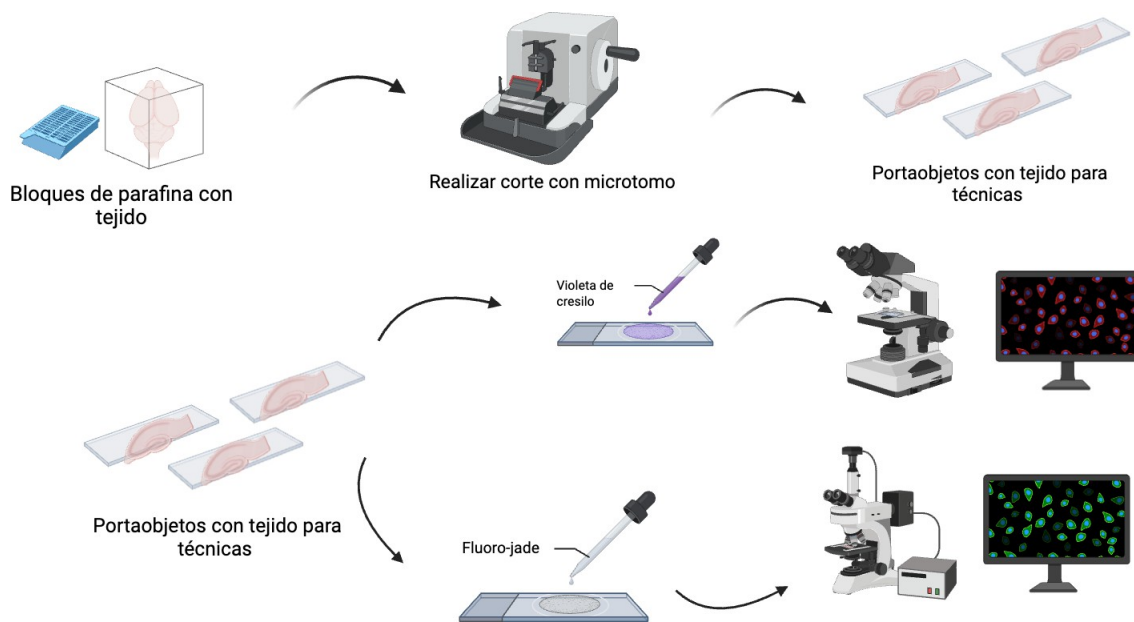


Figura 16: Representación ilustrada de la histología aplicada a las muestras de hipocampo, técnica de Nissl y técnica inmunohistoquímica con fluoro-jade B creado en biorender.com.

8.15 Análisis estadístico

En todos los casos, se realizó un análisis exploratorio de los datos para determinar si existía o no una distribución normal utilizando la prueba estadística de Kolmogorov- Smirnov y se evaluó la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Una vez determinado esto, se emplearon pruebas estadísticas paramétricas ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Dunnett. En los ensayos donde no se observó distribución normal y homogeneidad de varianzas se emplearon pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney). Se consideró un valor estadísticamente significativo con un $p < 0.05$. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS 25.0.

9. RESULTADOS

9.1 Estandarización de la intensidad de las crisis convulsivas en el modelo

El modelo conductual se llevó a cabo por medio de la medición de la latencia de las crisis para cada rata, es decir, una vez que se administraba la solución de PTZ, se esperaba que durante los primeros diez minutos se observará respuesta de acuerdo con la Escala de Racine, de no llegar al comportamiento esperado, se procedía a administrar de nuevo una dosis de 10 mg/kg y nuevamente esperar diez minutos más, así hasta lograr el comportamiento caracterizado como la escala de Racine (Fase V).

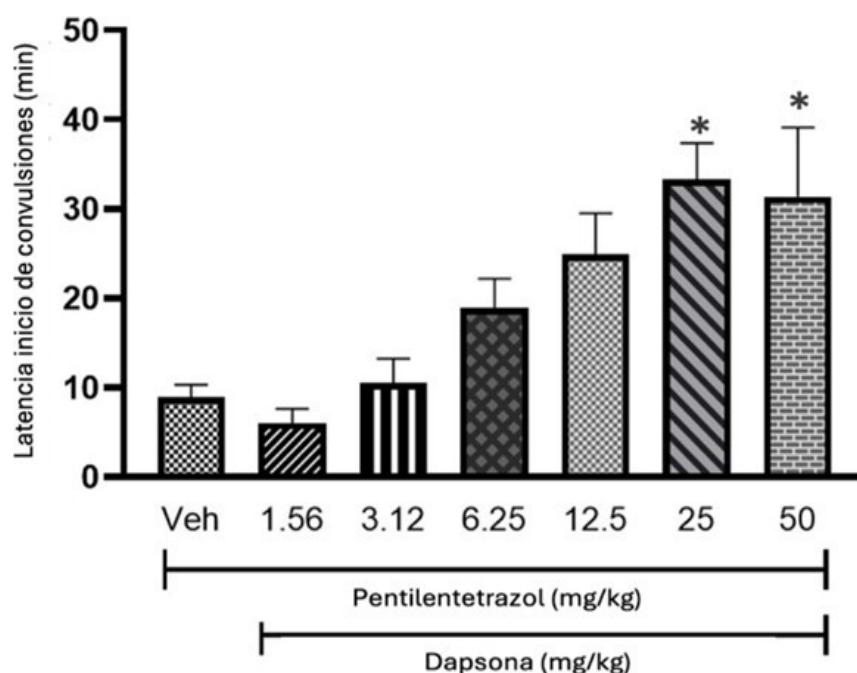


Figura 17: Latencia en minutos respecto a cada dosis de Dapsona. Los resultados están expresados como el valor promedio de las latencias de cada grupo de dosis $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

En la figura 17 se observa que a la dosis de 25 mg/kg de DDS se observa una mayor inhibición de la crisis tónico-clónica generalizada, puesto que se presentó a una mayor latencia, es decir, retrasando las mismas en comparación con el promedio del resto de las dosis. Durante la crisis se tomó el tiempo con cronómetro, cabe

resaltar que la latencia se consideró desde la primera administración de PTZ hasta lograr fase 5 que es la fase generalizada. Se administró primeramente los fármacos de forma individual, y una vez teniendo las latencias obtenidas tanto de DDS como de CBD, se procedió a realizar un análisis isobolográfico.

Por otro lado, Figura 11 se observa que a dosis de 20 mg/kg de cannabidiol hubo mayor latencia, es decir, que el comportamiento característico de la fase 5 de la Escala de Racine (Crisis tónico-clónica generalizada) tardó en presentarse respecto del resto de las dosis administradas representado como la media $\pm$ EE.

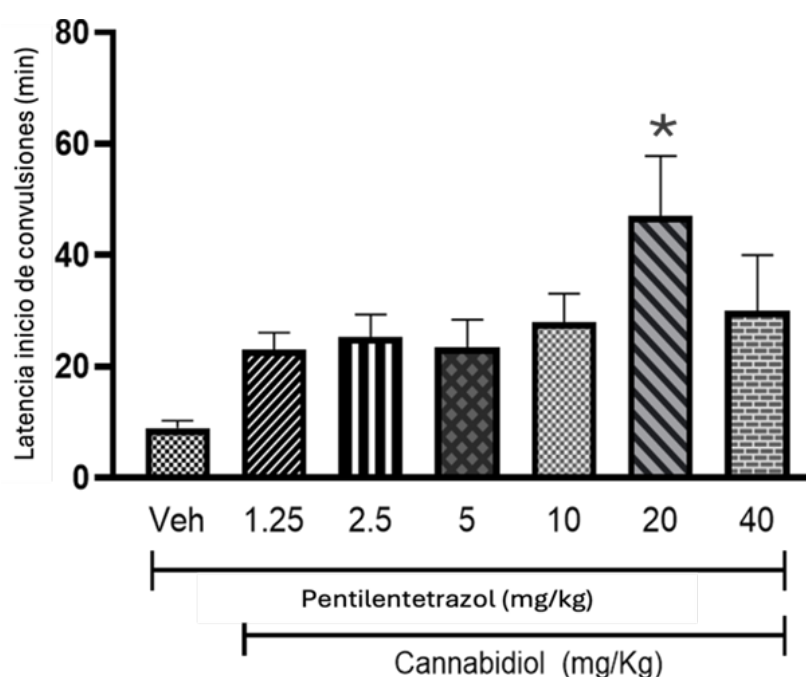


Figura 18: Latencia en minutos respecto a cada dosis de Cannabidiol. Los resultados están expresados como el valor promedio de las latencias de cada grupo de dosis $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

Una vez que se obtuvieron las latencias de cada uno de los fármacos (CBD y DDS) se procedió a realizar curvas dosis-respuesta para llevar a cabo el análisis isobolográfico, calculando el 50% de efecto anticonvulsivo que corresponde a cada latencia respecto a su dosis, en la Figura 18 se representa el isoblograma, una estrategia utilizada en farmacología que ha dado lugar a la combinación óptima de

fármacos de donde se obtuvieron cinco posibles combinaciones de ambos fármacos para su evaluación.

El isoblograma fue realizado en Microsoft Office Excel, iniciando con la determinación a partir de la curva dosis-respuesta de cada fármaco (DDS o CBD) la dosis que resulta en el 50% del efecto DE₅₀.

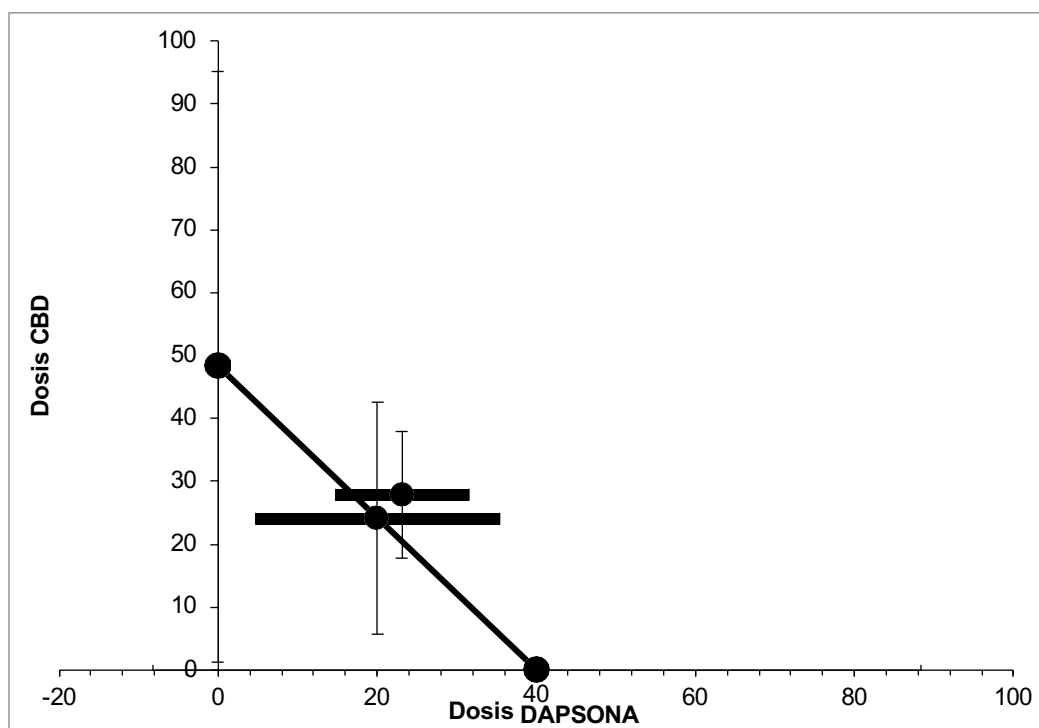


Figura 19: Isoblograma de DDS-CBD

Las DE₅₀ calculadas a partir de DDS o CBD se consideraron como una dosis teórica para cada fármaco. De esta manera, se obtuvo una curva de dosis-respuesta mediante la administración concurrente de los dos fármacos en una proporción constante de dosis (1:1) de los valores de DE₅₀ para la combinación de DDS (0.5) y CBD (0.5). Los puntos negros en el gráfico representan las dosis observadas de CBD y Dapsona que producen el 50% de la respuesta máxima esperada). Las barras de error verticales y horizontales indican la variabilidad en las dosis de CBD y DDS, respectivamente. Los puntos en el gráfico están sobre o muy cerca de la línea aditiva, lo que sugiere que la combinación de CBD y DDS tiene un efecto

aditivo. Esto significa que los dos fármacos combinados producen un efecto predecible que es equivalente a la suma de sus efectos individuales.

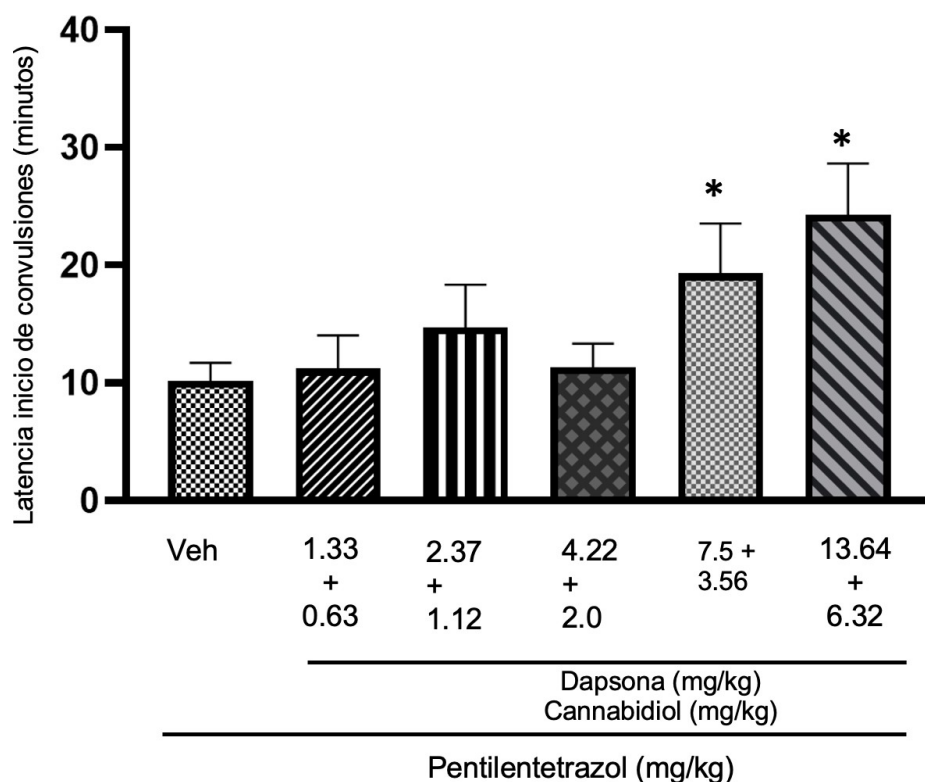


Figura 20: Latencia en minutos de cinco diferentes dosis combinadas de Dapsona y Cannabidiol. Los resultados están expresados como el valor promedio de las latencias de cada dosis combinada $\pm$ E.E. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney. Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo (* $p < 0.05$).

9.2 Cuantificación de los productos finales de lipoperoxidación en modelo de crisis convulsivas con PTZ.

En la figura 21 se representa la gráfica de las unidades de fluorescencia por gramo de tejido de cada uno de los grupos evaluados de ambos fármacos en la cuantificación de peroxidación de lípidos, por medio de la prueba de homogeneidad de varianzas se identificó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, y se realizó un ANOVA y prueba post hoc T de Dunnett en donde $p < 0.05$ indica que existe diferencia significativa entre el grupo comparado con el vehículo. Para el caso de DDS existe diferencia significativa en todos los grupos respecto al

vehículo y en el caso de CBD, solo hay diferencia significativa en el grupo con dosis de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg y 20 mg/kg.

El grupo control (Veh) muestra niveles elevados de peroxidación de lípidos, lo que indica un alto nivel de daño oxidante en ausencia de tratamiento. Las dosis de Dapsona administradas (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 mg/kg) muestran variabilidad en los niveles de peroxidación de lípidos.

Las dosis de 1.56, 3.125, 6.25 mg/kg, muestran una reducción significativa en los niveles de peroxidación de lípidos en comparación con el grupo control, sugiriendo una actividad antioxidante efectiva, a 12.5 mg/kg muestra una reducción aún más pronunciada en los niveles de peroxidación de lípidos, indicando una alta eficacia antioxidante, a 25 mg/kg la reducción es menos significativa que en dosis menores, 50 mg/kg muestra una reducción modesta en comparación con el control, pero no tan efectiva como las dosis intermedias.

Por otro lado, las dosis de CBD administradas (1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg) también muestran dispersión en los niveles de peroxidación de lípidos. A 1.25 mg/kg se muestra una reducción en los niveles de peroxidación de lípidos, aunque la variabilidad es alta, mientras que la dosis de 2.5 mg/kg presenta una reducción moderada en comparación con el control, a 5, 10, 20 mg/kg se muestran reducciones menores y variabilidad indicando que la actividad antioxidante no es tan pronunciada y a 40 mg/kg, a pesar que hay reducción en los niveles de peroxidación de lípidos, tiene alta variabilidad, sugiriendo un efecto antioxidante menos consistente.

Los resultados demuestran que tanto la DDS como el CBD tienen efectos antioxidantes, reduciendo la peroxidación de lípidos en el modelo, aunque la eficacia varía con la dosis.

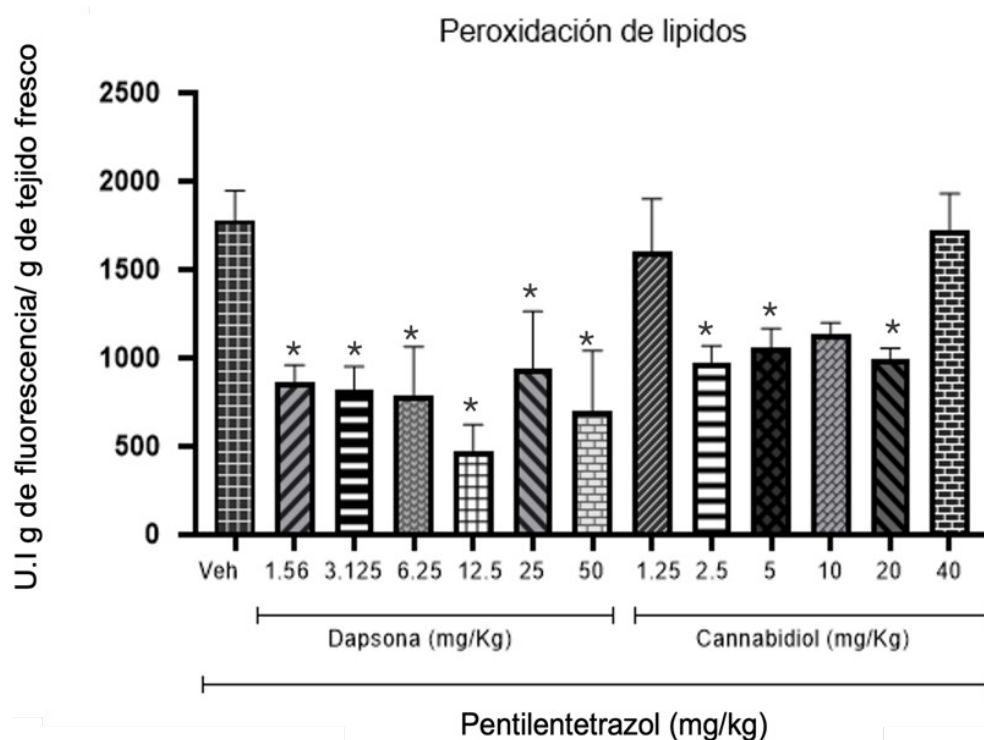


Figura 21: Resultados de los niveles de peroxidación de lípidos en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett.

*Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

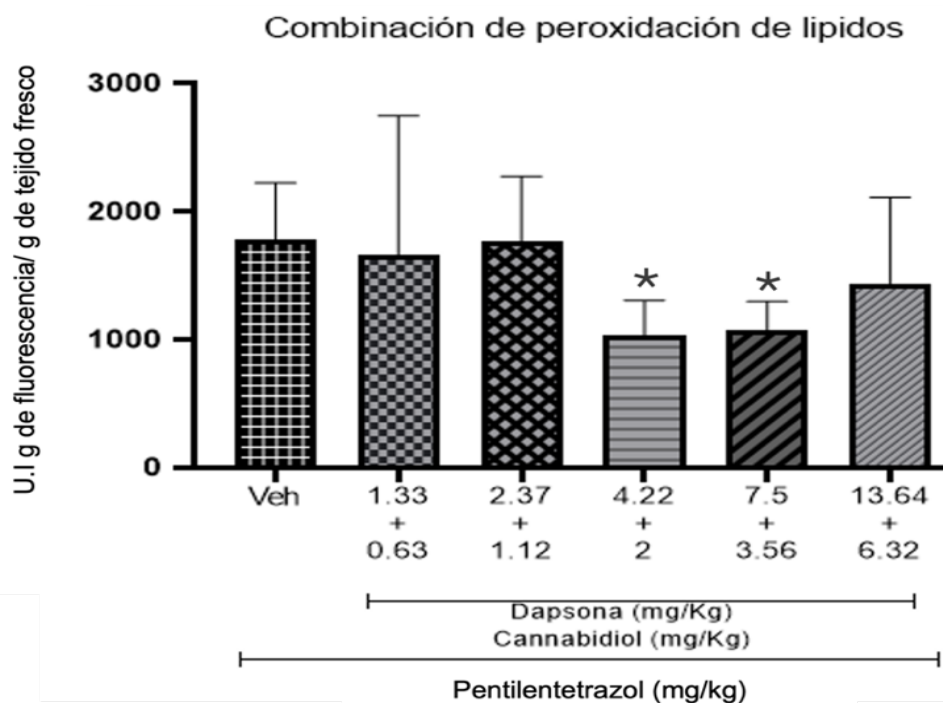


Figura 22: Resultados de los niveles de peroxidación de lípidos en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

La figura 22 representa las medias de cada una de las combinaciones evaluadas en la cuantificación de peroxidación de lípidos, en donde se consideró el valor de $p > 0.05$. Debido a que no existe suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula de que las varianzas son iguales entre los grupos se aplicó un análisis estadístico de Kruskal-Wallis en donde se determinó que sí existe diferencia estadísticamente significativa, por lo que se aplica prueba de Mann-Whitney donde no hay diferencia significativa en los últimos grupos de las dosis más altas.

De acuerdo con el gráfico, el grupo control muestra un nivel alto de peroxidación de lípidos. A medida que se combinan diferentes dosis de DDS y CBD se observa una tendencia a la disminución de la peroxidación de lípidos, especialmente en las combinaciones de 4.22 mg/kg de DDS + 2.5 mg/kg de CBD y 7.5 mg/kg de DDS + 3.56 mg/kg de CBD, que están marcadas con un asterisco (*), indicando la diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control,

mientras que las dosis más altas no reducen la peroxidación de lípidos de manera significativa en comparación con el control, aunque se puede observar una tendencia a la disminución.

9.3 Cuantificación de glutatión reducido (GSH) en hipocampo de rata en un modelo de crisis convulsivas con PTZ.

En la Figura 23 se representa la gráfica de las medias $\pm$ E.E. de cada uno de los grupos evaluados en la actividad de glutatión reducido (GSH). El gráfico presentado muestra los niveles de glutatión reducido (GSH) en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD. El glutatión reducido es un antioxidante intracelular crucial que protege a las células del daño oxidante, el grupo control muestra los niveles basales de GSH, que se utilizan como referencia para evaluar los efectos de la administración de diferentes dosis de ambos fármacos.

Para el caso de DDS, las dosis administradas (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 mg/kg) muestran variabilidad en los niveles de GSH. Las dosis de 1.56, 6.25, 12.5, 25 mg/kg no muestran un incremento significativo en los niveles de GSH en comparación con el grupo control, sin embargo, a dosis de 3.125 mg/kg indica un incremento notable en los niveles de GSH, sugiriendo una potencial actividad antioxidante significativa a esta concentración específica, mientras que en la dosis de 50 mg/kg también muestra un incremento, aunque menos pronunciado que la dosis de 3.125 mg/kg. Por su parte, las dosis de CBD administradas (1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg) también muestran variabilidad en los niveles de GSH en comparación con el grupo control. A dosis de 1.25, 2.5, 5 mg/kg existe incremento en los niveles de GSH, mientras que, las dosis de 10 y 20 mg/kg no indican un incremento significativo respecto al grupo control, finalmente, a la dosis más alta que fue de 40 mg/kg no parece tener un efecto claro en los niveles de GSH, teniendo un comportamiento similar al de las dosis intermedias.

Los resultados obtenidos sugieren que tanto para DDS y CBD pueden elevar los niveles de GSH en ratas con crisis convulsivas inducidas por PTZ, pero esta capacidad antioxidante varía dependiendo de la dosis administrada.

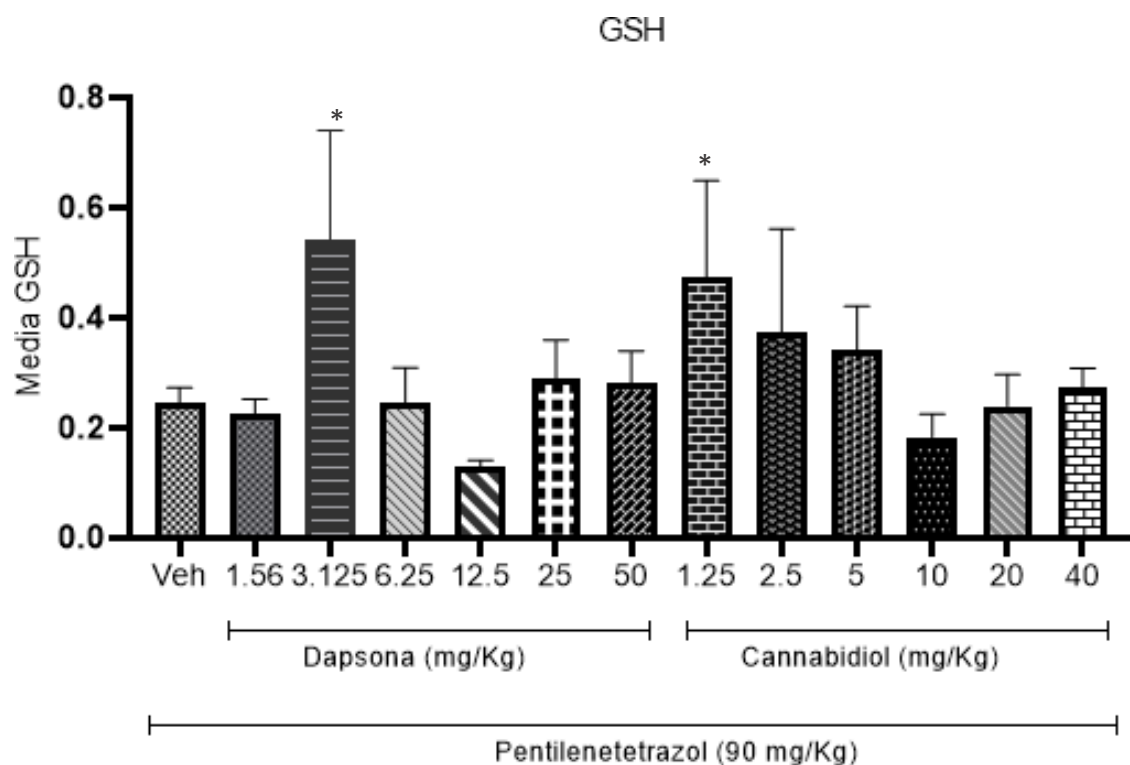


Figura 24: Resultados de los niveles de glutatión reducido (GSH) en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney.

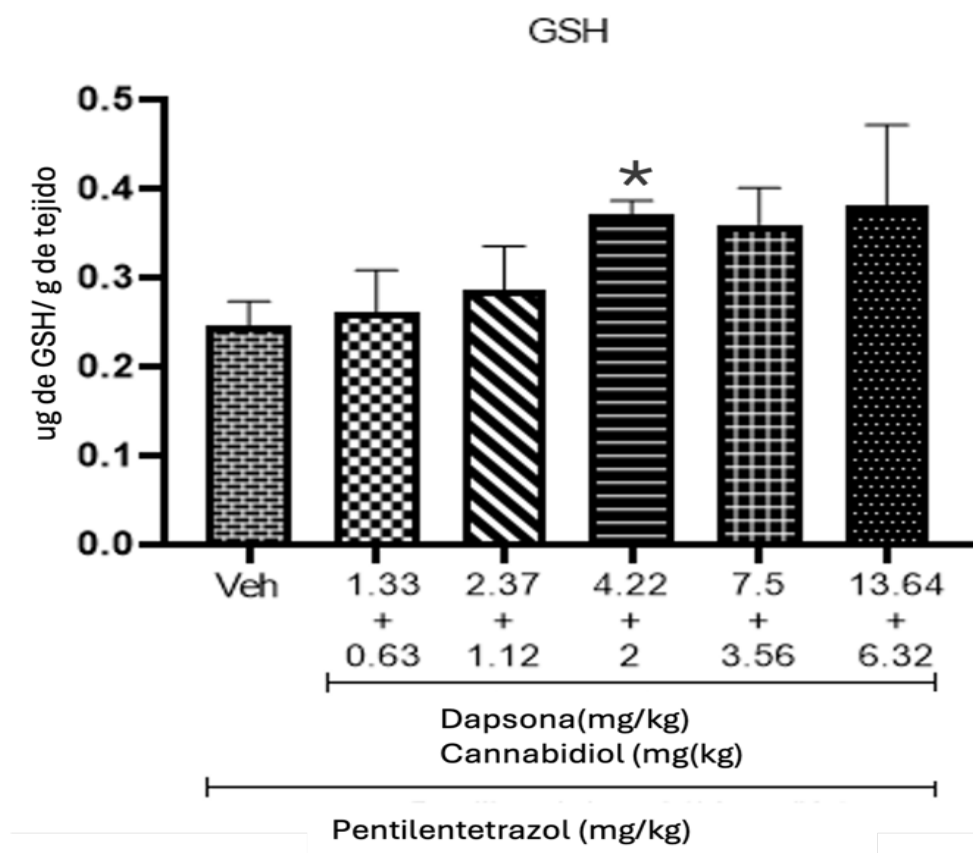


Figura 25: Resultados de los niveles de glutatión reducido (GSH) en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

El gráfico presentado en la figura 25 muestra los niveles de glutatión reducido (GSH) en ratas tratadas con diferentes combinaciones de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas con pentilentetrazol (PTZ).

El grupo control, administrado con PTZ, muestra los niveles basales de GSH en el modelo de crisis establecido y se observa que todas las combinaciones de DDS y CBD evaluadas, mostraron un incremento en los niveles de GSH respecto al grupo control. Este incremento es más notable en las dosis de 13.64 mg/kg de DDS + 6.32 mg/kg de CBD y sugiere una fuerte actividad antioxidante cuando ambos compuestos se administran en dosis elevadas. Los resultados sugieren que tanto la

DDS y el CBD tienen efectos positivos en la elevación de los niveles de glutatión reducido en ratas con crisis convulsivas inducidas por PTZ.

9.4 Cuantificación de la actividad enzimática para caspasas 3 en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ

La gráfica de la figura 18 sugiere que la dosis de 12.5 mg/kg de DDS y las 10 y 20 mg/kg de CBD pueden reducir significativamente la actividad de la caspasa 3 en un modelo inducido con PTZ, ya que estas diferencias son estadísticamente significativas en comparación con el grupo control.

Por otro lado, las dosis restante evaluadas de estos compuestos no mostraron cambios significativos en la actividad de la caspasa 3, sugiriendo que el efecto podría ser dosis-dependiente o limitado a un rango específico de concentración.

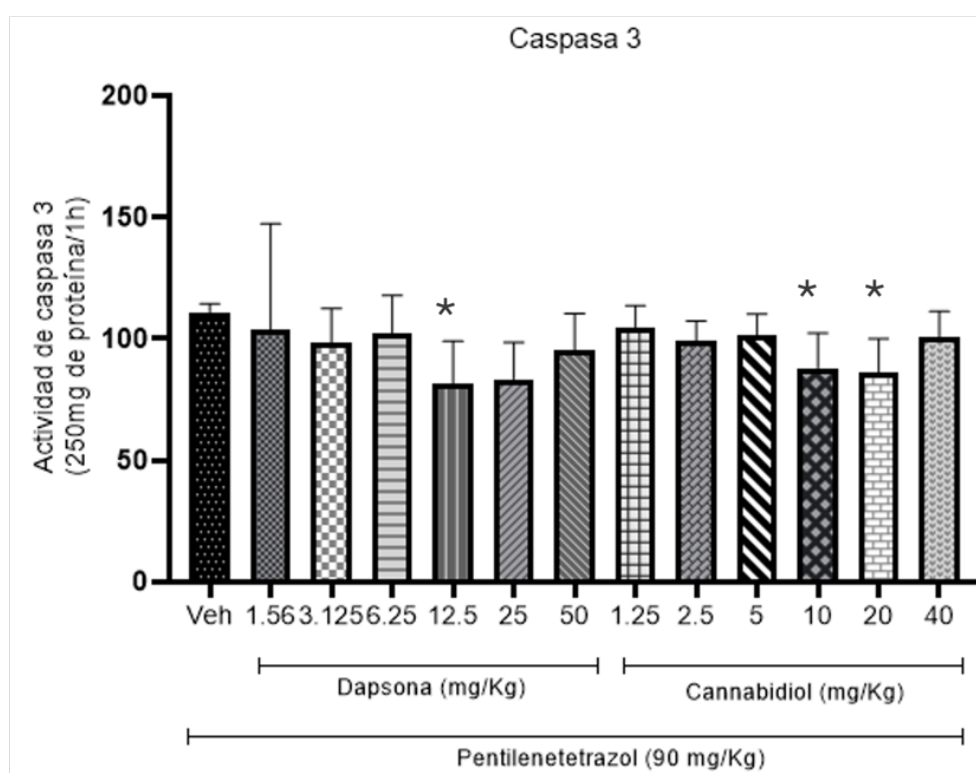


Figura 26: Resultados de la actividad de caspasa 3 en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

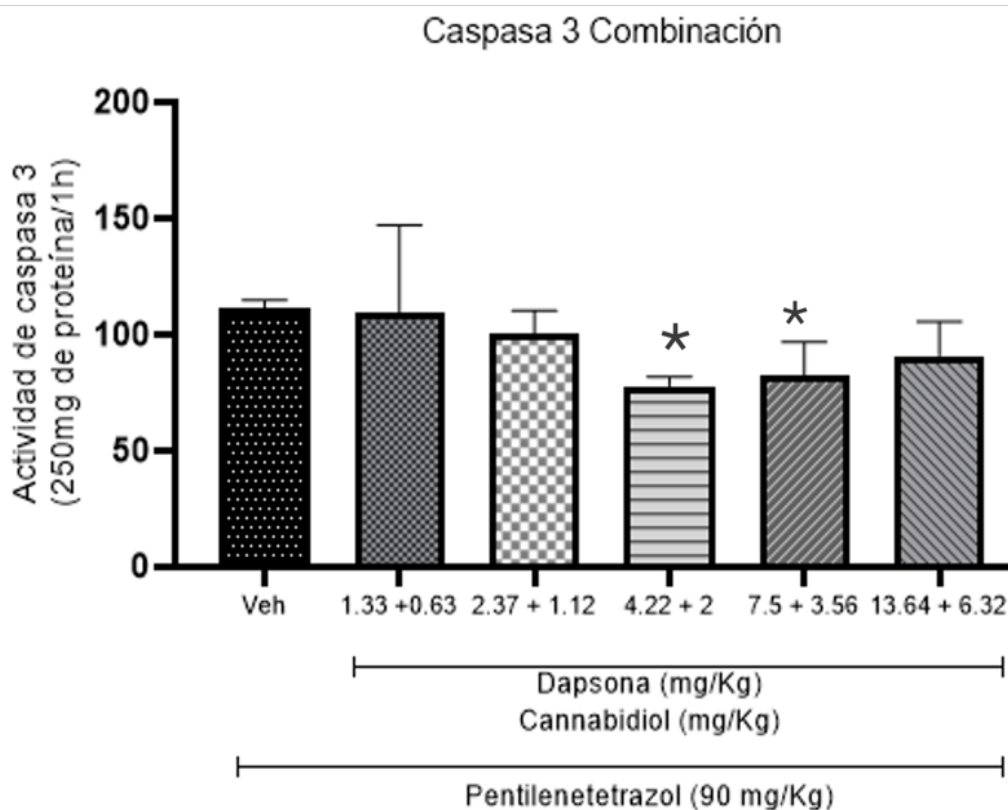


Figura 27: Resultados de la actividad de caspasa 3 en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

La figura 27 representa la actividad de la caspasa 3 en cada una de las combinaciones de ambos fármacos, las combinaciones de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD y 7.5 mg/kg de DDS + 3.56 mg/kg de CBD muestran una reducción significativa en la actividad de la caspasa 3, lo que sugiere una reducción en la apoptosis en estos grupos.

Sin embargo, las dosis más bajas y altas de las combinaciones no parecen tener el mismo efecto protector, lo que sugiere que la eficacia de la combinación de estos fármacos podría depender de un rango específico de dosis, ya que el resto de las combinaciones no muestran diferencias significativas en la actividad anti apoptótica en comparación con el control, lo que indica que no son efectivas para reducir la apoptosis en este modelo.

9.5 Cuantificación de la actividad enzimática para caspasa 8 en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ

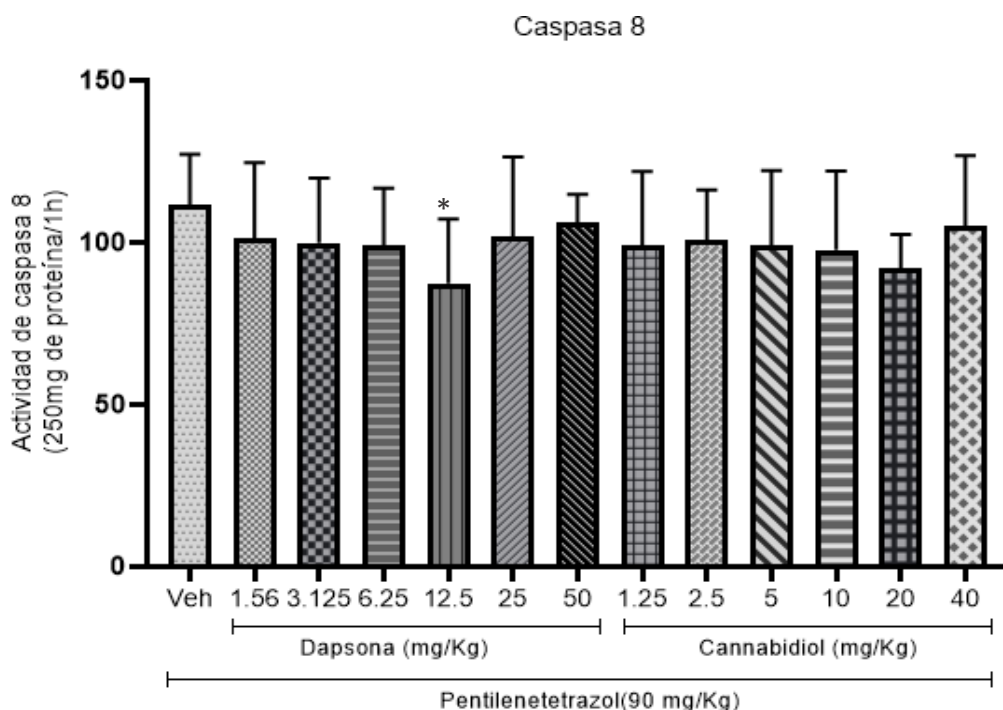


Figura 28: Resultados de la actividad de caspasa 8 en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett.

Por otro lado, el gráfico presentado en la figura 28 muestra la actividad de la caspasa 8 en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ. La caspasa 8 es una proteasa crucial en la vía apoptótica, y su actividad puede indicar niveles de apoptosis celular. Se observa que el grupo control muestra la actividad basal de la caspasa 8. Este valor se utiliza como referencia para comparar los efectos de las dosis probadas, en el caso de las dosis de DDS 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 mg/kg no muestran una disminución significativa en la actividad de la caspasa 8 respecto con el grupo control, lo que sugiere no tener un efecto significativo en la reducción de la apoptosis en este modelo de crisis convulsivas.

Por su parte, el CBD tampoco muestra resultados en términos de actividad de la caspasa 8, no parece tener un efecto significativo en la reducción de la apoptosis en este contexto específico, indicando que, al menos en este modelo experimental y para las dosis utilizadas, estos compuestos no muestran actividad anti apoptótica significativa en términos de modulación de la caspasa 8.

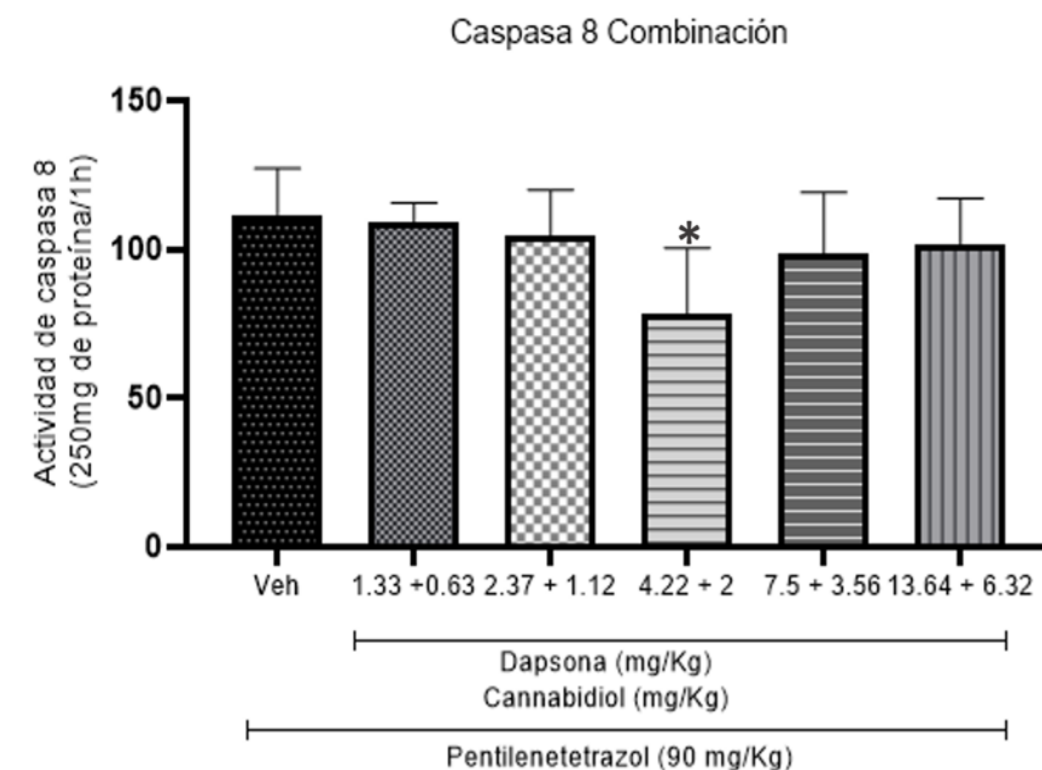


Figura 29: Resultados de la actividad de caspasa 8 en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

En la figura 29 observamos el gráfico que resultó de la actividad de caspasa 8 en las dosis de las combinaciones entre DDS y CBD, donde, evidentemente a dosis de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD hay diferencia significativa respecto al grupo control, lo que podría indicar un efecto protector contra la apoptosis en el modelo experimental desarrollado.

Sin embargo, las otras combinaciones de dosis no parecen tener un efecto significativo en la actividad de la caspasa 8, lo que indica que el efecto protector es específico para ciertas dosis y no se observa en todas las combinaciones probadas.

9.6 Cuantificación de la actividad enzimática para caspasa 9 en un modelo de crisis convulsivas inducida con PTZ

El análisis estadístico de la figura 30 sugiere que la DDS a dosis de 12.5 mg/kg y 25 mg/kg reduce significativamente la actividad de la caspasa 9, lo que podría implicar un efecto protector en este modelo experimental. Sin embargo, las otras dosis de DDS y todas las dosis de CBD no muestran efectos significativos.

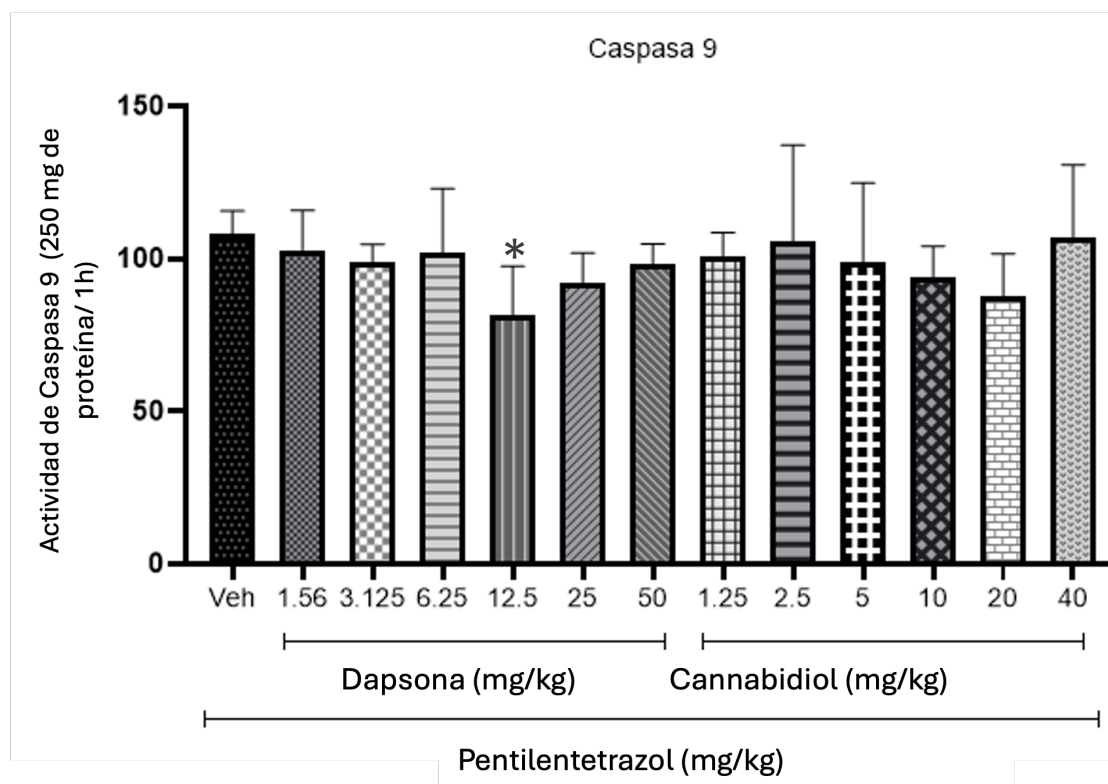


Figura 30: Resultados de la actividad de caspasa 9 en ratas tratadas con diferentes dosis de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

Por su parte en la combinación de ambos fármacos en la caspasa 9, como se observa en la figura 31 la dosis de la combinación de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD, indican la reducción estadísticamente significativa de la actividad de la caspasa 9 en comparación con el grupo control, mientras que el resto de las dosis parece no tener un efecto significativo en la actividad de la caspasa 9 en este modelo experimental.

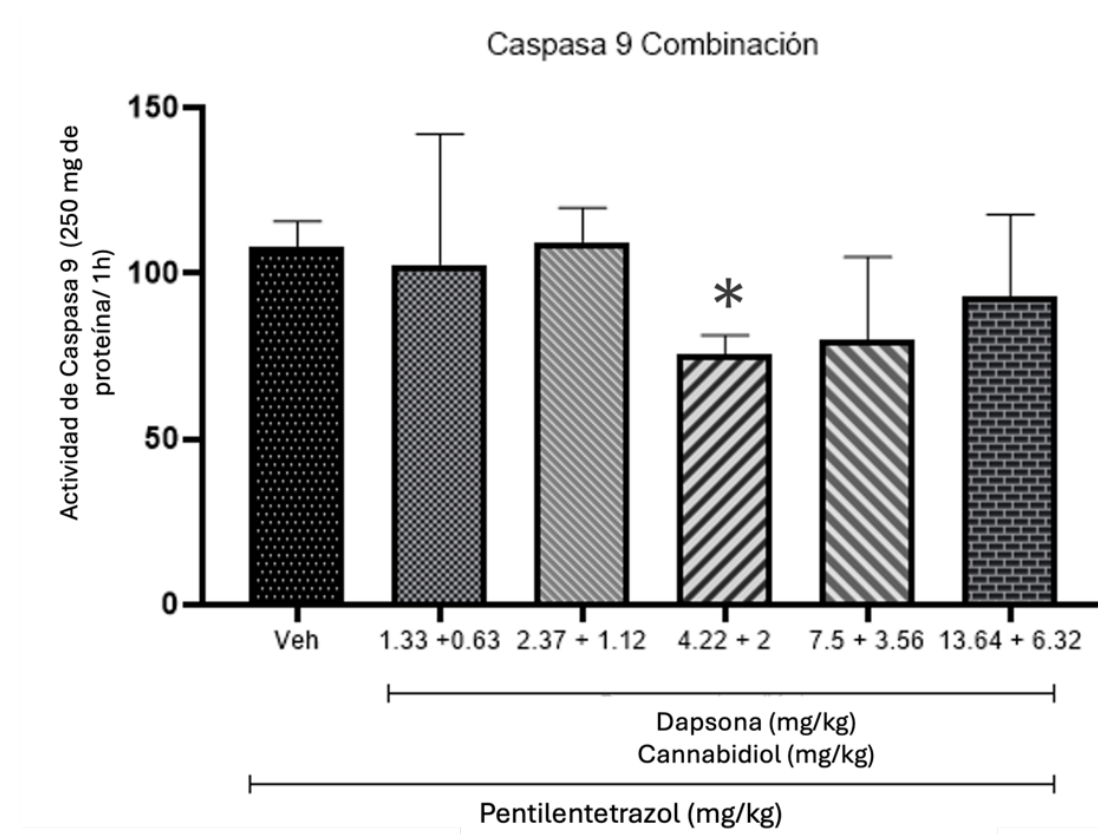


Figura 31: Resultados de la actividad de caspasa 9 en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Los valores están expresados como el promedio $\pm$ E.E. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett. *Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

9.7 Evaluación de células viables mediante la tinción de Nissl en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ

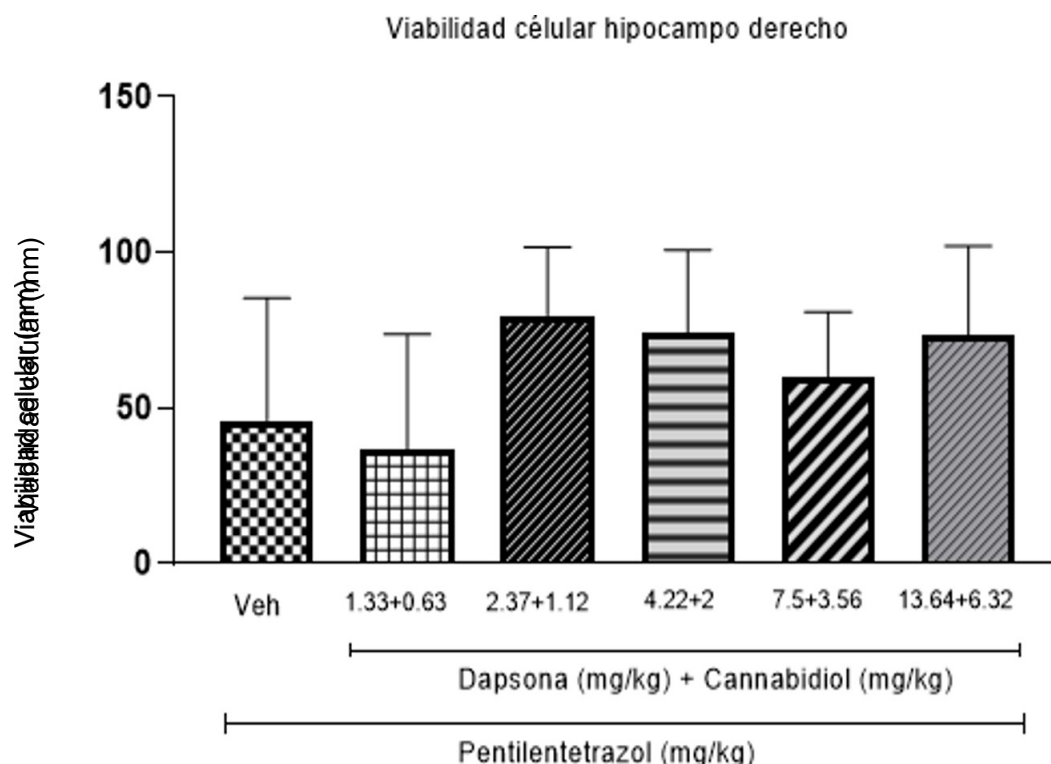


Figura 32: Resultados de la actividad neuroprotectora en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ en el hipocampo derecho. ANOVA de una vía, seguida de la prueba de Dunnett.

La figura 32 nos muestran los resultados obtenidos del análisis del hipocampo derecho en el modelo de epilepsia. Ninguna de las cinco combinaciones respecto a grupo control mostró diferencia estadísticamente significativa, por otro lado, la figura 33 representa los resultados correspondientes al hipocampo izquierdo y tampoco hay diferencia estadísticamente significativa, lo que podría deberse a que las desviaciones estándar son altas en varios grupos y el tamaño de muestra (n) es pequeño (entre 3 y 5 por grupo), lo que podría incrementar la variabilidad.

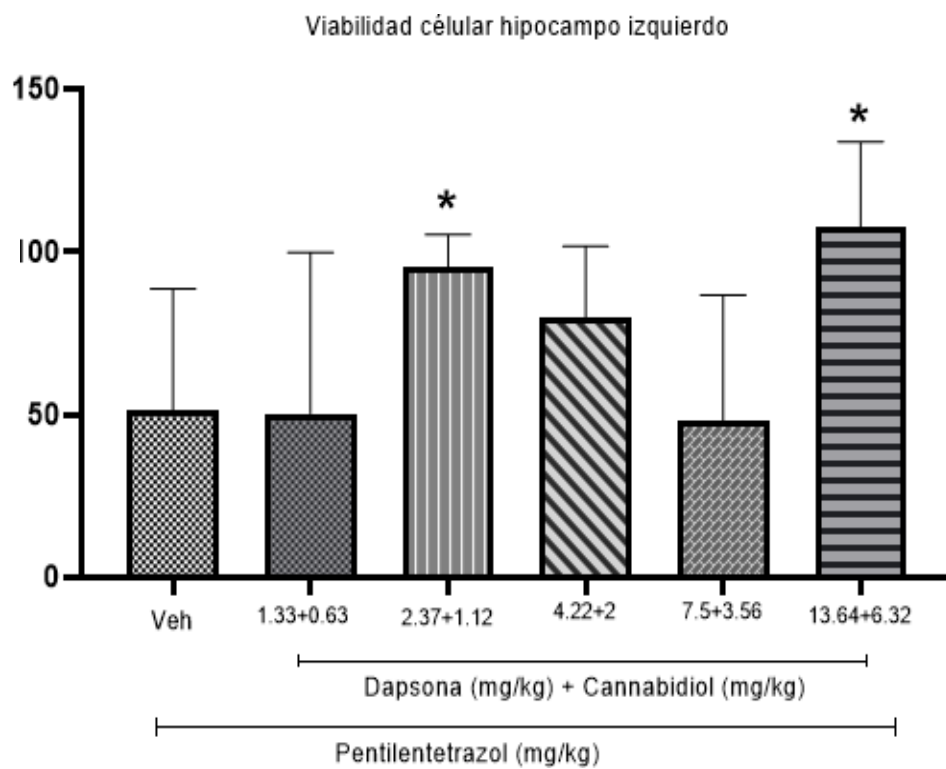


Figura 33: Resultados de la actividad de viabilidad celular en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ en hipocampo izquierdo. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney.

*Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$).

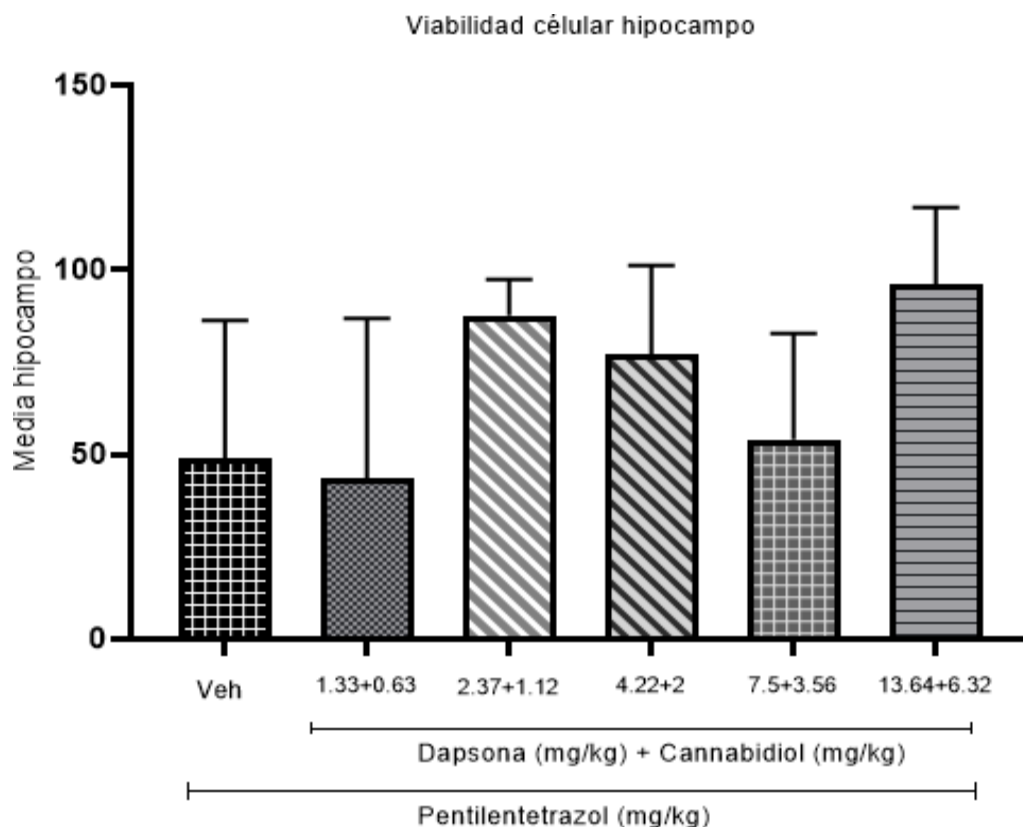
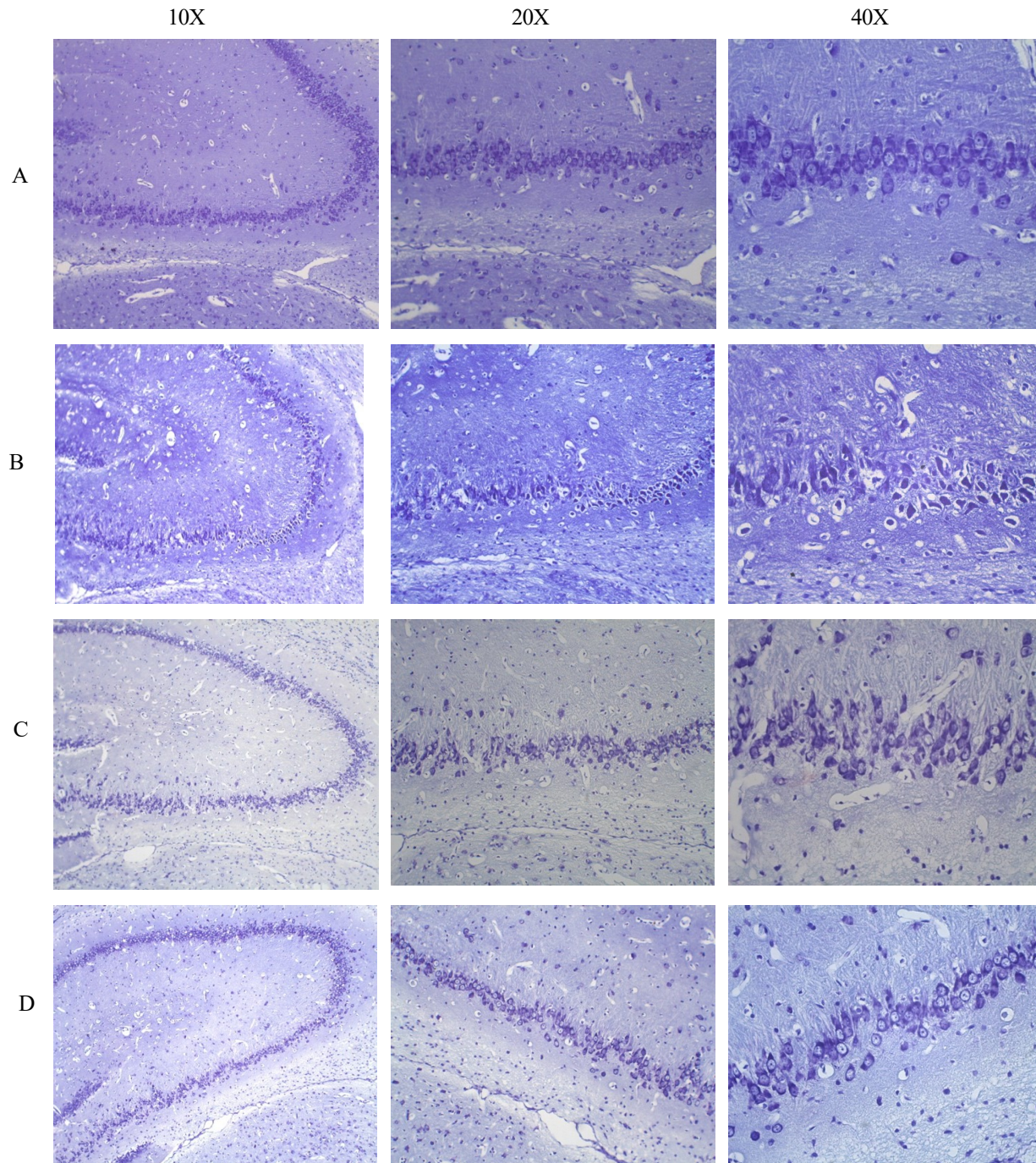


Figura 34: Resultados de la actividad neuroprotectora en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney.

La figura 34 y 35 nos indica que la administración de PTZ redujo de manera importante la viabilidad celular en el hipocampo, como se observa en el grupo vehículo. El tratamiento con la combinación 1 (1.33 + 0.63 mg/kg) no mostró cambios relevantes respecto al grupo vehículo, manteniéndose una viabilidad reducida. En contraste, las combinaciones 2 y 3 (2.37 + 1.12 y 4.22 + 2 mg/kg) incrementaron la viabilidad neuronal, sugiriendo un efecto protector parcial frente al daño inducido por PTZ. Sin embargo, la combinación 4 (7.5 + 3.56 mg/kg) no mantuvo este efecto, presentando valores similares a los del grupo vehículo. Finalmente, la combinación 5 (13.64 + 6.32 mg/kg) mostró el mayor integridad celular, con una viabilidad cercana a los valores basales observándose el mayor beneficio en la dosis más alta analizada (ver figura 35).



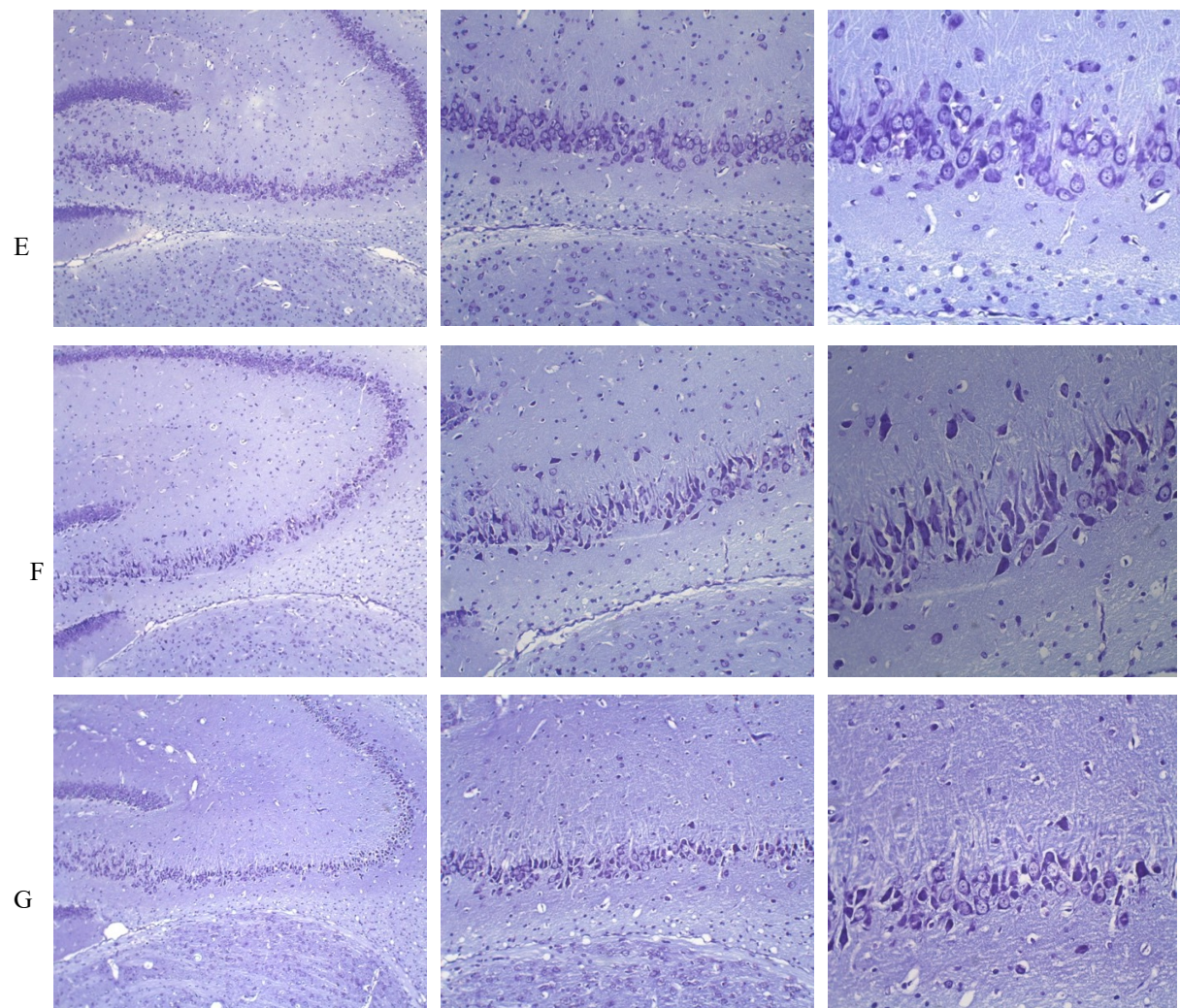


Figura 35: Panel representativo de las células piramidales en la región CA3 del hipocampo derecho con tinción de violeta de cresilo. Panel A: Sham (grupo control negativo), panel B: PTZ+VEH (control), panel C: Combinación 1 (1.33 mg/kg DDS + 0.63 mg/kg CBD), panel D: Combinación 2 (2.37 mg/kg DDS + 1.12 mg/kg CBD), panel E: combinación 3 (4.22 mg/kg DDS + 2 mg/kg CBD), panel F: combinación 4 (7.5 mg/kg DDS+ 3.56 mg/kg CBD) y panel G: combinación 5 (13.64 mg/kg DDS + 6.32 mg/kg CBD).

9.8 Determinación del efecto neuroprotector de células degeneradas en hipocampo mediante técnica de Fluoro- Jade B.

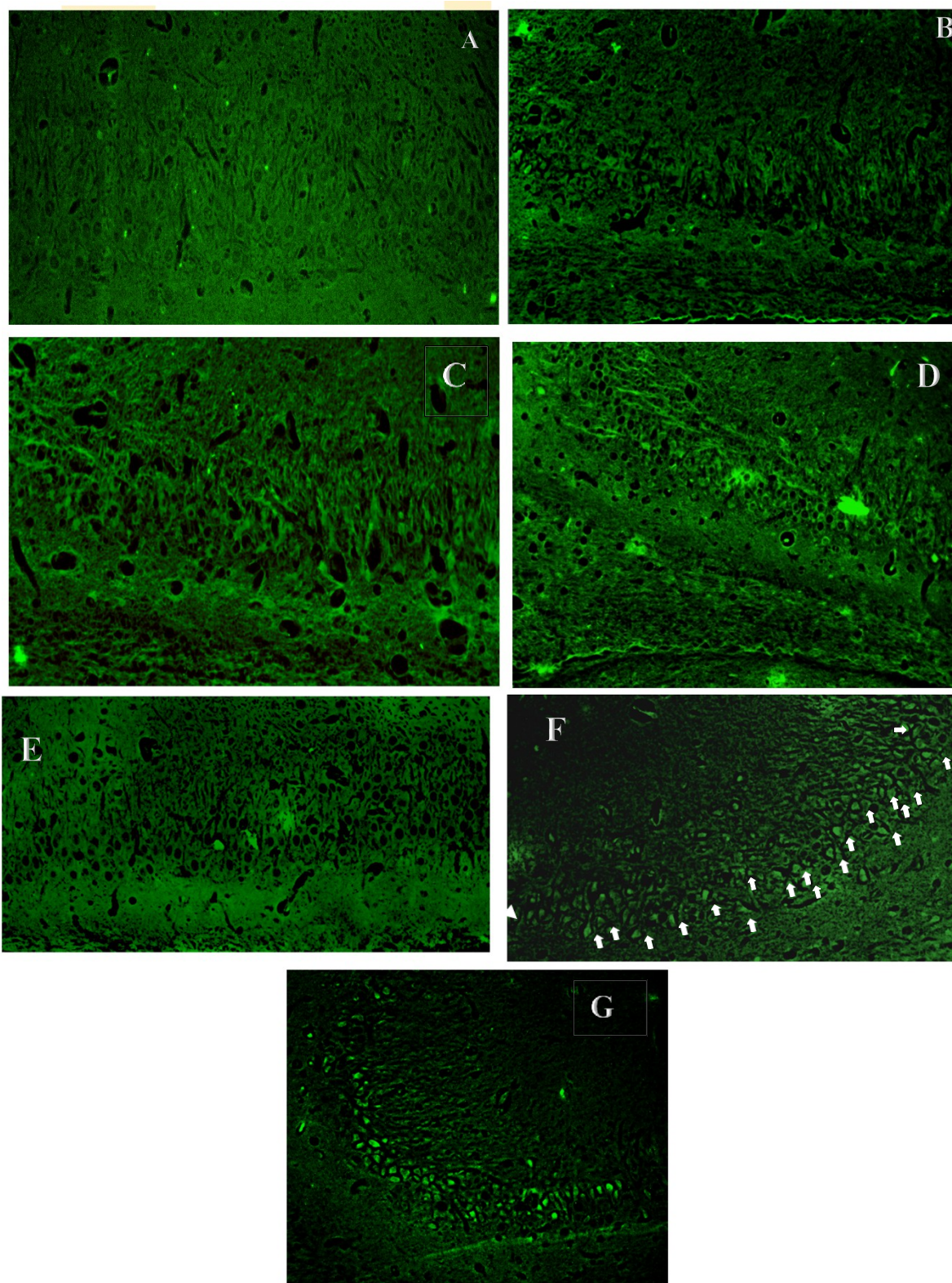


Figura 36: Panel representativo de las células piramidales en la región CA3 del hipocampo con inmunohistoquímica con FJ-B. Panel A: Sham (grupo control negativo), panel B: PTZ+VEH (control), panel C: Combinación 1 (1.33 mg/kg DDS + 0.63 mg/kg CBD), panel D: Combinación 2 (2.37 mg/kg DDS + 1.12 mg/kg CBD), panel E: combinación 3 (4.22 mg/kg DDS + 2 mg/kg CBD), panel F: combinación 4 (7.5 mg/kg DDS+ 3.56 mg/kg CBD) y panel G: combinación 5 (13.64 mg/kg DDS + 6.32 mg/kg CBD).

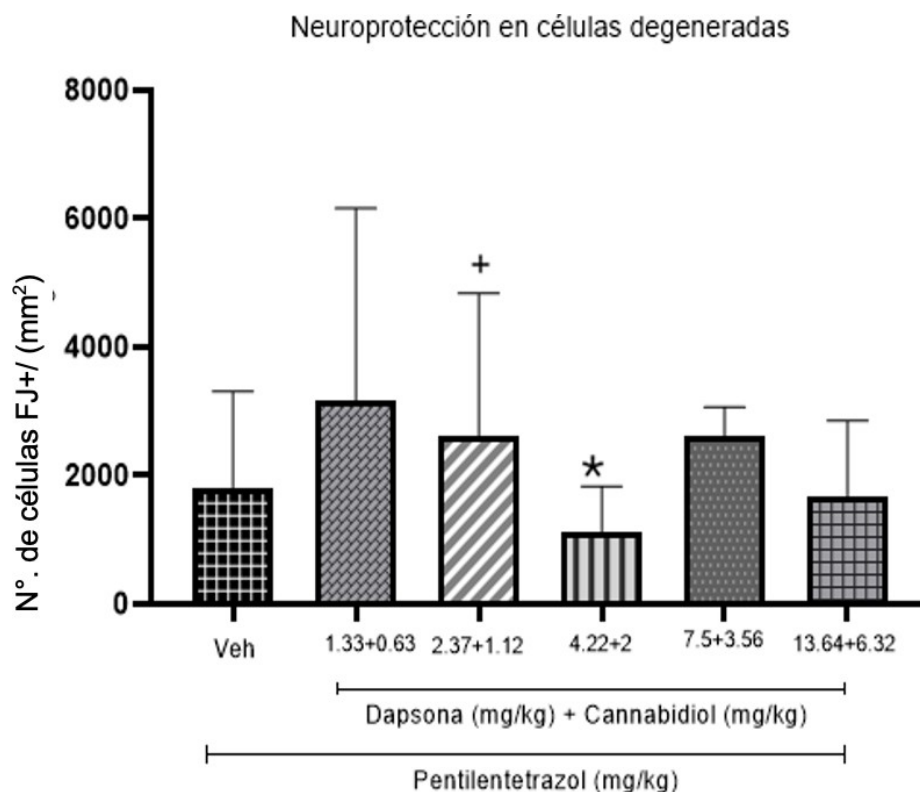


Figura 37: Número de células positivas a Fluoro-Jade por mm². Representando el valor promedio $\pm$ E.E. de 4 animales por grupo, evaluando el efecto neuroprotector en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney.

+Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo ($p < 0.05$) mostrando incremento.

*Diferencia significativa vs Control (Veh) observándose disminución de células degeneradas.

La figura 36 y 37 muestra imágenes histológicas representativas de la tinción de Fluoro-Jade B y su análisis, respectivamente, indicando las neuronas piramidales en degeneración

de la región CA3 del hipocampo de los animales tratados, la obtención del tejido se realizó 24h posteriores a la administración del tratamiento y el número de células en degeneración de los grupos PTZ/ DDS 1.33 + CBD 0.63mg (3180.66 ± 2983.91), PTZ/DDS 2.37mg+CBD 0.63mg (3878.72 ± 1366.80), PTZ/DDS4.22mg + CBD 2mg (1116.20 ± 720.13) habiendo solo diferencia estadísticamente significativa al grupo control PTZ+Veh (2094.19 ± 513.29) del resto PTZ/7.5mg + CBD3.56mg (2619.06 ± 444.49), PTZ/DDS13.64mg + CBD6.32mg (1658.56 ± 1196.13)., se observa que la combinación del panel E sugiere un efecto neuroprotector dependiente de la dosis, siendo la dosis intermedia (4.22+2 mg/kg) la más efectiva para reducir la neurodegeneración en el modelo estudiado.

10. DISCUSIÓN

En el presente estudio demostramos la eficacia anticonvulsiva, antioxidante, antiapoptótica y neuroprotectora de la combinación de cannabidiol (CBD) y dapsona (DDS) en un modelo de crisis convulsivas inducidas por la administración intraperitoneal de pentilentetrazol (PTZ) en ratas, bajo un esquema de tratamiento preventivo. Nuestros resultados son consistentes con reportes previos que emplean el modelo de *kindling* químico con PTZ como herramienta para explorar los mecanismos de la ictogénesis. Este modelo, ampliamente utilizado en la investigación de epilepsia, permite registrar con precisión el inicio, la progresión y la severidad de las convulsiones, así como evaluar la eficacia de distintos tratamientos (Pérez et al., 2021). El PTZ actúa como antagonista no competitivo de los receptores GABA_A, reduciendo la inhibición sináptica e incrementando la excitabilidad neuronal (Kandratavicius et al., 2014). Aunque este modelo no produce crisis espontáneas recurrentes ni simula epilepsia crónica, resulta altamente útil para estudios de cribado de fármacos anticonvulsivos.

En este contexto, observamos que la combinación CBD+DDS prolongó la latencia y redujo la severidad de las convulsiones, con un efecto aditivo confirmado mediante análisis isoblográfico (Tallarida, 2011). Este hallazgo es relevante, ya que en la clínica los pacientes suelen recibir terapias combinadas de fármacos anticrisis, aunque alrededor del 30% desarrolla farmacoresistencia. En este sentido, estudios en cultivos celulares han demostrado que la combinación CBD+DDS puede ejercer un efecto sinérgico en condiciones de isquemia/reperfusión, reduciendo hasta diez veces las dosis equipotentes necesarias para lograr protección celular, lo que se traduce en un menor riesgo de efectos adversos (Islas-Cortez et al., 2024).

Asimismo, investigaciones previas han reportado que la DDS en combinación con fenobarbital o diazepam atenúa las convulsiones inducidas por ácido kaínico, disminuye la lipoperoxidación y mejora la viabilidad neuronal (Díaz-Ruiz et al., 2013; 2022). En concordancia, en nuestro estudio encontramos que las combinaciones

de 4.22 mg/kg de DDS + 2.5 mg/kg de CBD y 7.5 mg/kg de DDS + 3.56 mg/kg de CBD redujeron la lipoperoxidación, indicando un efecto antioxidante que protege las membranas celulares. Asimismo, la DDS disminuye la liberación de Ca^{2+} inducida por la excitotoxicidad, lo que inhibe la activación de la vía intrínseca de la apoptosis medido por el calcio que se libera de la mitocondria. La DDS al ser un inhibidor parcial del receptor NMDA, regula la excitotoxicidad y disminuye la sobre excitación de las neuronas evitando que estas se dañen. Al regular la excitabilidad neuronal, reduce la propagación de potenciales de acción aberrantes, incluso mejora la actividad enzimática antioxidante, disminuyendo el daño oxidante y dadas sus propiedades inmunomoduladoras, evita la activación glial y la producción de citoquinas proinflamatorias (Díaz-Ruiz et al., 2008, 2011).

Mientras que el CBD actúa sobre múltiples blancos, incluyendo receptores CB1/CB2, TRPV1, GPR55 y PPAR γ , inhibiendo la excitotoxicidad glutamatérgica y modulando la respuesta inflamatoria (Borowicz-Reutt et al., 2024; Ibeas Bih et al., 2015; Jîtcă et al., 2023). Es importante mencionar que los cannabinoides se caracterizan por tener una curva de dosis-respuesta en forma de campana, sugiriendo que la dosis es muy importante en su acción y eficacia, a concentraciones altas pueden generar efectos neurotóxicos, ya que la señalización del receptor acoplado a proteína G huérfano se puede ver alterada, ocasionando muerte celular por excitotoxicidad (Lorigados et. al., 2013). El desbalance en la homeostasis del calcio es un mecanismo central en la epilepsia. El exceso de Ca^{2+} intracelular activa cascadas neurotóxicas, aumentando la excitabilidad neuronal y promoviendo la muerte celular, por un lado, el CBD bloquea los canales de calcio voltaje- dependientes (VGCCs tipo T), reduciendo la entrada excesiva de Ca^{2+} , antagonizando al receptor GPR55, reduciendo la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y modulando al receptor TRPV1, evitando la activación exacerbada de la señalización del calcio. Otro aspecto relevante a considerar es el papel de la glicoproteína P (P-gp) en la epilepsia farmacorresistente. Esta proteína transportadora, expresada en la barrera hematoencefálica, neuronas, astrocitos y cardiomiocitos, participa en la extrusión de múltiples fármacos, limitando su concentración intracerebral. Su sobreexpresión se asocia con incremento del

potencial de despolarización de membrana y mayor excitabilidad neuronal, lo que dificulta la acción terapéutica de diversos antiepilépticos. Aunque no todos los fármacos anticonvulsivos son sustratos de P-gp, se ha descrito que el CBD puede interactuar con estos transportadores y modular su expresión, lo que sugiere un posible papel en el control de la farmacorresistencia, sin embargo, estrategias basadas en inhibidores directos de P-gp han mostrado limitaciones clínicas debido a efectos adversos. (Pérez et al., 2021).

Con respecto a los niveles de GSH medido en el hipocampo observamos que la dosis combinada de 13.64 mg/kg de DDS y 6.32 mg/kg de CBD promueven mecanismos antioxidantes que llevan al incremento del GSH cuando ambos compuestos se administran en dosis altas. Los resultados sugieren que tanto la DDS como el CBD en combinación tienen efectos antioxidantes que llevan al incremento en los niveles de glutatión reducido en ratas con crisis convulsivas inducidas por PTZ, esta actividad antioxidante puede ayudar a proteger las células neuronales del daño oxidante asociado con las convulsiones. En nuestro modelo, el incremento de GSH en el hipocampo sugiere que ambos compuestos refuerzan la capacidad antioxidante endógena frente al estrés oxidativo inducido por el PTZ. Dado que el GSH es la defensa central contra ROS y un regulador clave de la homeostasis redox, su aumento podría explicar la menor lipoperoxidación y la reducción en la activación de caspasas observada. Estos hallazgos respaldan la idea de que el CBD y la DDS ejercen un efecto neuroprotector no solo mediante la modulación de la excitotoxicidad glutamatérgica, sino también a través de la preservación del sistema antioxidante dependiente de GSH, lo que contribuye a la supervivencia neuronal.

Para las caspasas, observamos que la actividad de la caspasa 3 se redujo significativamente con la administración individual de DDS (12.5 mg/kg) y con CBD a dosis de 10 y 20 mg/kg, lo que indica que ambos fármacos poseen capacidad para modular la vía final de apoptosis. Sin embargo, los efectos más consistentes se observaron en las combinaciones de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD y 7.5 mg/kg de DDS + 3.56 mg/kg de CBD, donde la inhibición de caspasa 3 fue mayor que en los tratamientos individuales, sugiriendo un efecto complementario en la

reducción de la apoptosis neuronal. En cuanto a la caspasa 8, asociada a la vía extrínseca de apoptosis (mediada por receptores de muerte), las dosis individuales de DDS y CBD no mostraron efectos significativos respecto al grupo control. No obstante, la combinación de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD sí presentó una disminución significativa, lo que sugiere que el efecto conjunto de ambos compuestos puede modular receptores de membrana o señales extracelulares proapoptóticas que no se ven alteradas de manera individual.

Respecto a la caspasa 9, un marcador clave de la vía intrínseca mitocondrial, la DDS a dosis de 12.5 y 25 mg/kg mostró un efecto inhibitorio importante, consistente con reportes previos que describen su capacidad para atenuar procesos excitotóxicos mediados por glutamato, particularmente por la inhibición de receptores AMPA y kainato (Ríos et al., 2015). Por su parte, el CBD no mostró efectos individuales en esta caspasa, aunque en combinación (4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD) se observó una reducción significativa, lo que refuerza la idea de que el CBD potencia la acción mitocondrial protectora de la DDS.

Nuestros hallazgos en conjunto demuestran que la combinación CBD+DDS mejora el equilibrio excitatorio-inhibitorio, reduce la activación de caspasas (8, 9 y 3) y protege a las neuronas del daño oxidativo y de la apoptosis. Considero que nuevamente se comprueba que la DDS actúa como antagonista de receptores glutamatérgicos (AMPA/kainato), reduciendo la excitotoxicidad inducida por el exceso de Ca^{2+} intracelular, lo que previene la activación de caspasa 9 y de la cascada apoptótica mitocondrial (Ríos et al., 2015)., aunado a las propiedades antioxidantes, y el CBD tiene participación en la modulación de la excitabilidad neuronal, mediante múltiples blancos: antagonismo de GPR55, desensibilización de TRPV1, inhibición de canales de Ca^{2+} tipo T y de Na^{+} dependientes de voltaje, así como aumento de adenosina extracelular (Zavala-Tecuapetla et al., 2022). Estas acciones limitan la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y estabilizan el potencial de membrana, reduciendo indirectamente la activación de caspasas. Adicionalmente, su capacidad para incrementar los niveles de anandamida y actuar sobre PPAR γ refuerza su perfil antiinflamatorio y antioxidante. El efecto aditivo encontrado indica

que se requieren dosis menores para lograr efectos terapéuticos, lo que podría traducirse en menor riesgo de efectos adversos y menores costos en comparación con monoterapias a dosis altas.

Los resultados obtenidos con la tinción de Fluoro-Jade B, un marcador específico de neurodegeneración, mostraron un incremento en la fluorescencia en los grupos tratados únicamente con PTZ, lo cual es consistente con un aumento en la degeneración neuronal inducida por la excitotoxicidad glutamatérgica. La observación directa al microscopio confirmó que a mayor fluorescencia, menor neuroprotección, ya que esta técnica marca de manera específica a las neuronas en proceso de degeneración. En contraste, en las combinaciones de DDS+CBD, particularmente en la dosis 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD, se observó una reducción significativa en el número de células FJB+, lo que sugiere un efecto neuroprotector robusto de la combinación frente al daño neuronal inducido por PTZ. El CBD, al modular receptores CB1, TRPV1 y GPR55, así como al estabilizar el metabolismo redox y reducir la liberación excesiva de glutamato, contribuye a mitigar la excitotoxicidad y el estrés oxidante. Por su parte, la DDS participa como antagonista de receptores glutamatérgicos tipo AMPA/kainato y como modulador de procesos Ca^{2+} dependientes, además de ejercer un efecto antioxidante directo reduciendo especies reactivas de oxígeno. La convergencia de ambos mecanismos explicaría la reducción en degeneración neuronal detectada por FJB.

De manera complementaria, la tinción de violeta de cresilo (Nissl) permitió evaluar la viabilidad neuronal y la integridad del hipocampo. Los resultados graficados mostraron que, si bien en algunos grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en el hipocampo izquierdo sí se registró un aumento en la viabilidad celular en las dosis 2.37 mg/kg de DDS + 1.12 mg/kg de CBD y 13.64 mg/kg de DDS + 6.32 mg/kg de CBD, comparado con el grupo vehículo. La observación microscópica respaldó esta interpretación, ya que se distinguió un mayor número de neuronas con cuerpos celulares íntegros y mejor organización de las capas piramidales, en comparación con el daño evidente del grupo tratado únicamente con PTZ. La interpretación conjunta de ambas técnicas

refuerza la idea de que el tratamiento combinado de DDS y CBD reduce el daño neuronal (Fluoro-Jade B) y favorece la supervivencia neuronal (violeta de cresilo). Mientras que la FJB confirma la disminución de células degeneradas, el Nissl aporta evidencia de que se conserva la organización y viabilidad neuronal, lo que sugiere un efecto neuroprotector integral. Estos resultados refuerzan la idea de que la combinación de compuestos con propiedades anticonvulsivas y antioxidantes, como CBD y DDS, representa una estrategia terapéutica para el manejo de crisis convulsivas y potencialmente otras patologías neurológicas asociadas a excitotoxicidad, estrés oxidativo y farmacoresistencia.

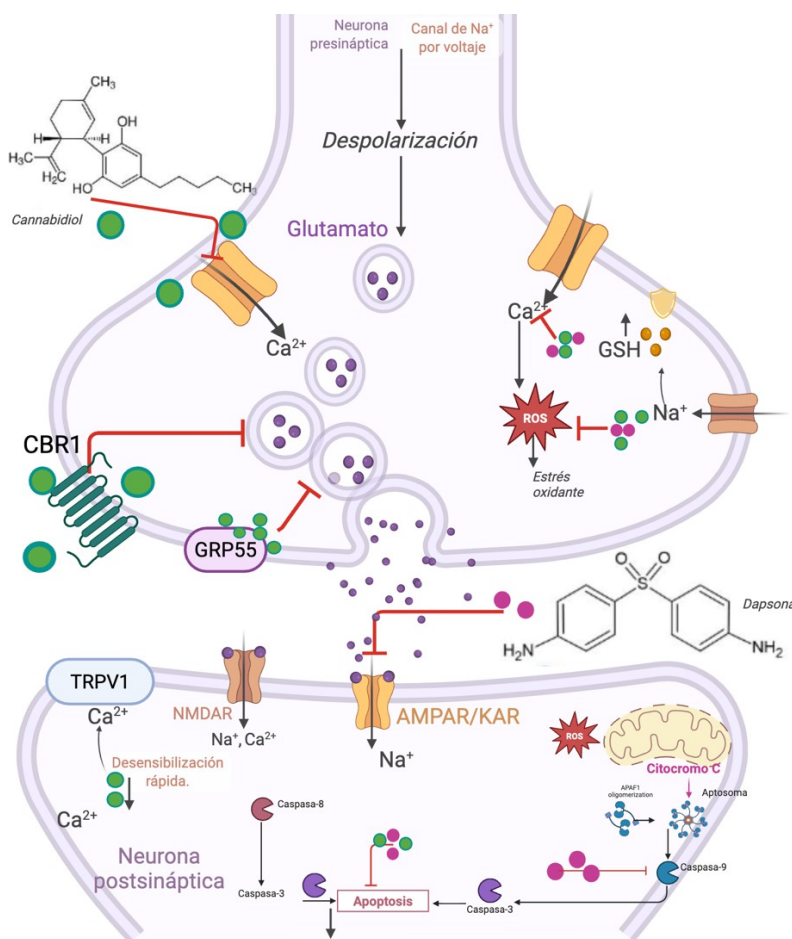


Figura 38. Efecto aditivo de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducido por PTZ. El PTZ favorece la excitotoxicidad glutamatérgica al antagonizar los receptores GABAAA, promoviendo la liberación excesiva de glutamato y la activación postsináptica de receptores NMDA y AMPA/KAR, con incremento de la entrada de Na^+ y Ca^{2+} , estrés oxidativo y activación de la vía apoptótica mediada por caspasas. El CBD actúa sobre CB1R regulando el glutamato en célula pre-sináptica, mientras que la DDS actúa a nivel post-sináptico, regulando el exceso de Ca^{2+} y EROS, además de modular la activación de caspasas. En conjunto, ambos fármacos atenuan excitotoxicidad y apoptosis, promoviendo efectos antioxidantes y neuroprotectores.

11. CONCLUSIONES

- El análisis isobolográfico demostró que la interacción entre dapsona (DDS) y cannabidiol (CBD) en el modelo de crisis convulsivas inducidas por PTZ fue de tipo aditivo.
- El tratamiento combinado de DDS y CBD redujo significativamente la peroxidación de lípidos, particularmente con las dosis de 4.22 mg/kg de DDS + 2.5 mg/kg de CBD y 7.5 mg/kg de DDS + 3.56 mg/kg de CBD, identificándose estas combinaciones como las más efectivas con acción antioxidante.
- La combinación de 13.64 mg/kg de DDS + 6.32 mg/kg de CBD resultó la más eficaz para incrementar los niveles de glutatión reducido (GSH).
- La actividad de la caspasa-3 se redujo de manera significativa con dosis de 12.5 mg/kg de DDS y con 10 y 20 mg/kg de CBD, lo cual indica disminución de la apoptosis. Dicho efecto también se observó con la administración conjunta de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD y 7.5 mg/kg de DDS + 3.56 mg/kg de CBD.
- La combinación de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD disminuyó la actividad de la caspasa-8 en comparación con el grupo control, evidenciando un efecto protector de tipo antiapoptótico.
- La actividad de la caspasa-9 se redujo de manera significativa con DDS a dosis de 12.5 y 25 mg/kg, mientras que el CBD por sí solo no mostró efecto. Sin embargo, la combinación de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD produjo una disminución, lo que sugiere un efecto protector en este modelo experimental.
- Se demostró que la combinación de 4.22 mg/kg de DDS + 2 mg/kg de CBD tuvo un efecto neuroprotector al reducir significativamente la degeneración neuronal en comparación con el grupo control. En contraste, la combinación de 2.37 mg/kg de DDS + 0.63 mg/kg de CBD incrementó la degeneración neuronal, lo que indica un posible efecto deletéreo dependiente de la dosis.
- La combinación de CBD y DDS demostró preservación en el tejido.

12. REFERENCIAS

1. Abood W, Bandyopadhyay S. Postictal Seizure State. [Updated 2023 Jul 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526004/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526004/>
2. Ahmad, R. A., & Rogers, H. J. (1980). Pharmacokinetics and protein binding interactions of dapsone and pyrimethamine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 10(5), 519–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1980.tb01798.x>
3. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200–214. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0102-7>
4. Anthonymuthu, T. S., Kenny, E. M., & Bayır, H. (2016). Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Research*, 1640(Pt A), 57–76. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.006>
5. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014,360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
6. Bains, J. S., & Shaw, C. A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25(3), 335–358. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00045-3)
7. Barclay, J. A., Ziemba, S. E., & Ibrahim, R. B. (2011). Dapsone-induced methemoglobinemia: A primer for clinicians. *Annals of Pharmacotherapy*, 45(9), 1103–1115. <https://doi.org/10.1345/aph.1q139>
8. Barr, J. (2010). A short history of dapsone, or an alternative model of drug development. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 66(4), 425–467. <https://doi.org/10.1093/jhmas/jrq068>

9. Beck, H., & Yaari, Y. (2008). Plasticity of intrinsic neuronal properties in epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 21(2), 182–186.
10. Belinskaia, D. A., Voronina, P. A., Shmurak, V. I., Vovk, M. A., Batalova, A. A., Jenkins, R. O., & Goncharov, N. V. (2020). The Universal Soldier: Enzymatic and Non- Enzymatic Antioxidant Functions of Serum Albumin. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(10), 966. <https://doi.org/10.3390/antiox9100966>
11. Beniczky S, Trinka E, Wirrell E, Abdulla F, Al Baradie R, Alonso Vanegas M, Cross JH (2025). Updated classification of epileptic seizures: position paper of the international league against epilepsy..*Epilepsia*, 66(6), 1804-1823. <https://dx.doi.org/10.1111/epi.18338>
12. Blauwblomme, T. J. (2014). Mechanisms of ictogenesis. In *Modern Concepts of Focal Epileptic Networks* (pp. 155–185). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418693-4.00007-8>
13. Blauwblomme, T., Jiruska, P., & Huberfeld, G. (2014). Mechanisms of Ictogenesis. *Modern Concepts of Focal Epileptic Networks*, 155–185. doi:10.1016/b978-0-12-418693-4.00007-8
14. Borowicz-Reutt, K., Czernia, J., & Krawczyk, M. (2024). CBD in the Treatment of Epilepsy. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(9), 1981. <https://doi.org/10.3390/molecules29091981>
15. Bosak, M., Słowik, A., Kacorzyk, R., & Turaj, W. (2019). Implementation of the new ILAE classification of epilepsies into clinical practice - A cohort study. *Epilepsy & behavior : E&B*, 96, 28–32. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.yebeh.2019.03.045>
16. Breedlove, S. M., Watson, N. V., & Rosenzweig, M. R. (2013). Neurons, neurotransmission and communication. In *Biological psychology: An introduction to behavioral, cognitive, and clinical neuroscience* (7th ed., pp. 65–98). Sinauer Associates. https://uk.sagepub.com/sites/default/files/upm-assets/61038_book_item_61038.pdf

17. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Jr., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142, w13659. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
18. Britch, S., Babalonis, S., & Walsh, S. (2021). Cannabidiol: Pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology*, 238(1), 9–28. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05712-8>
19. Brunton, L., Lazo, S., & Parker, L. (2019). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (13^a ed.). McGraw-Hill
20. Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
21. Caire MJ, Reddy V, Varacallo MA. Physiology, Synapse. [Updated 2023 Mar 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/>
22. Chakraborty, S., Parayil, R., Mishra, S., Nongthomba, U., & Clement, J. P. (2022). Epilepsy Characteristics in Neurodevelopmental Disorders: Research from Patient Cohorts and Animal Models Focusing on Autism Spectrum Disorder. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10807. <https://doi.org/10.3390/ijms231810807>
23. Chauhan, P., Philip, S. E., Chauhan, G., et al. (2022). The anatomical basis of seizures. In S. J. Czuczwar (Ed.), *Epilepsy* [Internet]. Brisbane, AU: Exon Publications. Chapter 2. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580614/>
<https://doi.org/10.36255/exon-publications-epilepsy-anatomical-basis>
24. Chen, T. S., Huang, T. H., Lai, M. C., & Huang, C. W. (2023). The role of glutamate receptors in epilepsy. *Biomedicines*, 11(3), 783. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030783>
25. Chen, I., & Lui, F. (2024). Neuroanatomy, neuron action potential. In *StatPearls* [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546639/>

26. Cherubini, E., Miles, R., eds. (2015). The CA3 Region of the Hippocampus: How is it? What is it for? How Does it Do it?. Lausanne: Frontiers Media. doi: 10.3389/978-2-88919-631-9
27. Chesney, E., Oliver, D., Green, A., Sovi, S., Wilson, J., Englund, A., Freeman, T. P., & McGuire, P. (2020). Adverse effects of cannabidiol: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 45(11), 1799–1806. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0667-2>
28. Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 48(6), 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
29. Conrad, M., Kagan, V. E., Bayır, H., Pagnussat, G. C., Head, B., Traber, M. G., & Stockwell, B. R. (2018). Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes & Development*, 32(9–10), 602–619. <https://doi.org/10.1101/gad.314674.118>
30. Cossart, R., Bernard, C., & Ben-Ari, Y. (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: Multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends in Neurosciences*, 28(2), 108-115.
31. Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., Scheffer, I. E., Thiele, E. A., & Wright, S. (2017). Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 376(21), 2011–2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611618>
32. Devinsky, O., Thiele, E. A., Wright, S., Checketts, D., Morrison, G., Dunayevich, E., & Knappertz, V. (2020). Cannabidiol efficacy independent of clobazam: Meta-analysis of four randomized controlled trials. *Acta Neurologica Scandinavica*, 142(6), 531–540. <https://doi.org/10.1111/ane.13305>
33. Dhir, A. (2012). Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Current Protocols in Neuroscience*, Chapter 9, Unit9.37. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0937s58>

34. Díaz-Ruiz, A., Zavala, C., Montes, S., Ortiz-Plata, A., Salgado-Ceballos, H., Orozco-Suarez, S., 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. doi:10.1002/jnr.21775
35. Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature chemical biology*, 7(8), 504–511. <https://doi.org/10.1038/nchembio.607>
36. Díaz-Ruiz, A., Zavala, C., Montes, S., Ortiz-Plata, A., & Salgado-Ceballos, H. (2008). Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic 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>
37. Díaz-Ruiz, A., Nader-Kawachi, J., Calderón-Estrella, F., Mata-Bermúdez, A., Álvarez-Mejía, L., & Ríos, C. (2022). Dapsone, more than an effective neuro and cytoprotective drug. *Current Neuropharmacology*, 20(1), 194–210. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210617143108>
38. Díaz-Ruiz, A., Roldan-Valadez, E., Ortiz-Plata, A., Mondragón-Lozano, R., Heras- Romero, Y., Méndez-Armenta, M., & Ríos, C. (2016). Dapsone improves functional deficit and diminishes brain damage evaluated by 3-Tesla magnetic resonance imaging after transient cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Brain Research*, 1642, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.009>
39. Díaz-Ruiz, A., Salgado-Ceballos, H., Montes, S., Guízar-Sahagún, G., Gelista- Herrera, N., Méndez-Armenta, M., Ríos, C. (2011). Delayed administration of dapsone protects from tissue damage and improves recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 89(3), 373–380. <https://doi.org/10.1002/jnr.22555>
40. Díaz-Ruiz, A., Ríos, C., Duarte, I., Correa, D., Guízar-Sahagún, G., Grijalva, I., & Ibarra, A. (1999). Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats. *Neuroscience Letters*, 266(1), 61–64.

41. Díaz-Ruiz, A., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruiz, C., Garduño, C., Santander, I., Ruiz, A., & Ríos, C. (2015). Phenobarbital administered alone or in combination with dapson inhibits apoptosis and improves motor function after spinal cord injury in rats. *Archivos De Neurociencias*, 20(4), 240–246. <https://doi.org/10.31157/an.v20i4.98>
42. Do Val-da Silva, R. A., Peixoto-Santos, J. E., Kandratavicius, L., De Ross, J. B., Esteves, I., De Martinis, B. S., Alves, M. N., Scandiuizzi, R. C., Hallak, J. E., Zuardi, A. W., Crippa, J. A., & Leite, J. P. (2017). Protective Effects of Cannabidiol against Seizures and Neuronal Death in a Rat Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Frontiers in pharmacology*, 8, 131. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00131>
43. 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>
44. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
45. Engel J., Jr (2001). Classification of epileptic disorders. *Epilepsia*, 42(3), 316. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.t01-1-36500.x>
46. Epilepsy Foundation Australia (s.f.). Seizure phases. Recuperado el 12 de agosto de 2025, de <https://epilepsyfoundation.org.au/understanding-epilepsy/seizures/seizure-phases/>
47. Erkeç, Ö., & Arihan, O. (2015). Pentylentetrazole Kindling Epilepsy Model. *Journal of the Turkish Epilepsi Society*, 21(1), 6–12. <https://doi.org/10.5505/EPILEPSI.2015.0810>
48. Espinosa-Jovel, C. (2020). Cannabinoides en epilepsia: eficacia clínica y aspectos farmacológicos. *Neurología*. doi:10.1016/j.nrl.2020.02.005

49. Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy—Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Seminars in Neurology*. doi:10.1055/s-0040-1718719,
50. Friedman, D., & Sirven, J. I. (2017). Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: Ancient times to the 1980s. *Epilepsy & Behavior*, 70, 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.033>
51. García-Martínez, M., Quiroz, F., Véliz, I., Álvarez, M., & López, M. (2019). Microglía y neurodegeneración en el núcleo talámico dorsomedial de la rata infante después del estado epiléptico. *Archivos de Neurociencias (Méx)*, 23(4), 6.
52. Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
53. Ghaoui, N., Hanna, E., Abbas, O., Kibbi, A. G., & Kurban, M. (2020). Update on the use of dapsone in dermatology. *International journal of dermatology*, 59(7), 787–795. <https://doi.org/10.1111/ijd.14761>
54. Gilbert, M., & Goodman, J. H. (2006). Chemical kindling. In *Modelos de convulsiones y epilepsia* (pp. 379–393). <https://doi.org/10.1016/b978-012088554-1/50033-5>
55. Grider MH, Jessu R, Kabir R. Physiology, Action Potential. [Updated 2023 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538143/>
56. Guan, Z., Liu, Q., Wang, Y., Xiao, F., & Zhao, G. (2024). Relationship between tight junctions of the BBB and astrocyte connective function in epilepsy: Albumin and astrocyte activation. *Medicine Plus*, 1(3), 100047. <https://doi.org/10.1016/j.medp.2024.100047>
57. Han, J., Wang, Y., Wei, P., Lu, D., & Shan, Y. (2024). Unveiling the hidden connection: The blood-brain barrier's role in epilepsy. *Frontiers in Neurology*. 1413023.<https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2024.1413023>

58. Hansen, S. L., Sperling, B. B., & Sánchez, C. (2004). Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 28(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.026>
59. Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
60. Ishida, S., Hamada, K., Yagi, K., & Seino, M. (1992). Comparing the anticonvulsive effects of dapsone on amygdala-kindled seizures and hippocampal-kindled seizures in rats. *Acta neurologica Scandinavica*, 85(2), 132–135. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1992.tb04012.x>
61. Islas-Cortez, M., Ríos, C., Manzanares, J., Díaz-Ruiz, A., & Pérez-Pastén-Borja, R. (2024). Isobolographic analysis of the cytoprotective effect of dapsone and cannabidiol alone or in combination upon oxygen–glucose deprivation/reoxygenation model in SH-SY5Y cells. *Antioxidants*, 13(6), 705. <https://doi.org/10.3390/antiox13060705>
62. Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 295(4), C849–C868. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>
63. Kandratavicius, L., Balista, P. A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R. N., Umeoka, E. H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L. S., & Leite, J. P. (2014). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 10, 1693–1705. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>
64. Kaculini, C. M., Tate-Looney, A. J., & Seifi, A. (2021). The History of Epilepsy: From Ancient Mystery to Modern Misconception. *Cureus*, 13(3), e13953. <https://doi.org/10.7759/cureus.13953>
65. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principles of Neural Science* (4th ed.). McGraw-Hill.
66. Lanerolle, N. C., & Lee, T.-S. (2009). Pyramidal cells: Receptor subtype localization in CA3 pyramidal cells in epileptic brain. In P. A. Schwartzkroin

- (Ed.), *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* (pp. 1283–1288). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373961-2.00062-X>
67. Leoung, G. S., Mills, J., Hopewell, P. C., Hughes, W., & Wofsy, C. (1986). Dapsone-trimethoprim for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of internal medicine*, 105(1), 45–48. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-105-1-45>
 68. Li, Y., Mu, Y., & Gage, F. H. (2009). Chapter 5 Development of Neural Circuits in the Adult Hippocampus. *Development of Neural Circuitry*, 149–174. doi:10.1016/s0070-2153(09)01205-8
 69. Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
 70. Loch-Neckel, G., & Koepp, J. (2010). The blood-brain barrier and drug delivery in the central nervous system. *Revista de Neurología*, 51(3), 165–174.
 71. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. doi:10.1016/S0021-9258(19)52451-6
 72. Lukasiuk, K. (2014). Epileptogenesis. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (pp. 196–199). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00297-9>
 73. Löscher, W., & White, H. S. (2023). Animal Models of Drug-Resistant Epilepsy as Tools for Deciphering the Cellular and Molecular Mechanisms of Pharmacoresistance and Discovering More Effective Treatments. *Cells*, 12(9), 1233. <https://doi.org/10.3390/cells12091233>
 74. Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & van Luijtelaar, G. (2009). A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*, 98(5), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.005>

75. Magiorkinis, E., Diamantis, A., Sidiropoulou, K., & Panteliadis, C. (2014). Highlights in the History of Epilepsy: The Last 200 Years. *Epilepsy Research and Treatment*, 1– doi: 10.1155/2014/582039
76. Mahale, A. K. (2020). Dapsone prolong delayed excitotoxic neuronal cell death by interacting with proapoptotic/survival signaling proteins. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104848
77. McCandless, D. (2012). *Epilepsy: Animal and human correlation*. Chicago, USA.: Springer.
78. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78. doi:10.1016/j.advms.2017.05.005
79. Nam T. G. (2011). Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological research*, 27(1), 1–6. <https://doi.org/10.5487/TR.2011.27.1.001>
80. Naseer, M. I., Shupeng, L., & Kim, M. O. (2009). Maternal epileptic seizure induced by pentylenetetrazol: apoptotic neurodegeneration and decreased GABAB1 receptor expression in prenatal rat brain. *Molecular brain*, 2, 20. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-20>
81. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2025, marzo). Brain basics: Know your brain. National Institutes of Health. <https://www.ninds.nih.gov/health-information/public-education/brain-basics/brain-basics-know-your-brain>
82. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (s.f.). Brain Basics: The Life and Death of a Neuron [Folleto]. NIH Brain Basics. Recuperado el 12 de agosto de 2025, de <https://www.ninds.nih.gov/health-information/public-education/brain-basics/brain-basics-life-and-death-neuron>
83. Nikolaos Patsoukis; George Zervoudakis; Nikolaos T Panagopoulos; Christos D Georgiou; Fevronia Angelatou; Nikolaos A Matsokis (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. 357(2), 0–86. doi:10.1016/j.neulet.2003.10.080

84. Patel, D. T. (2019). Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(5), 282–297. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0126-4>
85. Patel, P., & Moshé, S. L. (2020). The evolution of the concepts of seizures and epilepsy: What's in a name?. *Epilepsia open*, 5(1), 22–35. <https://doi.org/10.1002/epi4.12375>
86. Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
87. Pearson-Smith, J. N., & Patel, M. (2017). Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2365. <https://doi.org/10.3390/ijms18112365>
88. Pearson-Smith, J. N., & Patel, M. (2017). Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2365. <https://doi.org/10.3390/ijms18112365>
89. Peng Chen, Fuchao Chen, Benhong Zhou. Understanding the Role of Glia-Neuron Communication in the Pathophysiology of Epilepsy: A Review. *J. Integr. Neurosci.* 2022, 21(4), 102. <https://doi.org/10.31083/j.jin2104102>
90. Pérez-Pérez, D; Frías-Soria, L; Rocha, L. (2021). Drug-resistant epilepsy: From multiple hypotheses to an integral explanation using preclinical resources., *Epilepsy & Behavior*, <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.07.031>
91. Pieters, F. A., & Zuidema, J. (1986). The pharmacokinetics of dapsone after oral administration to healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 22(4), 491–494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1986.tb02924.x>
92. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

93. Porter, R. J., Dhir, A., Macdonald, R. L., & Rogawski, M. A. (2012). Mechanisms of action of antiseizure drugs. *Handbook of clinical neurology*, 108, 663–681. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52899-5.00021-6>
94. Postnikova, T. Y., Trofimova, A. M., Zakharova, M. V., Nosova, O. I., Brazhe, A. R., Korzhevskii, D. E., Semyanov, A. V., & Zaitsev, A. V. (2022). Delayed impairment of hippocampal synaptic plasticity after pentylenetetrazole-induced seizures in young rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13461. <https://doi.org/10.3390/ijms232113461>
95. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236.
96. Raol, Y. H., & Kayal, B. (2012). Experimental models of seizures and epilepsies. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 105, 57–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00003-2>
97. Rocha, L., Frías Soria, C., Ortiz, J. G., Auzmendi, J. A., & Lazarowski, A. (2020). Is cannabidiol a drug acting on unconventional targets to control drug-resistant epilepsy. *Epilepsia Open*, 5(1), 36–49. <https://doi.org/10.1002/epi4.12376>
98. Rodríguez, E., Méndez-Armenta, M., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Barroso-Moguel, R., Rodríguez, F., Ríos, C., & Santamaría, A. (1999). Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology*, 136(2–3), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00116-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00116-X)
99. Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553–564. <https://doi.org/10.1038/nrn1430>
100. Rogawski, M. A., Löscher, W., & Rho, J. M. (2016). Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(5), a022780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022780>

101. Rosenberg, E. C., Tison, R. M., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and epilepsy. *Neurotherapeutics*, 12(4), 747–768. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0375-5>
102. Ríos, C., Orozco-Suarez, S., Salgado-Ceballos, H. (2015). Anti-apoptotic effects of dapsone after spinal cord injury in rats. *Neurochemistry Research*, 40(7), 1243– 1251. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1588-z>
103. Ríos, C., Nader-Kawachi, J., Rodriguez-Payán, A. J., & Nava-Ruiz, C. (2004). Neuroprotective effect of dapsone in an occlusive model of focal ischemia in rats. *Brain research*, 999(2), 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.040>
104. Ríos, C., Farfán, A., Manjarrez, J., Franco, P., Méndez, M., Nava, C., Caballero, S., Ruiz, A., Barón, V., Díaz, A. (2019). Efficacy of dapsone administered alone or in combination with diazepam to inhibit status epilepticus in rats. *Brain Research*, 1701, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.017>
105. Samokhina, E., & Samokhin, A. (2018). Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *International Journal of Neuroscience*, 128(11), 1086–1096. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/00207454.2018.1481064](https://doi.org/pbidi.unam.mx:2443/10.1080/00207454.2018.1481064)
106. Santamaría, A., Ordaz-Moreno, J., Rubio-Osornio, M., Solís-Hernández, F., & Ríos, C. (1997). Neuroprotective effect of dapsone against quinolinate- and kainate- induced striatal neurotoxicities in rats. *Pharmacology & Toxicology*, 81(6), 271–275.
107. Sarkisian, M. R. (2001). Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy & Behavior*, 2(3), 201–216. <https://doi.org/10.1006/ebbeh.2001.0193>
108. Senn, L., Cannazza, G., & Biagini, G. (2020). Receptors and channels possibly mediating the effects of phytocannabinoids on seizures and epilepsy. *Pharmaceuticals*, 13(8), 174. <https://doi.org/10.3390/ph13080174>

109. Shimada, T., & Yamagata, K. (2018). Pentylenetetrazole-induced kindling mouse model. *Journal of Visualized Experiments*, 132. <https://doi.org/10.3791/56573>
110. Sienes Bailo, P., Llorente Martín, E., Calmarza, P., Montolio Breva, S., Bravo Gómez, A., Pozo Giráldez, A., Sánchez-Pascuala Callau, J. J., Vaquer Santamaría, J. M., Dayaldasani Khialani, A., Cerdá Micó, C., Camps Andreu, J., Sáez Tormo, G., & Fort Gallifa, I. (2022). The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases and potential antioxidant therapies. *Advances in laboratory medicine*, 3(4), 342–360. <https://doi.org/10.1515/almed-2022-0111>
111. Silvestro, S. M. (2019). Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: Efficacy and security in clinical trials. *Molecules*, 24(8), 1459. <https://doi.org/10.3390/molecules24081459>
112. Singh, T., Mishra, A., & Goel, R. K. (2021). PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: Relevance and reliability. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1573–1590. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00823-3>
113. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
114. Sokolova, T. V., Zabrodskaya, Y. M., Litovchenko, A. V., Paramonova, N. M., Kasumov, V. R., Kravtsova, S. V., Skiteva, E. N., Sitovskaya, D. A., & Bazhanova, E. D. (2022). Relationship between Neuroglial Apoptosis and Neuroinflammation in the Epileptic Focus of the Brain and in the Blood of Patients with Drug-Resistant Epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12561. <https://doi.org/10.3390/ijms232012561>
115. Spencer, S. S. (2002). Neural networks in human epilepsy: Evidence of and implications for treatment. *Epilepsia*, 43(3), 219–227. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2002.33101.x>
116. Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid

- peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
117. Sumadewi, K. T., Harkitasari, S., & Tjandra, D. C. (2023). Biomolecular mechanisms of epileptic seizures and epilepsy: A review. *Acta Epileptologica*, 5(28). <https://doi.org/10.1186/s42494-023-00137-0>
 118. Sumadewi, K.T., Harkitasari, S. & Tjandra, D.C. Biomolecular mechanisms of epileptic seizures and epilepsy: a review. *Acta Epileptologica* 5, 28 (2023). <https://doi.org/10.1186/s42494-023-00137-0>
 119. Tabboon, P., Pongjanyakul, T., Limpongsa, E., & Jaipakdee, N. (2022). Mucosal delivery of cannabidiol: Influence of vehicles and enhancers. *Pharmaceutics*, 14(8), 1687. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081687>
 120. Tallarida, R. J. (2007). Interactions between drugs and occupied receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(1), 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.08.002>
 121. Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: A neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 520–543. <https://doi.org/10.1111/nan.12150>
 122. Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*, 281(5381), 1312–1316. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>
 123. Triggs, W. J., & Willmore, L. J. (1984). In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *Journal of Neurochemistry*, 42(4), 976–980. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12699.x>
 124. Tristán López, L. A. (2006). Estudio farmacocinético de cuatro nuevas formas farmacéuticas de Dapsona: solución oral, suspensión e inyectable parenteral (formulación A y B) en ratas Wistar macho adultas (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/2234>

125. Valdés-Galván, R. E., González-Calderón, G., & Castro-Martínez, E. (2019). Epidemiología del descontrol de la epilepsia en un servicio de urgencias neurológicas. *Revista de Neurología*, 68(8), 321–325.
126. Van Vliet, E. A., Aronica, E., & Gorter, J. A. (2014). Role of blood–brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience*, 277, 455–473. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.030
127. Waxman, S. G. (2024). Organización fundamental del sistema nervioso. En S. G. Waxman (Ed.), *Neuroanatomía clínica* (30ª ed.). McGraw Hill Education.
128. Wolf, R., Matz, H., Orion, E., Tuzun, B., & Tuzun, Y. (2002). Dapsone. *Dermatology online journal*, 8(1), 2.
129. Zavala-Tecuapetla, C., Luna-Munguía, H., López-Meraz, M.-L., & Cuéllar-Herrera, M. (2022). Advances and challenges of cannabidiol as an anti-seizure strategy: Preclinical evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 16181. <https://doi.org/10.3390/ijms232416181>

13. ANEXOS: DE PRESENTACIÓN DE LOS AVANCES DEL PROYECTO



Neuroquímica de la epilepsia

Islas Díaz Diana, Ruiz Díaz Amairani, Díaz Ruiz Araceli, Moreno Rocha Alfonso, Mata Bermúdez Alfonso y Barón Flores Verónica.

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS".

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico que afecta a personas de todas las edades y se estiman que en todo el mundo existen 50 millones de pacientes con este padecimiento, lo que la convierte en uno de los trastornos neurológicos más comunes, es una enfermedad caracterizada por la presencia de recurrentes y espontáneas convulsiones, que se desarrollan como resultado de alteraciones en la función cerebral, causada por múltiples trastornos de etiologías variadas como son: daño cerebral o traumatismo durante el parto, síndromes y condiciones genéticas e infecciones o tumores cerebrales, es un padecimiento que puede tener consecuencias importante a largo plazo como muerte y degeneración neuronal así como alteraciones en las redes neuronales que se traducen en deficiencias cognitivas y psicológicas. Por otra parte, se sabe que la fisiopatología de la epilepsia es el resultado del desequilibrio entre neurotransmisores excitatorios e inhibitorios como son el glutamato y GABA respectivamente, siendo los neurotransmisores más comunes en el sistema nervioso central. A pesar de que existen fármacos antiepilépticos, casi el 30% de los pacientes generan resistencia a los tratamientos habituales por lo que, en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se ha propuesto al cannabidiol que ha demostrado disminuir la excitación neuronal y tener efecto neuroprotector, ansiolítico y antiinflamatorio. Además, existen evidencias del beneficio terapéutico de la dapsona como anticonvulsivo antioxidante y neuroprotector en pacientes con epilepsia fármaco resistente, infarto cerebral y hemorragia subaracnoidea. Con base en esto el tratamiento combinado podría ser una buena opción de tratamiento.

Referencias:

1. Do Canto, A; Donatti, A; Geraldís, J; Godoi, A; Da Rosa, D; Lopes, I. (2021). Neuroproteomics in Epilepsy: What Do We Know so Far?. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.
2. Cheung, K. A. K., Peiris, H., Wallace, G., Holland, O. J., & Mitchell, M. D. (2019). The Interplay between the Endocannabinoid System, Epilepsy and Cannabinoids. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6079.
3. Nader-Kawachi, J., Gongora-Rivera, F., Santos-Zambrano, J., Calzada, P., Ríos, C., (2007). Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: a pilot study. *Neurol. Res.* 29, 331–334.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco
Maestría y Doctorado en Ciencias Farmacéuticas

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

A Diana Islas Díaz, Amairani Ruiz Díaz, Araceli Díaz Ruiz,
Alfonso Moreno Rocha, Alfonso Mata Bermúdez, Verónica Barón Flores

Por haber presentado la INFOGRAFÍA titulada:
Neuroquímica de la Epilepsia

En el evento

PRIMERA SEMANA CON-CIENCIA EN LA UAM-XOCHIMILCO

Llevado a cabo los días 16, 17 y 18 de agosto
Ciudad de México, 18 de agosto de 2023



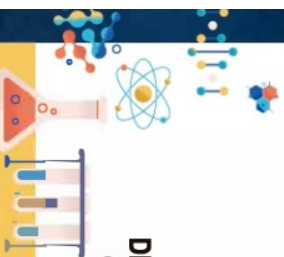
DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ
Coordinador de la Maestría y Doctorado
en Ciencias Farmacéuticas



DR. LUISA A. AYALA PÉREZ
Director de la División de Ciencias
Biológicas y de la Salud



DRA. BEATRIZ GODÍNEZ CHAPARRO
Presidente del comité Organizador



"EFECTO ANTICONVULSIVO DE CANNABIDIOL SOLO Y COMBINADO CON DAPSONA EN UN MODELO DE EPILEPSIA EN RATA"

Cartel de Investigación

División:
Ciencias Biológicas y de la Salud

Diana Islas¹, Araceli Díaz-Ruiz², Camilo Ríos³, Verónica Barón-Flores⁴, Amairani Ruiz⁵, Alfonso Mata¹

Maestría y Doctorado en Ciencias farmacéuticas¹, Neuroquímica², Neuroquímica³,
Neurofarmacología molecular⁴, Maestría y Doctorado en Ciencias farmacéuticas⁵,
AreaInvestigacion⁵

q.diana.islas@gmail.com¹, aradiar Ruiz@hotmail.com², camrios@yahoo.com.mx³,
vbaron@correo.xoc.uam.mx⁴, amaruiRdiaz09@hotmail.com, alfonsomata004@gmail.com⁵

Resumen

El presente proyecto propone como alternativa el tratamiento terapéutico de cannabidiol y dapsona solos o en combinación para el estudio de las propiedades anticonvulsivas, neuroprotectoras y antioxidantes en un modelo de epilepsia con pentilnetetrazol en rata, logrando establecer y caracterizar conductualmente un modelo de epilepsia, examinar el efecto antioxidante y evaluar marcadores de muerte celular por apoptosis. Se estandarizaron las crisis convulsivas tónico-clónica, y a través de análisis isobolográfico se determinaron las dosis de combinaciones que se probaron y las latencias de cada combinación no fue significativa respecto a cada fármaco por separado, sin embargo, en los estudios bioquímicos de peroxidación de lípidos los grupos tratados con dapsona y cannabidiol (4.22 mg/kg y 2 mg/kg respectivamente), presentan una disminución significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de animales sin tratamiento, por lo tanto, se sugiere que la administración es capaz de disminuir la peroxidación lipídica, la concentración de glutatión reducido por gramo de tejido produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) respecto a los animales sin tratamiento a la misma dosis. La actividad enzimática de caspasas se determinó con la caspasa 8 y caspasa 9 donde hay diferencia significativa en la dosis de la combinación dapsona y cannabidiol (4.22 mg/kg y 2 mg/kg), respectivamente, caspasa 3, mostró diferencia significativa a la misma dosis y a (7.5 mg/kg y 3.56 mg/kg), lo que nos podría indicar que hay efecto neuroprotector o antiapoptótico de la combinación concluyendo que la peroxidación de lípidos y glutatión reducido a la dosis de la combinación de (4.22 mg/kg y 2 mg/kg i.p.) sugiere actividad neuroprotectora, y la actividad de caspasas efectos antiapoptóticos y antioxidantes en el modelo desarrollado. Se continúa con estudio inmunohistoquímico para evaluar efectos neuroprotectores.

Palabras clave: Dapsona_Cannabidiol_Convulsiones_PTZ_Neuroprotección



**I CONGRESO
BIOMATERIALES Y MEDICINA REGENERATIVA
27 y 28 de Mayo del 2024**

El comité científico y organizador extiende la presente

CONSTANCIA

a

Diana Islas, Camilo Ríos, Araceli Díaz, Amairani Ruiz, Alfonso Mata.

Por su participación con el trabajo de investigación

**EFFECTO ANTICONVULSIVO DE CANNABIDIOL SOLO Y COMBINADO
CON DAPSONA EN UN MODELO DE EPILEPSIA EN RATA.**


Dr. Juan Morales Corona
Jefe del Depto de Física
UAM-Iztapalapa


Dra. Ana Laura Alvarez Mejia
Posdoctorante
CONAHCT-UAM


Dr. Rodrigo Mondragón Lozano
Catedrático
CONAHCT-IMSS



Title: Anticonvulsant effect of Cannabidiol alone or in combination with dapsone in epilepsy rat model.

Authors: *D. ISLAS DIAZ¹, C. RIOS², V. BARON-FLORES¹, A. RUIZ¹, M. ISLAS³, A. MATA-BERMUDEZ⁴, M. MENDEZ-ARMENTA⁵, A. DIAZ-RUIZ⁶;

¹Autonomous Metropolitan Univ., Mexico City, Mexico; ²Neurochemistry, Natl. Inst. Rehabil., Mexico City, Mexico; ³Dept. of Physiol., Natl. Polytechnic Inst., Mexico City, Mexico; ⁴Hlth. and Care Dept., Autonomous Metropolitan Univ., Mexico City, Mexico; ⁵Dept. Exptl. Neuropathology, Natl. Inst. Neurol Neurosurg., Mexico City, Mexico; ⁶Neurochemistry, Natl. Aut. Univ. of Mexico, INNN, Mexico City, Mexico

Abstract: Epilepsy is a condition affecting the central nervous system characterized by abnormal and recurrent brain activity, often leading to seizures, behavioral changes, or unusual sensations. The delicate balance between excitatory and inhibitory neurotransmitters is crucial for maintaining normal neuronal function. When there is an excessive release of glutamate, it stimulates NMDA receptors, causing an influx of calcium ions that disrupt cellular homeostasis. This imbalance triggers cytoplasmic enzyme activation and increases nitric oxide production, resulting in the generation of free radicals that damage DNA and ultimately lead to nerve cell death. In this study, an alternative treatment involving cannabidiol and dapsone, either alone or in combination, is proposed to investigate their potential anticonvulsant, neuroprotective, and antioxidant properties in a rat model of epilepsy induced by pentylenetetrazole. The project aims to establish and characterize the behavioral aspects of the epilepsy model, assess the antioxidant effects, and evaluate markers of cell death through apoptosis. Standardized tonic-clonic seizure crises were induced, and isobolographic analysis was performed to determine the combined doses of the drugs. Interestingly, the combination doses did not significantly alter seizure latencies compared to individual drug administrations. However, the groups treated with dapsone and cannabidiol showed a significant decrease in lipid peroxidation compared to the untreated group, suggesting a potential for reducing oxidative stress. Additionally, the concentration of reduced glutathione increased significantly in the treated groups, indicating a protective effect on cellular components. Furthermore, the activity of caspase enzymes was evaluated, with notable differences observed in the groups receiving the combination treatment, suggesting a possible neuroprotective or anti-apoptotic effect of the combination therapy. Overall, the results suggest that the combination of dapsone and cannabidiol at specific doses exhibits neuroprotective, anti-apoptotic, and antioxidant effects in the epilepsy model. Ongoing immunohistochemical studies aim to further elucidate the neuroprotective mechanisms involved.

Disclosures: D. Islas Diaz: None. C. Rios: None. V. Baron-Flores: None. A. Ruiz: None. M. Islas: None. A. Mata-Bermudez: None. M. Mendez-Armenta: None. A. Diaz-Ruiz: None.

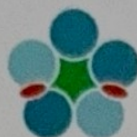
Poster

PSTR326: Brain Wellness and Aging: Pharmacological and Non-Pharmacological Interventions

Location: MCP Hall A

Time: Tuesday, October 8, 2024, 1:00 PM - 5:00 PM

Program #/Poster #: PSTR326.09/Web Only



NEUROSCIENCE
2024

OCTOBER 5-9 CHICAGO

*Neuroscience 2024
October 5-9, 2024
Chicago*

Please let this serve to certify that

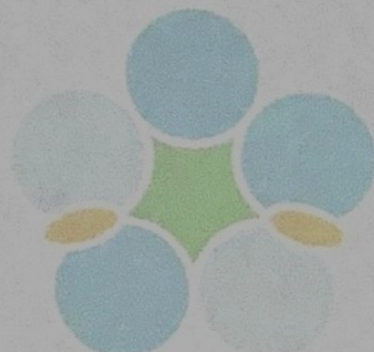
Diana Islas Diaz

has attended Neuroscience 2024 at McCormick Place in Chicago.

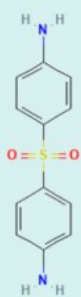
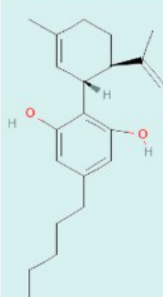
The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

Kyle Hayden, CMP
Director, Meeting Programs and Attendee Services
Society for Neuroscience



NEUROSCIENCE
2024



Conclusiones

La hipótesis planteada en este proyecto se cumple, con la técnica inmunohistoquímica de fluoro-jade B que es específica para teñir neuronas en degeneración, se demostró que en la combinación de dosis de 4.22 mg/kg de DDS y 2 mg/kg de CBD hubo efecto neuroprotector al reducir significativamente la degeneración celular en comparación con el control, mientras que a dosis de 2.37 mg/kg DDS + 0.63 mg/kg de CBD hubo aumento en la degeneración neuronal, lo que muestra un efecto deletéreo dependiente de la dosis.

La viabilidad celular se observó a través de tinción de Nissl determinando que se preservó mejor el tejido en hipocampo izquierdo que en derecho por efecto del CBD y de la DDS

Palabras clave: Epilepsia, Dapsona, Cannabidiol, Inmunohistoquímica, tinción de Nissl, Fluoro-jade B

Introducción

La epilepsia es una enfermedad neurológica crónica caracterizada por crisis convulsivas recurrentes, provocadas por una hiperexcitabilidad neuronal y alteraciones en la regulación inhibitoria del cerebro. Factores como el desequilibrio en neurotransmisores (glutamato y GABA), alteraciones en canales iónicos, estrés oxidante y neuroinflamación contribuyen a su fisiopatología. Aunque existen tratamientos, no siempre son eficaces ni neuroprotectores, lo que impulsa la búsqueda de nuevas terapias, en este estudio hemos propuesto evaluar el efecto del tratamiento combinado de cannabidiol (CBD) y

4-4'-diaminodifenilsulfona (dapsona) en un modelo de kindling químico con pentilentetrazol (PTZ) en ratas.

Objetivo

Evaluar el efecto neuroprotector de la administración combinada de cannabidiol y dapsona mediante estudios histológicos que analicen la integridad y viabilidad celular, así como mediante técnicas de inmunohistoquímica para detectar la degeneración neuronal, en un modelo de epilepsia en ratas

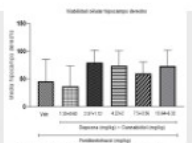


Figura 1: Hipocampo derecho

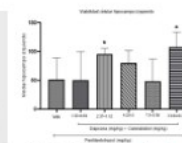


Fig.2: Hipocampo izquierdo

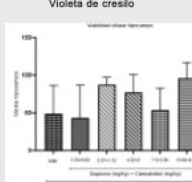


Figura 3: Ambos hemisferios

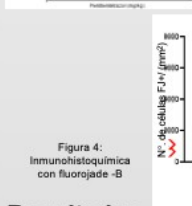


Figura 4: Inmunohistoquímica

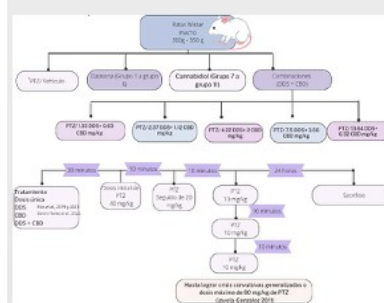
Resultados

La fig. 3 muestra la actividad neuroprotectora en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney.

Por otro lado, en la fig. 4 se representa el número de células positivas a Fluoro-Jade por mm². Representando el valor promedio ± E.E. de 4 animales por grupo, evaluando el efecto neuroprotector en ratas tratadas con cinco diferentes dosis combinadas de DDS y CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas PTZ. Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U Mann-Whitney.

+Diferencia significativa con respecto al grupo con pentilentetrazol más vehículo (p < 0.05) mostrando incremento.

*Diferencia significativa vs Control (Veh) observándose disminución de células degeneradas.



Métodos

Se utilizó un modelo preclínico de epilepsia en ratas inducida con PTZ. Las ratas fueron perfundidas con solución salina y paraformaldehído; los cerebros se procesaron para análisis histológicos.

Ensayo histológico: Una vez transcurridas 24 horas después las crisis convulsivas, las ratas se perfundieron transcardiacamente. Los cerebros se extrajeron del cráneo y se mantuvieron en paraformaldehído al 4% hasta su inclusión en parafina, éstos se cortaron en micrótomos a 5 µm de grosor, y se continuó con el proceso de acuerdo con cada técnica. (García-Martínez et al., 2019).

Fluoro-Jade B: Se prepararon secciones congeladas, se tiñeron con solución específica y se visualizaron en microscopio de fluorescencia.

Conteo celular: Las neuronas FJ+ se contaron en la región CA3 del hipocampo utilizando imágenes digitalizadas y software especializado.

Tinción de Nissl: Se empleó para observar la arquitectura neuronal. Se desparafinó, rehidrató y tiñó el tejido con violeta de cresilo para análisis morfológico.

Referencias:

- Altamirano, M., Monroy-Noyola, A., Osorio-Rico, L., Kravtsov, J., Alvarado-Calvillo, R., Manríquez-Marmolejo, J., & Ríos, C. (1994). Dapsone attenuates kainic acid-induced seizures in rats. *Neurosci Biomed*, 17(1), 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.neurosci.2019.12.017>
- Brunt, L., Lazo, S., & Parker, L. (2019). Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica (13ª ed.). McGraw-Hill
- Britch, S., Babelonis, S., & Walsh, S. (2021). Cannabidiol: Pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology*, 238(1), 9-28. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05712-8>
- Méndez, M., Manríquez, J., Franco, P., Méndez, M., Díaz, A., Barón, V., Díaz, A. (2019). Efficacy of dapsone administered alone or in combination with diazepam to inhibit status epilepticus in rats. *Brain Research*, 1701, 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.12.017>





**II CONGRESO
BIOMATERIALES Y MEDICINA REGENERATIVA**
12 y 13 de Mayo del 2025 - UAM, CDMX, México



El comité científico y organizador extiende la presente

CONSTANCIA

a

*Diana Islas Díaz, Araceli Díaz-Ruiz, Camilo Ríos Castañeda, Marcela Islas
Cortez, Amairani Ruiz-Díaz, Alfonso Mata Bermúdez, Luis Rocha, Verónica
Barón Flores*

Por su participación con el trabajo de investigación

**Efecto anticonvulsivo de cannabidiol solo o combinado
con dapsona en un modelo de epilepsia**


Dr. Juan Morales Corona
Jefe del Depto de Física
UAM-Iztapalapa




Dra. Ana Laura Alvarez Mejia
Posdoctorante
SECITI-UAM




Dr. Rodrigo Mondragón Lozano
Catedrático
SECITI-IMSS



EFFECTO ANTICONVULSIVO Y NEUROPROTECTOR DE Y CANNABIDIOL EN UN MODELO DE EPILEPSIA INDUCIDA CON PENTILENTETRAZOL EN RATAS

Araceli Díaz-Ruiz ¹ Diana Islas ², Amairani Ruiz ³, Marcela Islas-Cortez⁴, Camilo Ríos ⁵ y Jorge Manzanares

Resumen

El presente proyecto propone como alternativa el tratamiento terapéutico de cannabidiol y dapsona solos o en combinación para el estudio de las propiedades anticonvulsivas, neuroprotectoras y antioxidantes en un modelo de epilepsia con pentilene tetrazol en rata, logrando establecer y caracterizar conductualmente un modelo de epilepsia, examinar el efecto antioxidante y evaluar marcadores de muerte celular por apoptosis. Se estandarizaron las crisis convulsivas tónico-clónica, y a través de análisis isobolográfico se determinaron las dosis de combinaciones que se probaron y las latencias de cada combinación no fue significativa respecto a cada fármaco por separado, sin embargo, en los estudios bioquímicos de peroxidación de lípidos los grupos tratados con dapsona y cannabidiol (4.22 mg/kg y 2 mg/kg respectivamente), presentan una disminución significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de animales sin tratamiento, por lo tanto, se sugiere que la administración es capaz de disminuir la peroxidación lipídica, la concentración de glutatión reducido por gramo de tejido produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) respecto a los animales sin tratamiento a la misma dosis. La actividad enzimática de caspasas se determinó con la caspasa 8 y caspasa 9 donde hay diferencia significativa en la dosis de la combinación dapsona y cannabidiol (4.22 mg/kg y 2 mg/kg), respectivamente, caspasa 3, mostró diferencia significativa a la misma dosis y a (7.5 mg/kg y 3.56 mg/kg), lo que nos podría indicar que hay efecto neuroprotector o antiapoptótico de la combinación concluyendo que la peroxidación de lípidos y glutatión reducido a la dosis de la combinación de (4.22 mg/kg y 2 mg/kg i.p.) sugiere actividad neuroprotectora, y la actividad de caspasas efectos antiapoptóticos y antioxidantes en el modelo desarrollado. Se continúa con estudio inmunohistoquímico para evaluar efectos neuroprotectores.



La Sociedad Mexicana de Bioquímica, a través de la Rama de Especies Reactivas del Oxígeno en Biología y Medicina

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Araceli Díaz-Ruiz, Diana Islas-Díaz, Amairani Ruiz-Díaz, Marcela Islas-Cortez, Jorge Manzanarez, Camilo Ríos

Por la presentación oral titulada:

Efecto anticonvulsivo y neuroprotector de dapsona y cannabidiol en un modelo de epilepsia inducida con pentilentetrazol en ratas
presentada en el **X Taller de Aspectos Comparativos del Estrés Oxidativo en Sistemas Biológicos**, con duración de 1 hora, en el marco del **IX Congreso de Especies Reactivas de Oxígeno en Biología y Medicina**, celebrado del 22 al 26 de septiembre del 2025.

San Luis Potosí, S.L.P., México.

Atentamente

Siempre autónoma. Por mi patria educaré


Dra. Tania Zenteno Savin
Presidenta del Congreso


Dr. José Salomé Murguía Ibarra
Director de la Facultad de Ciencias, UASLP