



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA-FCQ

EFFECTO DEL CANNABIDIOL SOBRE LA RESPUESTA
ASTROCÍTICA Y LA GENERACIÓN DE CRISIS
CONVULSIVAS INDUCIDAS POR PENTILENTETRAZOL EN
RATAS

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Nadezhda Tamara Tzompantzi Juarez

DIRECTORA:

Dra. Aleidy Patricio Martínez
Facultad de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Neurofarmacología- FCQ

CO - DIRECTOR

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León
Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio de Neurofarmacología-FCQ

Octubre 2025



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT **CF-2023-I-539**, otorgado a la Dra. Aleidy Patricio Martínez

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT **CF-2023-G-597**, otorgado al Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León



Vicerrectoría de Investigación
y Estudios de Posgrado

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto VIEP-2455, otorgado por la Vicerrectora de Investigación y Estudios de Posgrado a la Dra. Aleidy Patricio Martínez, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



A la BUAP y a la Facultad de Ciencias Biológicas por mi formación académica



El presente trabajo fue realizado en colaboración con el **Laboratorio de Neurofarmacología** de la Facultad de Ciencias Químicas, a cargo del Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León, adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas y bajo la dirección de la Dra. Aleidy Patricio Martínez, adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas.



El presente trabajo fue apoyado por la empresa HempMeds con la donación del principio activo de CBD



Los animales utilizados en este estudio fueron proporcionados por el “Bioterio Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del

MVZ. Francisco Ramos Collazo

A LA COMISIÓN REVISORA DEL PRESENTE TRABAJO

Agradezco de manera especial a quienes conforman mi comisión revisora, por su aporte para el presente trabajo a través de comentarios y correcciones

M en C. Montserrat Vázquez Balbuena

Adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez

Adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP

Dr. Felipe Patricio Martínez

Adscrito a la Facultad de Medicina Veterinaria, BUAP



TLAXCALA

La palabra Tlaxcala proviene del nahuatl tlaxcalli que quiere decir “tortilla” pero que al combinarse con la terminación tlān, que denota “lugar de”, forman la palabra Tlaxcallān. De esta combinación surge el significado “lugar de tortillas”.

Este es uno de los estados que conforma a los Estados Unidos Mexicanos y un momento histórico relevante ha sido su participación en la conquista con los españoles.

Un día cualquiera.

**Al despertar veo la mañana roja, húmeda , brizada,
tumbando la noche, guardando la luna, apagando
luceros que a veces se caen del cielo.**

**El canto del centzontle me anima, con el aroma del
fogón alimentado por leña seca del prado, que
alguien ya ha cortado, para empezar a trabajar su
día.**

**Caballo lindo que recorres las melgas con tu jinete
rebosante, cual jorongo cubre todo su pecho que
lleno ha de estar del aire que emana de su amada
patria.**

**El agua en el río tan dulce canta a su paso y, miro
tantos peces cual notas celestes que arrullan el
tiempo y lo detienen aveces.**

**Sabino, árbol dominante del paisaje, sauce llorón,
fiel compañero a tu tristeza y coraje, magueyes que
en su agua miel endulzan los motivos de la tradición
y, muy presente tú, Malinche, cerro fémico de tanta
belleza que impone el mestizaje de mi corazón.**

**Así te disfruto tierra santa, tierra mía y de mi
inmensa familia.**

**Tlaxcala aquí me tienes, viendo como mi vida
transcurre feliz.**

- Marc Téllez González

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora y co-director de tesis. A la Dra. Aleidy, por su paciencia, su orientación, y rigor durante la elaboración de este trabajo. Al Dr. Daniel Limón por su confianza, paciencia y por brindarme un espacio en el Laboratorio de Neurofarmacología. Sin duda alguna, su apoyo contribuyó a mi formación profesional y personal.

Agradezco a los integrantes del Laboratorio de Neurofarmacología (Nancy Chávez, Edgar Macuil, Enoc Martínez, Carolina de los Santos, Mariana Valencia, Steven Flores, Elizabeth Martínez, Leonardo Acevedo, Jovanna Díaz, Montserrat, Jessica Camargo, Soledad Percastegui y Dr. Felipe) por sus observaciones, comentarios y compañerismo dados a lo largo de este tiempo.

Agradezco a mis padres por su invaluable apoyo a través de su comprensión y muestras de amor incondicional. Su presencia en este proceso ha sido invaluable. También agradezco a Arturo, por ser mi inspiración a lo largo de esta vida compartida y por enseñarme a ser resiliente. A Berna por su apoyo incondicional y consejos.

Y finalmente pero no menos importante a Homero, por todo el apoyo y cariño dado a lo largo de estos años compartidos.

***Dedico esta tesis a mis padres, quienes son mi pilar, mi
fuente de inspiración y mi apoyo incondicional***

ÍNDICE

Índice de figuras	11
Abreviaturas	I
Resumen	III
1. Introducción	1
1.1 Definición y prevalencia de la Epilepsia.....	1
1.2 Clasificación de la epilepsia.....	1
1.3 Fisiopatología de las crisis convulsivas	3
1.4 Participación del hipocampo en las crisis convulsivas	4
1.5 Participación de la amígdala en las crisis convulsivas	6
1.6 Modelos experimentales de convulsiones.....	7
1.7 Pentilentetrazol como modelo de crisis convulsivas	8
1.8 Escala de Racine.....	10
1.9 Astrogliosis reactiva en la epilepsia.....	11
1.10 Aspectos generales de la planta Cannabis sativa.....	13
1.11 Sistema Endocannabinoide	15
1.12 Cannabidiol como alternativa terapéutica en las crisis convulsivas y en la neuroinflamación	17
1.13 URB-597 como molécula antiinflamatoria.....	20
2. Justificación	22
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	24
4.1 General	24
4.2 Particulares	24
5. Materiales y métodos	25
5.1 Diagrama de trabajo.....	25
5.2 Animales de experimentación.....	25
5.3 Preparación y administración de fármacos	26
5.3.1 Cannabidiol (CBD)	26

5.3.2 URB-597-----	26
5.3.3 Pentilentetrazol (PTZ)-----	26
5.4 Evaluación de crisis convulsivas -----	26
5.5 Eutanasia y preparación de tejidos cerebrales -----	27
5.6 Inmunofluorescencia -----	28
5.7 Obtención y análisis de las imágenes por fluorescencia-----	28
5.8 Análisis estadístico-----	29
6. Resultados -----	31
6.1 La administración de Cannabidiol o URB-597 disminuye la intensidad de las crisis convulsivas-----	31
6.2 La administración de CBD o URB-597 no disminuye la frecuencia de crisis tónico-clónicas y mioclónicas -----	32
6.3 La administración de CBD o URB-597 no modifica la latencia a la primera crisis tónico- clónica y la latencia a la primera crisis mioclónica -----	33
6.4 La administración de CBD o URB-597 disminuye la expresión de GFAP en la región CA1 de hipocampo y en la amígdala basolateral -----	34
7. Discusión -----	37
8. Conclusiones-----	42
9. Perspectivas-----	42
10. Bibliografía -----	43
11. Anexos -----	51
11.1 Estructura química del CBD-----	51
11.2 Farmacocinética del CBD-----	51
11.3 Farmacocinética y estructura química del URB-597-----	53

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Clasificación de la epilepsia	2
Figura 2. Fisiopatología de la epilepsia	4
Figura 3. Visión general de los modelos de epilepsia o convulsiones epilépticas	8
Figura 4. Mecanismo de acción del PTZ	10
Figura 5. Progresión de crisis epilépticas y astrogliosis en modelos de crisis epilépticas inducido por PTZ	12
Figura 6. Partes de la planta Cannabis sativa	13
Figura 7. Estructura química de los fitocannabinoides mayoritarios en la planta Cannabis	14
Figura 8. Síntesis y señalización de AEA y 2- AG	17
Figura 9. Dianas terapéuticas del CBD	19
Figura 10. URB597 aumenta los niveles de AEA cerebral al inhibir la FAAH	20
Figura 11. Inhibición de la inflamación inducida por LPS	21
Figura 12. Identificación del área con inmunorreactividad a través de máscaras	29
Figura 13. El tratamiento con CBD o URB-597 disminuye la intensidad de las crisis convulsivas	31
Figura 14. El tratamiento con CBD o URB-597 no modifica la frecuencia de crisis tónico-clónicas o mioclónicas	32
Figura 15. El tratamiento con CBD o URB-597 no modifica la latencia a la primera crisis tónico-clónico y mioclónica	33
Figura 16. El CBD y URB-597 disminuye el porcentaje de área teñida de GFAP en la región CA1	35
Figura 17. El CBD y URB-597 disminuye el porcentaje de área teñida de GFAP en BLA	36
Figura 18. Mecanismo de acción hipotético del CBD en un modelo de crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol	41
Figura 19. Estructura del CBD y THC	51

Figura 20. Datos farmacocinéticos del CBD	51
Figura 21. Estructura química del URB-597 o KDS-4103.	54

Índice de tablas

Tabla 1. Representación gráfica de los seis estadíos de la escala de Racine modificada	27
---	----

Abreviaturas

2-AG	2-araquidonoil-glicerol
AC	Adenilato ciclasa
AEA	Araquidonoil etanolamida/ anandamida
AMPA	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AP-1	Proteína activadora 1
CB1R	Receptor cannabinoide de tipo 1
CB2R	Receptor cannabinoide de tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
DAG	1,2-diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
eCBs	Endocannabinoides
EEG	Electroencefalograma
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1beta
IL-4	Interleucina 4
ILAE	Liga Internacional contra la Epilepsia
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína quinas activada por mitógeno
NAPE-PLD	Fosfolipasa D específica de NAPE
NAPE	N-acil-fosfatidiletanolamina
NF-KB	Facto nuclear potenciado de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PLC	Fosfolipasa C
PTZ	Pentilentetrazol
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Δ-9-THC	Δ 9-tetrahidrocannabinol

Resumen

En los últimos años, el estudio del sistema endocannabinoide como un modulador en los procesos de inhibición y excitación neuronal, ha tenido relevancia por su participación sobre la fisiopatología de enfermedades como la epilepsia. Diversos estudios han demostrado que la activación de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, así como el GPR55, participan en la regulación de la hiperexcitabilidad neuronal y en consecuencia disminuyen los procesos de neuroinflamación, de excitotoxicidad y de muerte celular. Por otra parte, la inhibición de la amida hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH), por medio de antagonistas como el URB-597, ha mostrado un papel importante en la disminución de marcadores de neuroinflamación en diversas patologías. Es así como el Cannabidiol (CBD), un compuesto no psicoactivo de la planta *Cannabis sativa L.*, se perfila como una alternativa terapéutica atractiva para tratar diversas patologías, ya que promueve la activación de diferentes receptores en regiones cerebrales asociados con focos epilépticos. Recientes estudios reportan que el CBD, disminuye la hiperexcitabilidad y actúa como un agente antiinflamatorio y neuroprotector. El pentilentetrazol (PTZ) es una molécula convulsivante ampliamente utilizada para replicar los cambios neurológicos y bioquímicos característicos de la epilepsia, lo que permite su uso en la caracterización de modelos experimentales de crisis convulsivas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del CBD sobre la generación de crisis convulsivas y la respuesta astrocítica provocado por PTZ. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (260-330g), divididas en cuatro grupos experimentales: VEH+VEH (n=14), VEH+PTZ (n=12), URB597+PTZ (n=12) y CBD+PTZ (n=12). La administración de CBD o URB597 se realizó durante catorce días, siete días antes y siete posteriores a la administración de PTZ. El PTZ se administró por cuatro días de manera alternada y se evaluó la intensidad de las crisis convulsivas por medio de la escala de Racine.

Finalmente, se cuantificó la inmunorreactividad del marcador de astrocitos GFAP en el hipocampo y en la amígdala mediante inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que el tratamiento con CBD o URB597 redujo la intensidad de las crisis convulsivas sin modificar la frecuencia ni las latencias a la primera crisis mioclónica y tónico clónica. En

cuanto a la cuantificación de GFAP en el hipocampo, se observó que el tratamiento con CBD disminuyó la inmunorreactividad, mientras que el grupo tratado con URB597 presentó una mayor reducción de este marcador en comparación con los grupos VEH+PTZ y CBD+PTZ. Estos hallazgos sugieren que el CBD no solo atenúa las crisis convulsivas, sino que también reduce la astrogliosis, actuando como un modulador de la hiperexcitabilidad neuronal y de la activación astrocitaria. En conclusión, el CBD ejerce efectos similares a los de URB-597 en la disminución de la hiperexcitabilidad y la activación astrocitaria, lo que refuerza su potencial terapéutico en el tratamiento de la epilepsia.

1. Introducción

1.1 Definición y prevalencia de la Epilepsia

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico caracterizado por una predisposición a generar crisis epilépticas recurrentes no provocadas. Las crisis convulsivas se manifiestan como alteraciones en los patrones normales de actividad neuronal, debido a una sincronización anormal y transitoria de las neuronas en el cerebro. Estas crisis pueden presentarse con síntomas sensoriales como alteraciones en la conciencia, y signos como conductas convulsivas, entre ellas, mioclonías, crisis tónicas y crisis tónico- clónicas (Ono & Galanopoulou, 2012).

Se ha reportado que la epilepsia puede presentarse en todos los grupos etarios (niñez, juventud, adultez y vejez) pero existe una mayor incidencia en la población infantil. En cuanto a la epilepsia activa, se ha reportado que su prevalencia a nivel mundial es de 6.38 casos por cada 1000 habitantes, mientras que en México la prevalencia reportada oscila entre 349 a 680 casos por cada 100 000 habitantes en la población general, y entre 180 a 400 por cada 100 000 habitantes en la población infantil (Pesqueira *et al.*, 2023).

Se estima que, de los pacientes diagnosticados con epilepsia, el 65% vive en regiones rurales de países en desarrollo, 25% viven en áreas urbanas y solo el 10% radican en países desarrollados, de manera que la tasa de incidencia es más alta en países en desarrollo como los de América Latina donde las cifras pueden superar la prevalencia de 150 por cada 100 000 habitantes. Esta prevalencia se debe a una falta de acceso a la atención médica, debido a los recursos limitados en el área de la salud (Pesqueira *et al.*, 2023; Noriega-Morales & Shkurovich-Bialik, 2020). Esta última condición puede afectar el proceso de diagnóstico y tratamiento de pacientes epilépticos, dejando incompleto el esquema de clasificación de epilepsia que se usa para la identificación y categorización de los tipos de crisis, tipo de epilepsia y tipo de síndrome epiléptico.

1.2 Clasificación de la epilepsia

La clasificación internacional de la epilepsia fue emitida en 1969, con el objetivo de integrar la información recopilada por los especialistas sobre la epilepsia y de esta

manera poder diagnosticar y establecer tratamientos adecuados para cada paciente. Esta clasificación permitió mejorar el diagnóstico y el establecimiento de tratamientos adecuados, además de ser una herramienta fundamental en el desarrollo de modelos experimentales para la investigación de este trastorno (Reséndiz-Aparicio *et al.*, 2023).

La clasificación de la epilepsia más actual y utilizada por los especialistas e investigadores es la propuesta por la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés International League Against Epilepsy), en 2017. El primer nivel de la clasificación corresponde al tipo de crisis: 1) crisis de inicio focal, (caracterizadas por una actividad de inicio epileptiforme en uno de los dos hemisferios cerebrales); 2) crisis generalizadas (caracterizada por la presencia de actividad epileptiforme en ambos hemisferios cerebrales) y 3) crisis de inicio desconocido (se desconoce el sitio de inicio de la actividad epiléptica). El segundo nivel abarca el tipo de epilepsia: 1) focal, 2) generalizada y 3) desconocido. El tercer nivel incorpora un conjunto de características para el diagnóstico del síndrome epiléptico: como tipos de convulsiones, hallazgos en electroencefalograma (EEG), edad de inicio y remisión, factores desencadenantes de las convulsiones, comorbilidades e implicaciones etiológicas (Reséndiz-Aparicio *et al.*, 2023; Fisher *et al.*, 2017) (Figura 1).

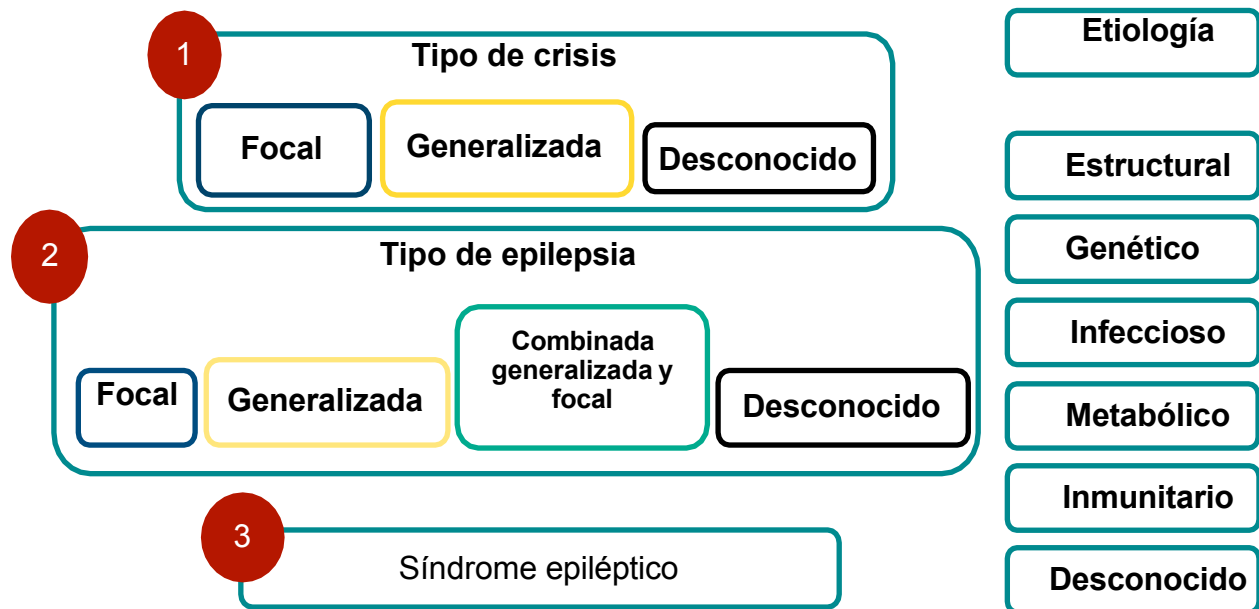


Figura 1. Clasificación de la epilepsia. Primer nivel: tipo de crisis; segundo nivel: tipo de epilepsia; tercer nivel: síndrome epiléptico. Figura tomada y modificada de Reséndiz-Aparicio *et al.*, 2023.

Una vez establecido el nivel de clasificación de la epilepsia, resulta pertinente abordar su fisiopatología, en donde se puede vislumbrar una comprensión más detallada de los procesos celulares implicados en la generación de las crisis epilépticas. Esto constituye la base para el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces.

1.3 Fisiopatología de las crisis convulsivas

Las convulsiones pueden tener diversas causas, sin embargo, un principio ampliamente discutido es que surgen debido a una alteración en el equilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal (Scharfman, 2007). Esta alteración se asocia a una excitación exacerbada o a una inhibición disminuida en las redes neuronales, donde se reconoce que los principales neurotransmisores involucrados son el glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Treiman, 2001; Sarlo & Holton, 2021).

Tanto en la epilepsia como en los modelos de crisis, se ha descrito una desregulación de los mecanismos glutamatérgicos que involucra un aumento de la expresión de los receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA) o metabotrópicos (mGluR5), la expresión anormal de transportadores de glutamato en los astrocitos o bien, alteraciones en el funcionamiento de enzimas neuronales o astrocíticas que modifican las interacciones neuronales, gliales o neurona-glia (Eid *et al.*, 2004; Kanchi & Meesala, 2024). Así mismo, en los mecanismos inhibitorios de GABA se han visto alteraciones en los procesos de síntesis, de liberación y de recaptura de GABA. En este contexto, se ha demostrado que existen cambios en las concentraciones de GABA, disminución en la expresión de los receptores GABA_A, así como una disminución de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) en el hipocampo (Figura 2) (Sarlo & Holton, 2021; Kanchi & Meesala, 2024).

Es importante mencionar que otro componente clave en la epileptogénesis, un proceso de cambios moleculares y bioquímicos que vuelven a un cerebro sano en uno susceptible a crisis epilépticas, es el proceso neuroinflamatorio que ha mostrado tener una implicación en la iniciación y en la cronificación de la epilepsia. Se ha reportado que posterior a una crisis epiléptica, además de haber cambios en los mecanismos de inhibición y excitación, se produce la activación de las células gliales (microglía y astrocitos) que liberan citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6 y la proteína

del grupo de alta movilidad B1 (HMGB1) capaces de generar un entorno de hiperexcitabilidad neuronal, alterando a su paso a los canales iónicos de tipo T (canalopatías) (Figura 2).

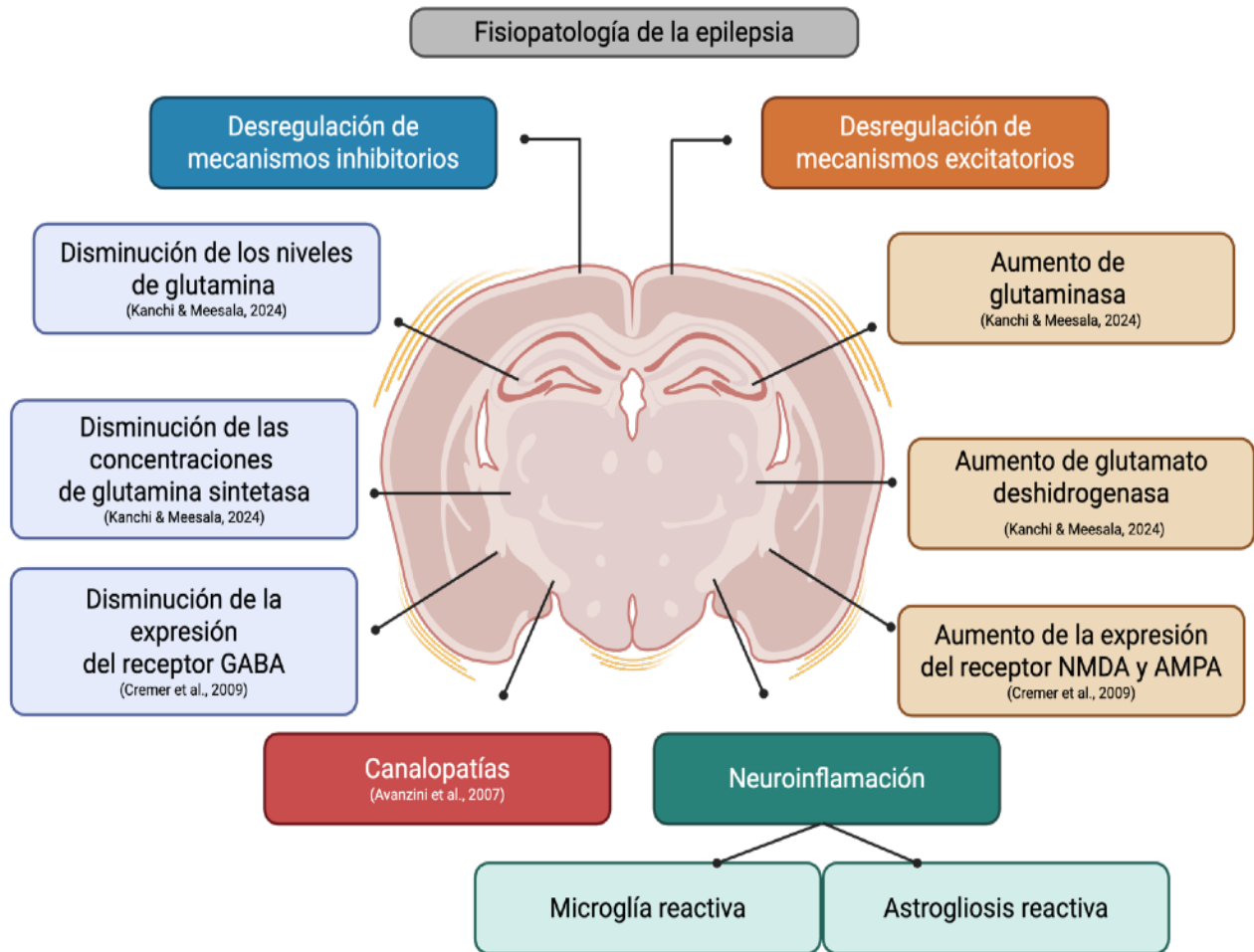


Figura 2. Fisiopatología de la epilepsia. La epilepsia está relacionada con una desregulación de los mecanismos inhibitorios y excitatorios, canalopatías y procesos asociados a la neuroinflamación.

Para comprender cómo se manifiestan los procesos fisiopatológicos de la epilepsia es importante comprender el papel que desempeñan las estructuras clave en la generación y en la propagación de las crisis. Algunas de estas regiones relevantes son el hipocampo y la amígdala, que al tener una susceptibilidad a la excitabilidad excesiva los convierten en sitios vulnerables dentro de los circuitos cerebrales epilépticos, por lo que su estudio es de vital importancia para el desarrollo de nuevas terapéuticas.

1.4 Participación del hipocampo en las crisis convulsivas

El hipocampo es una estructura convexa y alargada ubicada en el lóbulo temporal

medial, se encuentra conformado por tres zonas distintas: el giro dentado (GD), el hipocampo o cuerno de Ammon y el subículo (Chauhan *et al.*, 2021). El cuerno de Ammon recibe su nombre por su característica forma en “C” y se subdivide en las regiones: CA1, CA2 y CA3 . En la región CA1, la mayoría de las neuronas son células piramidales con proyecciones glutamatérgicas y el resto son interneuronas GABAérgicas. La región CA2 se encuentra de manera contigua al área CA1, en dirección al giro dentado y el área CA3 se ubica contiguamente al área CA2 y su importancia radica en las conexiones que el GD tiene con esta área a través de las fibras musgosas de las células granulares (Chauhan *et al.*, 2021). Las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas del hipocampo constituyen entre el 85-90% y el 10%-15%, respectivamente, de las neuronas totales de esta estructura. Estas células mantienen proyecciones intra- y extrahipocampales que facilitan la comunicación con distintas regiones del cerebro, incluyendo la corteza prefrontal, la corteza entorrinal, la amígdala, el tálamo y la formación de los ganglios basales (Bello-Medina *et al.*, 2018).

El hipocampo ha sido una de las regiones más estudiadas en la epilepsia humana y experimental debido a que es un sitio frecuente de focos epilépticos, es decir, sitios de origen y persistencia a generar crisis convulsivas. Esta susceptibilidad está vinculada a factores fisiológicos y neuroquímicos que favorecen la hiperexcitabilidad neuronal de esta estructura. Una característica que promueve esta susceptibilidad es la naturaleza de las neuronas en el hipocampo, la cual se compone en un gran porcentaje de células glutamatérgicas que favorecen la excitación, y de células GABAérgicas que promueven la inhibición, por lo que una alteración en su equilibrio como la disfunción o pérdida de interneuronas GABAérgicas, así como una excesiva liberación de glutamato, puede promover la generación de crisis convulsivas (Thom, 2014).

En pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial (MTLE, por sus siglas en inglés *Mesial Temporal Lobe Epilepsy*), un tipo de epilepsia focal, como en el modelo de crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol, se ha observado un proceso de esclerosis hipocampal (HS, por sus siglas en inglés *hippocampal sclerosis*). Esta condición se caracteriza por la pérdida neuronal en las regiones CA1 y CA3, acompañada de gliosis reactiva que crea un entorno que favorece la hiperexcitabilidad y la formación de focos

epilépticos. Además, se ha reportado que, en respuesta a estas lesiones cerebrales, se promueve un proceso de neurogénesis entre el giro dentado y el área CA3 del hipocampo, lo que da lugar a la formación de sinapsis aberrantes y a ciclos de retroalimentación en los que las crisis convulsivas se pueden perpetuar (Thom, 2014; Cavarsan *et al.*, 2018).

1.5 Participación de la amígdala en las crisis convulsivas

La amígdala es una estructura en forma de almendra ubicada en el lóbulo temporal que es responsable de llevar a cabo funciones como el control de las emociones, la formación de la memoria y el comportamiento (AbuHasan *et al.*, 2023). Se conforma por trece núcleos, entre ellos, la amígdala basolateral (BLA), un sitio de información procesada y multisensorial constituido por células de proyección de tipo glutamatérgico y GABAérgico, representando un porcentaje de entre 80-85% y 10-15%, respectivamente. Las aferencias de este núcleo provienen de sitios corticales y talámicos (Hájos, 2021).

La amígdala juega un papel importante en el inicio y en la propagación de las crisis convulsivas debido a sus conexiones con el hipocampo, con la corteza y con el tálamo. El estudio de las interacciones entre la amígdala y el hipocampo han sido de relevancia en la MTLE, donde se ha observado que las lesiones amigdalohipocámpales pueden alterar el umbral de excitación neuronal y promover la susceptibilidad a las crisis convulsivas. Además, en estudios de resonancia magnética de pacientes epilépticos se ha revelado la atrofia y la reducción en volumen causada por la pérdida neuronal en la amígdala debido a crisis recurrentes. Esta atrofia puede oscilar entre un 10% y un 57% de la reducción del volumen total (Pitkänen *et al.*, 1998).

La participación del hipocampo y de la amígdala en la epilepsia ha sido ampliamente documentada pero para comprender sobre los mecanismos implicados, se han desarrollado modelos animales de epilepsia que reproducen no solo las crisis sino los cambios neuropatológicos observados en estas regiones a nivel clínico, de manera que permiten estudiar una amplia gama de eventos bioquímicos y moleculares, ofreciendo una base de conocimiento para su estudio.

1.6 Modelos experimentales de convulsiones

Los modelos animales de epilepsia han sido fundamentales en la investigación científica para explorar nuevas alternativas terapéuticas y para evaluar la eficacia de fármacos antiepilépticos dirigidos a reducir la frecuencia e intensidad de las convulsiones (Monteiro *et al.*, 2024). Aunque actualmente ningún modelo puede reproducir todas las características clínicas de la epilepsia como sucede en humanos, la selección del modelo debe basarse en los objetivos específicos de estudio. Esto permite reproducir parcialmente signos, síntomas y mecanismos moleculares o bioquímicos subyacentes a la enfermedad, incluyendo la predisposición a padecer crisis convulsivas (Wang *et al.*, 2022).

En los modelos de crisis convulsivas hay dos tipos; los genéticos y en los que se utilizan herramientas químicas, eléctricas o mecánicas para inducir o replicar cambios neurológicos y síntomas que imitan las condiciones de la enfermedad en humanos (Figura 3) (Erkec, 2015). Los primeros se constituyen por cepas de animales modificados genéticamente con predisposición a generar convulsiones espontáneas recurrentes, como la cepa de ratones GAERS (del inglés Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg) o los GEPR (del inglés, Genetically Epilepsy-Prone Rats). Los segundos involucran herramientas químicas (pentilentetrazol o pilocarpina) o eléctricas (como la estimulación por electrochoque máximo; MES) que interrumpen el equilibrio entre los neurotransmisores excitatorios (glutamato) e inhibitorios (GABA) en el sistema nervioso central (SNC). En este sentido, las convulsiones pueden ser el resultado de una disminución de la inhibición neuronal GABAérgica, o el aumento de la actividad glutamatérgica inducida (Monteiro *et al.*, 2024).

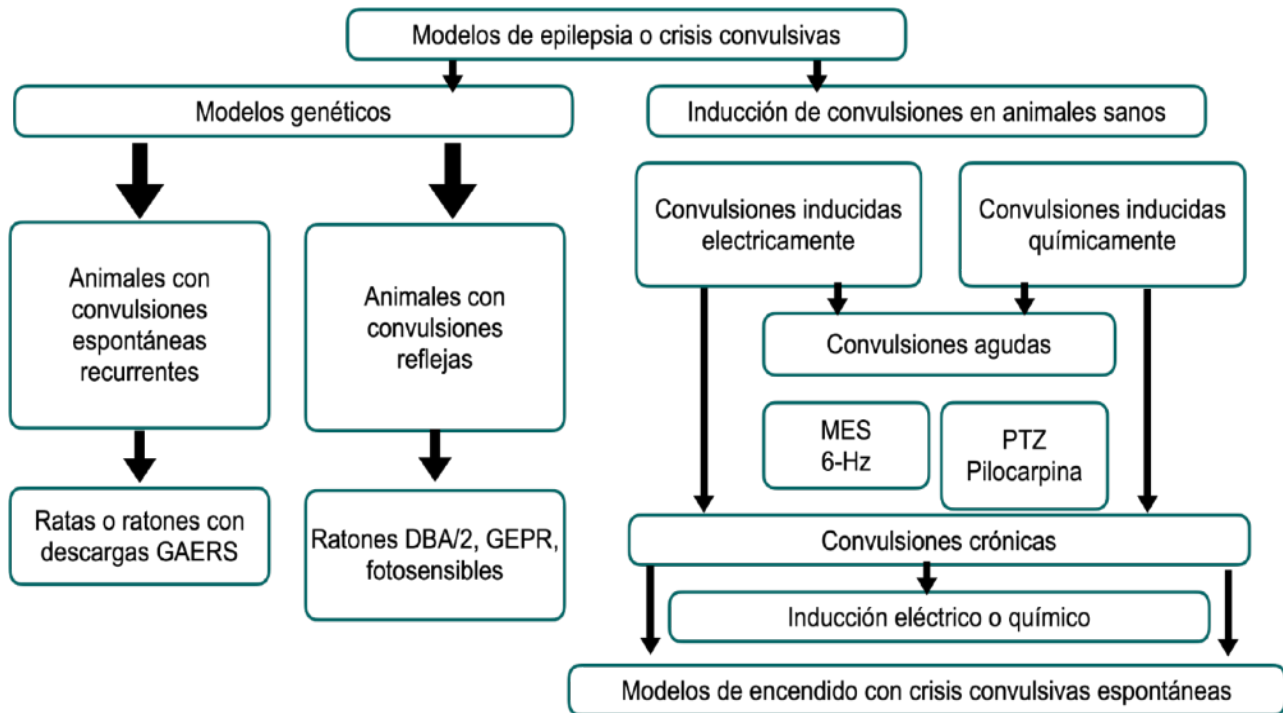


Figura 3. Visión general de los modelos de epilepsia o convulsiones epilépticas. En este esquema se nombran algunos de los modelos utilizados para la generación de crisis convulsivas, no obstante, existen más modelos que desarrollan convulsiones recurrentes espontáneas. GAERS, Rata con epilepsia por ausencia genética de Estrasburgo (del inglés Genetic Absence Epillepsy Rat from Strasbourg); DBA/2 designación genérica para una cepa de ratones; GEPR, Ratas Genéticamente Propensas a la Epilepsia (del inglés, Genetically Epillepsy-Prone Rats); MES, estimulación por electrochoque máximo; PTZ, pentilentetrazol. Tomado y modificado de Löscher, 2011.

1.7 Pentilentetrazol como modelo de crisis convulsivas

Uno de los métodos usados para inducir crisis convulsivas agudas es la inhibición del tono GABAérgico. En este contexto, las convulsiones inducidas por pentilentetrazol (PTZ) se han establecido como un modelo eficaz para evaluar la actividad de nuevos fármacos antiepilépticos (Monteiro *et al.*, 2024).

El uso de PTZ a lo largo del tiempo ha permitido desarrollar diferentes variantes del modelo de convulsiones. Uno de ellos es el modelo crónico o *kindling*, descrito por Mason y Cooper (1972), el cual consiste en una administración repetitiva de PTZ hasta alcanzar un estado de excitabilidad crónica, con crisis espontáneas recurrentes. Para establecer un modelo crónico, es necesario administrar el PTZ en dosis subconvulsivas (30 o 35 mg/kg) durante un periodo de 4 a 6 semanas, en intervalos de 48h entre cada administración. Mientras que los modelos agudos se limitan a la generación de crisis solo en el momento de la administración del convulsivante y su uso puede variar de

una única administración, con dosis convulsivantes ($\geq 40-50$ mg/kg) hasta administraciones que requieren entre 3 a 6 de inyecciones (2 semanas) cada 48h a dosis subconvulsivas (Löscher, 2009; Ngoupaye *et al.*, 2022).

El pentilentetrazol (PTZ), también conocido como pentetrazol o metrazol se considera un potente estimulante del sistema nervioso central (SNC) que actúa como un antagonista de los receptores GABAérgicos. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con el sitio de unión a picrotoxina en los receptores GABA_A, impidiendo la entrada del cloro y promoviendo la hiperexcitabilidad a través de la activación excesiva de los receptores NMDA, lo que permite una mayor entrada de Na⁺ y Ca²⁺. Este aumento de iones conduce a la despolarización neuronal y a la activación de canales de sodio (Nav.1) y calcio (Cav.1 y Cav.2) dependientes del voltaje, mejorando aún más la afluencia de estos iones y facilitando la propagación de potenciales de acción anormales y la liberación de neurotransmisores, incluido el glutamato. El incremento de Ca²⁺ en el citosol también activa los mecanismos de liberación de calcio inducido por calcio a través de los receptores de rianodina, ubicados en las reservas intracelulares del retículo endoplasmático en el hipocampo. Así, se promueve una mayor liberación de Ca²⁺ que desencadena la producción de radicales libres, estrés oxidativo, apoptosis y en consecuencia la activación de la microglía. Esta activación microglial resulta en una mayor expresión y liberación de mediadores proinflamatorios en el hipocampo, como el óxido nítrico (NO), la ciclooxygenasa-2, la prostaglandina E2 (COX-2/PGE2), interleucina-1 β (IL-1 β), los cuales son esenciales en el inicio de la neuroinflamación inducida por PTZ. La producción de IL-1 β conduce a una reducción de los transportadores de glutamato astrogliales, que son indispensables para la recaptura de neurotransmisores excitatorios en la hendidura sináptica. Estas alteraciones inducidas por PTZ contribuyen a un ciclo recurrente de excitotoxicidad (Figura 4). Este proceso se encuentra estrechamente relacionado con la activación astrogliar.

Este modelo, si bien reproduce una amplia variedad de crisis en los animales de experimentación, requiere de una escala de valoración que permita evaluar de manera sistemática y objetiva el comportamiento convulsivo de los animales y es aquí donde se hace uso de la escala de Racine.

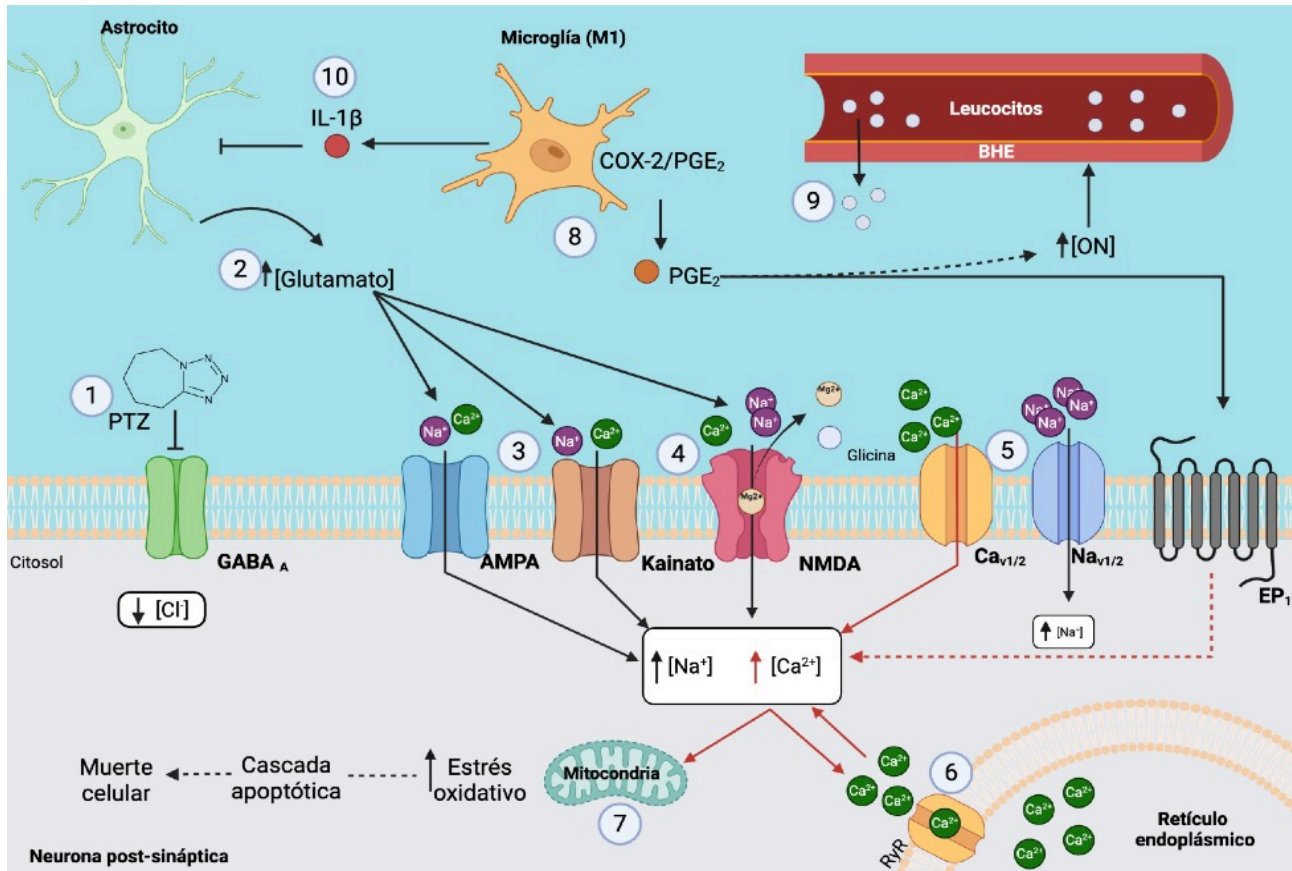


Figura 4. Mecanismo de acción del PTZ. Las flechas sólidas indican activación directa, las punteadas indican activación indirecta y las flechas rojas se asocian a un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} . (1) Al unirse PTZ a los receptores GABA_A , se reduce la inhibición cerebral, (2) lo que lleva a un aumento en las concentraciones de glutamato en el espacio sináptico, y (3) el desarrollo de hiperexcitabilidad inicialmente mediada por los receptores AMPA y kainato, (4) y sostenida por los receptores NMDA. (5) Este aumento de iones conduce a la activación de canales $\text{Nav}_{1/2}$, $\text{Cav}_{1/2}$ que promueven una mayor afluencia de Na^+ y Ca^{2+} en el citosol, (6) y lleva a la despolarización neuronal y a la activación de los receptores de rianodina (RyR) en el retículo endoplásmico, quienes promueven la liberación de más Ca^{2+} . (7) El aumento descontrolado de Ca^{2+} en el citosol contribuye al aumento de estrés oxidativo, la activación de cascadas apoptóticas en la mitocondria y finalmente muerte neuronal. (8) La muerte neuronal promueve procesos neuroinflamatorios y la activación de microglía M1 promoviendo la expresión y liberación de NO e (9) interleucina-1 β (IL-1 β), la cual (10) media la pérdida de los transportadores de glutamato astroglial. Figura tomada y editada de Monteiro *et al.*, 2024.

1.8 Escala de Racine

La escala de Racine, desarrollada por Robert J. Racine en el año 1972, fue propuesta como una clasificación de la actividad convulsiva observada posterior a la estimulación eléctrica repetida del hipocampo en ratas. Sin embargo, su uso indiscriminado en modelos de crisis inducidos químicamente, como en el de PTZ, causó controversia por las diferencias en el comportamiento convulsivo, haciendo que Lüttjohann *et al.*, (2009) cuestionara y estableciera una escala adecuada para las crisis convulsivas inducidas

por PTZ, (Ver tabla 1 de metodología), en donde agrupa once comportamientos convulsivos en seis categorías o estadios: (0) movimiento de vibrisas; (1) arresto repentino, también dicho como interrupción repentina del comportamiento; (2) movimientos faciales; (3) sacudida de cuello; 4) crisis clónica “sentado”; (5) crisis clónica, crisis tónico- clónica o crisis tónica, todas “acostado boca abajo” ; (6) crisis clónica y crisis tónico-clónica, ambas “acostado de lado” y salto salvaje. Algunas de estas crisis como las clónicas se reconocen por presentar sacudidas rítmicas y repetitivas, observadas como movimientos de contracción y relajación repetidos. Mientras que en las tónicas se observa una rigidez muscular sostenida que puede hacer que los animales pierdan su postura. Asimismo, las crisis tónico-clónicas son crisis más complejas que incluyen una fase tónica, donde predomina la contracción de los músculos de manera sostenida, y una fase clónica, donde los músculos se contraen y se relajan de manera rápida y repetitiva (Scheffer *et al.*, 2017).

1.9 Astrogliosis reactiva en la epilepsia

Los astrocitos son células gliales derivadas de progenitores neuronales que constituyen una de las poblaciones celulares más abundantes del SNC (Sofroniew, 2020). Tienen diversas funciones en contextos fisiológicos y patológicos y para llevarlas a cabo interactúan, a través de mediadores moleculares, con neuronas, microglía, células de linaje de oligodendrocitos, pericitos, células endoteliales e inclusive otros astrocitos (Sofroniew, 2020).

En un contexto fisiológico, los astrocitos se encargan de mantener la homeostasis de iones y transmisores, proporcionan metabolitos de glucosa como sustratos energéticos a las neuronas, modulan el flujo sanguíneo local y contribuyen en el desarrollo de la sinapsis y de la plasticidad (Sofroniew, 2020). No obstante, en un contexto patológico, los astrocitos reaccionan a moléculas de señalización intracelular (como citoquinas, TGF- β y calcio) capaces de desencadenar un proceso de varios pasos denominado **astrogliosis**, que en primera instancia ejerce funciones benéficas al proteger a las células y a los tejidos del SNC mediante la contención del daño, la restauración del equilibrio iónico así como su participación en la supervivencia neuronal y reparación del tejido lesionado. Sin embargo, su persistencia de manera crónica puede convertirse en un

fenómeno negativo e inadaptativo al causar neurotoxicidad y promover la persistencia de la inflamación (Sofroniew, 2020).

La astrogliosis reactiva es un proceso en el que los astrocitos responden a agresiones o lesiones del SNC que generan desde alteraciones reversibles en la expresión genética, hipertrofia celular hasta cicatrices gliales duraderas. La hipertrofia se caracteriza por cambios morfológicos en los astrocitos, incluyendo procesos celulares más gruesos y un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio del citoesqueleto que se ha utilizado como un marcador específico de astrocitos (Zhou et al., 2019). Estos fenómenos se observan en modelos experimentales de epilepsia inducida químicamente, donde se reportan signos claros de inflamación, gliosis reactiva y neurodegeneración (Fabisiak & Patel, 2022). Tal es el caso del modelo con PTZ el cual induce una amplificación progresiva de las convulsiones tras una administración sistémica (Figura 5.a). Además de desarrollar crisis convulsivas, se observa astrogliosis reactiva en las regiones epileptógenas, como el hipocampo (Díaz et al., 2023) (Figura 5.b). Este proceso está descrito por Díaz et al., (2023), quienes hacen uso de un modelo de ratones macho C57BL/6 a los que les administraron PTZ a una dosis de 35 mg/kg durante 13 días, en días alternos (7 inyecciones).

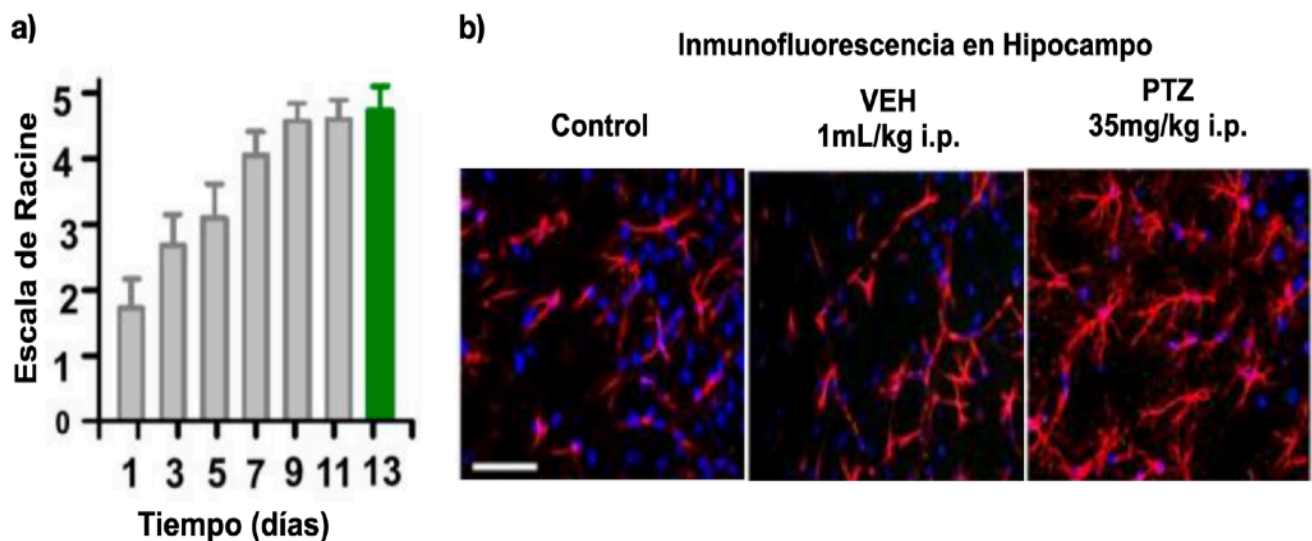


Figura 5. Progresión de las crisis epilépticas y astrogliosis en modelos de crisis epilépticas inducido por PTZ. a) Progresión de las crisis epilépticas de acuerdo a la escala de Racine durante siete días de administración de PTZ. b) Astrogliosis en hipocampo de ratas tratadas con PTZ. Tomado y modificado de Díaz *et al.*, 2023.

1.10 Aspectos generales de la planta *Cannabis sativa*

La planta *Cannabis sativa* forma parte de la familia de las Cannabaceae y se clasifica en tres especies: 1) *Cannabis sativa*, 2) *Cannabis indica* y 3) *Cannabis ruderalis* (Sommano SR *et.al.*, 2020). Esta, es una planta anual, angiosperma y dicotiledónea que puede alcanzar una altura de 5 m de altura (Farag & Kayser, 2017; Bonini *et al.*, 2018, como se citó en Fordjour *et al.*, 2023). Asimismo, se ha descrito como una planta dioica donde los individuos masculinos, encargados de la producción de polen, se distinguen por tener una flor con cinco pétalos amarillos y cinco anteras, que pueden crecer en sitios axilares o terminales de la planta. Mientras que, las plantas femeninas presentan una flor con su órgano reproductor, el óvulo, y su respectivo perianto que tras ser polinizadas generan un fruto pequeño de color gris parduzco (Farag y Kayser, 2017; Fordjour *et al.*, 2023). Es importante mencionar que los individuos femeninos tienen la característica de poseer tricomas glandulares de manera abundante en la superficie de las inflorescencias, así como en el cáliz, y en menor abundancia en el resto de la planta (Figura 6). Estas estructuras son de vital importancia debido a que permiten la acumulación de componentes químicos, como metabolitos cannabinoides y terpenos.

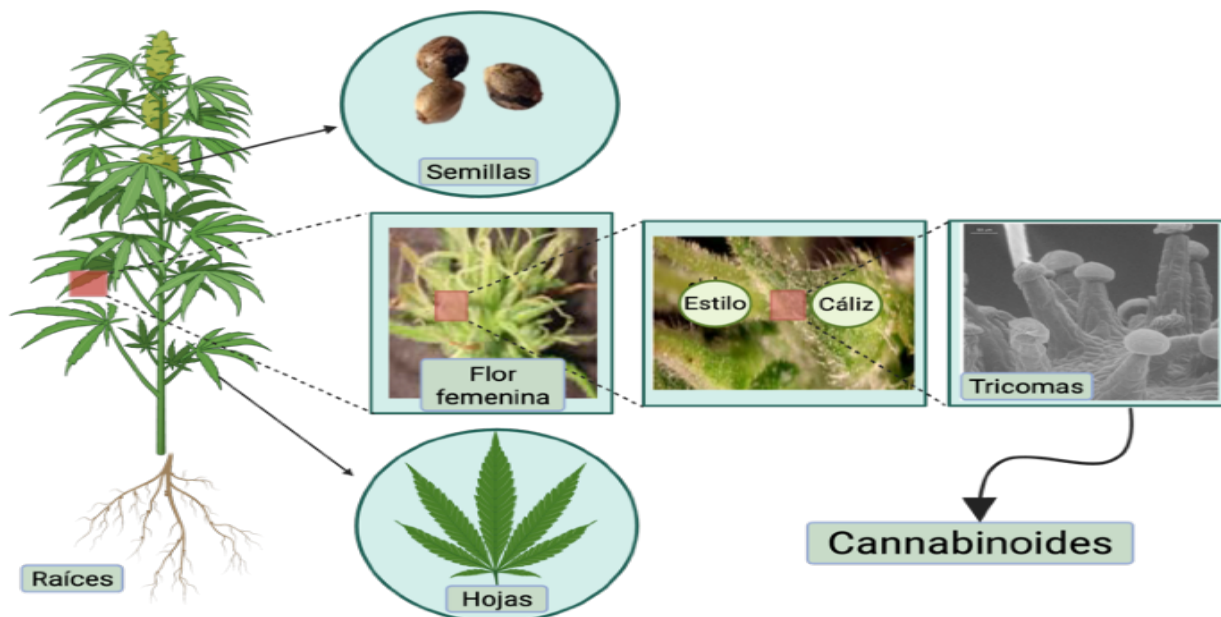


Figura 6. Partes de la planta *Cannabis sativa*. Representación de la morfología y estructura de la planta *Cannabis sativa* donde se observan las hojas, raíces, semillas y una representación de la planta femenina, esta última con cálices y estilos con sus respectivos tricomas. Figuras tomadas y modificadas de Livingston *et al.*, 2019b & Fordjour *et al.*, 2023b.

Si bien se ha descrito que esta planta produce más de 500 componentes, al menos 125

de estos se han identificado como cannabinoides, también llamados fitocannabinoides (Radwan *et al.*, 2021). Los fitocannabinoides más abundantes en la *Cannabis sativa* son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Figura 7c), responsable de generar los efectos psicotrópicos; los siguientes dos compuestos mayoritarios no psicoactivos son el Cannabidiol (CBD) y el Cannabigerol (CBG) (Figura 7b, 7d respectivamente) (Cassano *et al.*, 2020). Las diferencias entre dichas moléculas radican en su estructura química, la cual se describe como una estructura terpenofenólica de veintiún átomos de carbono, con un fragmento común que incluye un anillo de dibenzopirano y una cadena de alquilo hidrofóbica. La variedad de fitocannabinoides surge de las diferencias en los sustituyentes y la estereoquímica de las tres subunidades estructurales: el residuo de isopropenilo en la parte terpenoide (A), el núcleo de resorcinol (B), y la cadena lateral de alquilo (Figura 7a) (Franco *et al.*, 2021). Los fitocannabinoides tienen relevancia médica una vez que son consumidos e ingresan al cuerpo, ya que llevan a cabo sus funciones a través del sistema endocannabinoide.

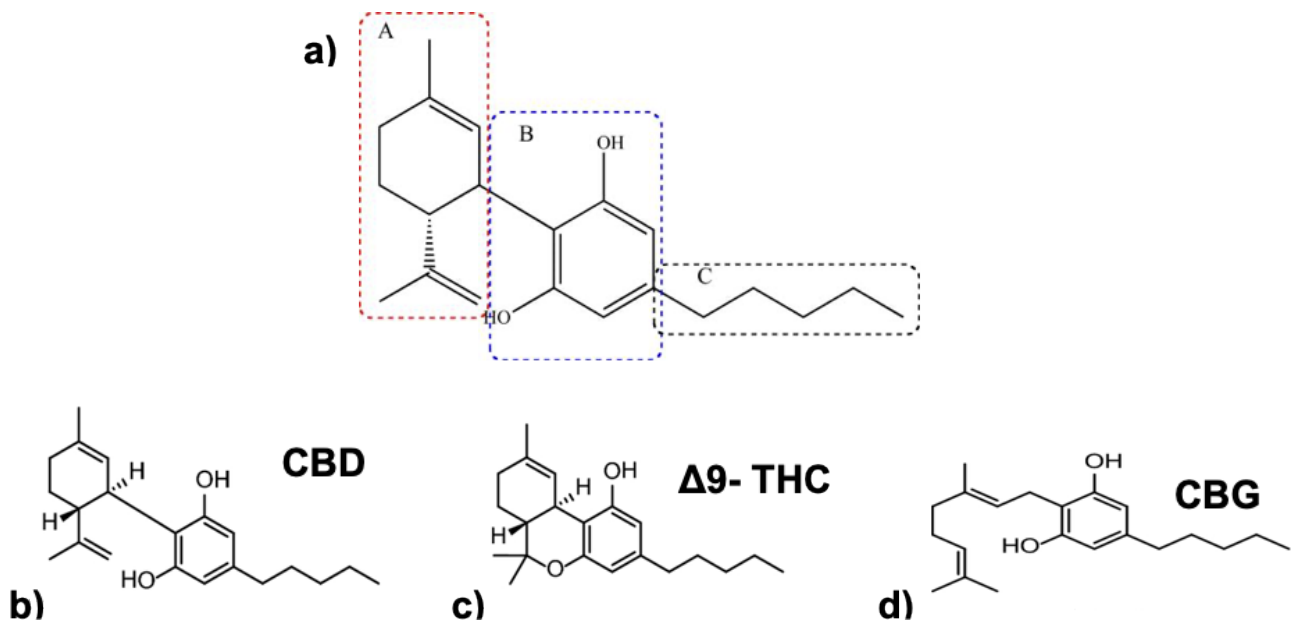


Figura 7. a) Estructura química de los fitocannabinoides mayoritarios en la planta Cannabis. a) Se observa el esqueleto de 21 carbonos con tres fragmentos estructurales: el residuo de isopropenilo en la parte terpenoide (A), el núcleo de resorcinol (B), y la cadena lateral de alquilo. b) Estructura de cannabidiol; c) Estructura de Δ^9 -Tetrahidrocannabinol; d) Estructura del cannabigerol. Figura tomada y modificada de Franco *et al.*, 2021b & Anokwuru *et al.*, 2022.

1.11 Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide se ha descrito como una red de señalización neuromoduladora compuesta por tres elementos principales: 1) ligandos endógenos, 2) receptores a endocannabinoides (CB1R y CB2R) y 3) proteínas, con función de transportar, sintetizar o degradar a los endocannabinoides (Lu & Mackie, 2016).

Los ligandos endógenos, también llamados endocannabinoides (eCBs), son sustancias que se producen dentro del cuerpo humano a partir de sustancias lipídicas que derivan del ácido araquidónico. Los principales endocannabinoides descritos son el araquidonoil etanolamida, también conocida como anandamida (AEA) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG), los cuales se sintetizan y se liberan bajo demanda, y en respuesta al aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Di Marzo *et al.*, 1998).

Los receptores del sistema endocannabinoide son el receptor CB1 y el receptor CB2, que son proteínas de 7 dominios transmembranales acoplados a proteína G. En el caso del receptor CB1 se encuentra acoplado a proteínas G inhibitorias (G_{ai}), el cual al ser activado desencadena una inhibición de la liberación de neurotransmisores presinápticos por medio de la inhibición de la enzima adenil ciclasa (AC) (Figura 8) (Di marzo *et al.*, 2015). Estos receptores se distribuyen en una variedad de tejidos y órganos, su densidad en algunos casos depende de las condiciones fisiológicas o patológicas. El CB1R se encuentra en el sistema nervioso central en axones y terminales presinápticas, en amígdala y en corteza, además de situarse también en hipocampo y en células gliales (Hu *et al.*, 2012), mientras que el CB2R se encuentra en diferentes poblaciones de células inmunes desempeñando un papel en las reacciones inmunitarias (Walter & Stella, 2004).

La síntesis de la anandamida ocurre por una vía biosintética directa, que consiste en una hidrólisis en un solo paso de *N*-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), por la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD), hacia anadamida. Mientras tanto, el 2-AG se sintetiza por la acción de una fosfolipasa C (PCL), dando como producto a 1,2-diacilglicerol (DAG), que a su vez, se convierte en 2-AG por acción del diacilglicerol lipasa (DAGL) (Di Marzo & Piscitelli, 2015b). En cuanto a su degradación, las enzimas encargadas de realizar

esta actividad son la amida hidrolasa de ácidos grasos y la monoacilglicerol lipasa (FAAH y MAGL respectivamente) (Figura 8).

La señalización de endocannabinoides es retrógrada, es decir que la síntesis y liberación de eCBs sucede en la neurona post-sináptica y la interacción con los receptores específicos sucede en la pre-sinapsis. Una vez liberados los eCBs, tendrán interacción con los receptores específicos CB1 y CB2, que son proteínas transmembranales acoplados a proteína G (Di marzo *et al.*, 2015) (Figura 8).

Se ha demostrado que los fitocannabinoides, como el CBD, ejercen acciones terapéuticas a través del sistema endocannabinoide en diversas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson (Costa *et al.*, 2022), pero recientemente se ha demostrado que puede ser una alternativa para el control de las crisis convulsivas en la epilepsia (Koo & Kang, 2017).

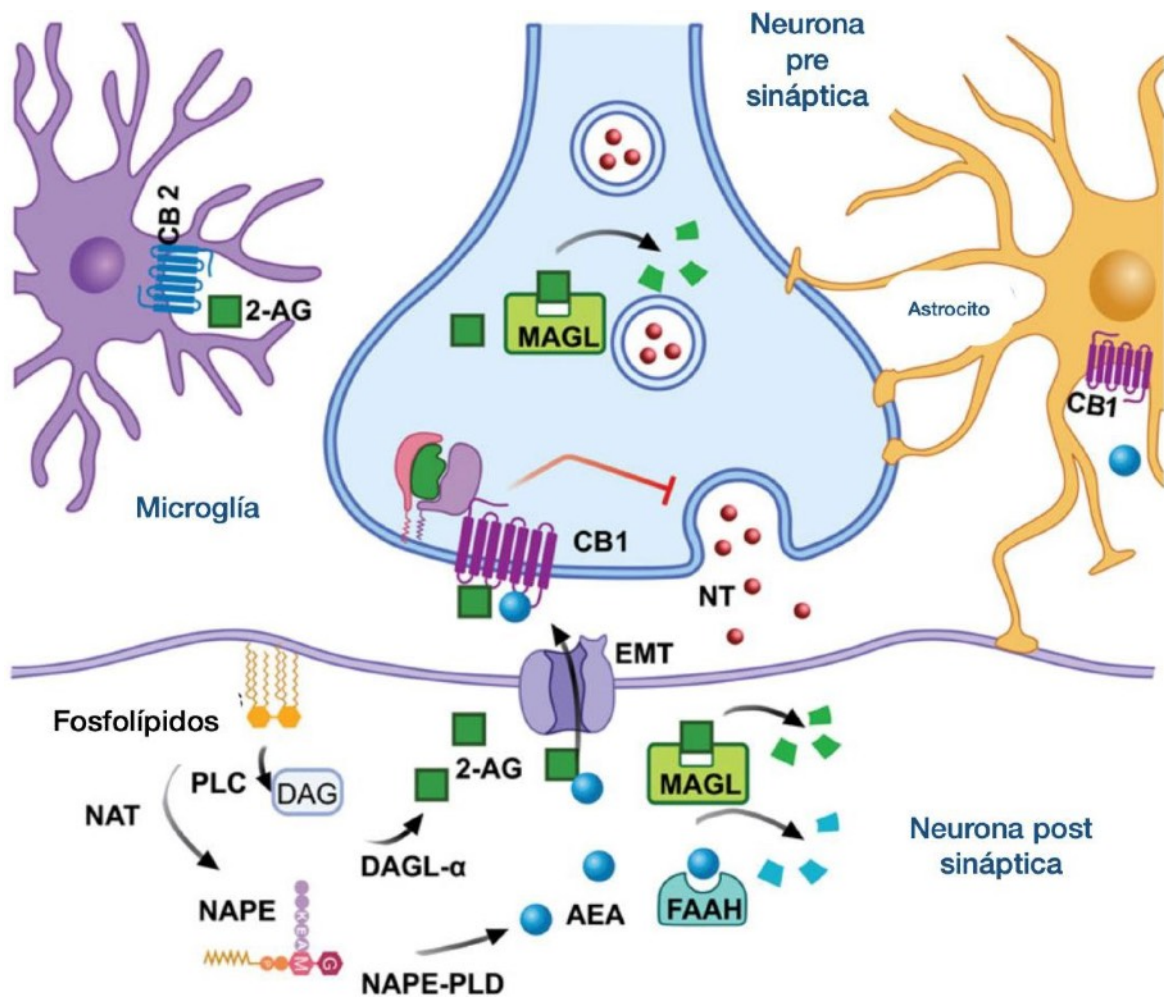


Figura 8. Síntesis y señalización de AEA y 2-AG. La figura muestra la señalización retrógrada de AEA y 2-AG y su síntesis a partir de fosfolípidos de membrana. La AEA se sintetiza por medio de la interacción de fosfolípidos de membrana con NAT (N-aciltransferasa) para la formación de NAPE (N-acil fosfatidil etanolamina), que por medio de la NAPE-PLD (fosfolipasa D específica de NAPE) se produce AEA (anandamida). Una vez sintetizada la AEA, pasará al espacio sináptico por medio del EMT y realizará su interacción con los receptores CB1, involucrados en la inhibición de neurotransmisores (NT). Una vez realizada su actividad, la AEA es degradada por la FAAH (amida hidrolasa de ácidos grasos). Figura tomada y modificada de Patricio *et al.*, 2020.

1.12 Cannabidiol como alternativa terapéutica en las crisis convulsivas y en la neuroinflamación

A pesar de que los tratamientos actuales han logrado grandes avances, los pacientes epilépticos refractarios continúan presentando convulsiones persistentes y con ello los procesos negativos como neuroinflamación, excitotoxicidad y muerte neuronal. Se considera que un paciente presenta epilepsia refractaria cuando hay un fracaso, durante el tratamiento, con al menos dos fármacos antiepilépticos adecuadamente elegidos (Kwan *et al.*, 2009).

En estudios experimentales de crisis agudas en murinos, inducidas por pilocarpina, penicilina y pentilentetrazol se ha demostrado el efecto anticonvulsivo del CBD a dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, donde se observa una disminución en la gravedad de las convulsiones y en la mortalidad (Jones *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2022; Jones *et al.*, 2009). No obstante, existe poca información sobre el efecto del CBD sobre la neuroinflamación en la epilepsia. En este contexto, el cannabidiol (CBD) surge como una molécula de interés y una alternativa terapéutica prometedora debido a que existen registros de sus propiedades moduladoras sobre la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la actividad neuronal en enfermedades como el Parkinson, Alzheimer y modelos de neuroinflamación inducida con lipopolisacárido (LPS) (Atalay *et al.*, 2019).

Se plantea la hipótesis de que el CBD podría estar involucrado en la reducción y propagación de las crisis convulsivas a través de sus múltiples dianas terapéuticas, que involucran mecanismos dependientes e independientes de los receptores a cannabinoides (Figura 9). Algunas de estas dianas son el CB1R que al tener interacción con el CBD mantiene la homeostasis iónica y modula la liberación de glutamato. Asimismo, el receptor TRPV1 se involucra en la afluencia de calcio en la célula, de manera que, al interactuar el CBD con él, desfosforila y desensibiliza a los canales de Ca^{2+} , lo que conlleva a una disminución de la entrada de este ion y, por lo tanto, a una reducción de la liberación de neurotransmisores (Senn *et al.*, 2020). De la misma manera, el receptor GPR55, expresado principalmente en las neuronas excitadoras del giro dentado, al ser activado promueve la excitabilidad neuronal y la liberación de glutamato, pero su interacción antagónica con el CBD promueve la disminución de su actividad (Senn *et al.*, 2020).

Por otro lado, otras dianas han sido descritas como parte del perfil antiinflamatorio del CBD, tal es el caso del CB2R que regula la liberación de citocinas proinflamatorias en la microglía (Atalay *et al.*, 2019). O bien el receptor PPAR γ , un factor de transcripción que al trasladarse al núcleo, suprime la activación de factores de transcripción que inducen respuestas inflamatorias como NF- κ B. Finalmente pero no menos importante, el CBD inhibe la actividad enzimática de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que es responsable de la degradación de la AEA. La inhibición de esta enzima permite el

aumento de las concentraciones de AEA en el espacio sináptico, permitiendo que actúe como un agonista de los receptores cannabinoides, teniendo una actividad inhibitoria de la liberación de neurotransmisores a través de los CB1R y una regulación de la liberación de citoquinas a través de los CB2R, ubicados en la microglía (Atalay *et al.*, 2019; Bisogno *et al.*, 2001).

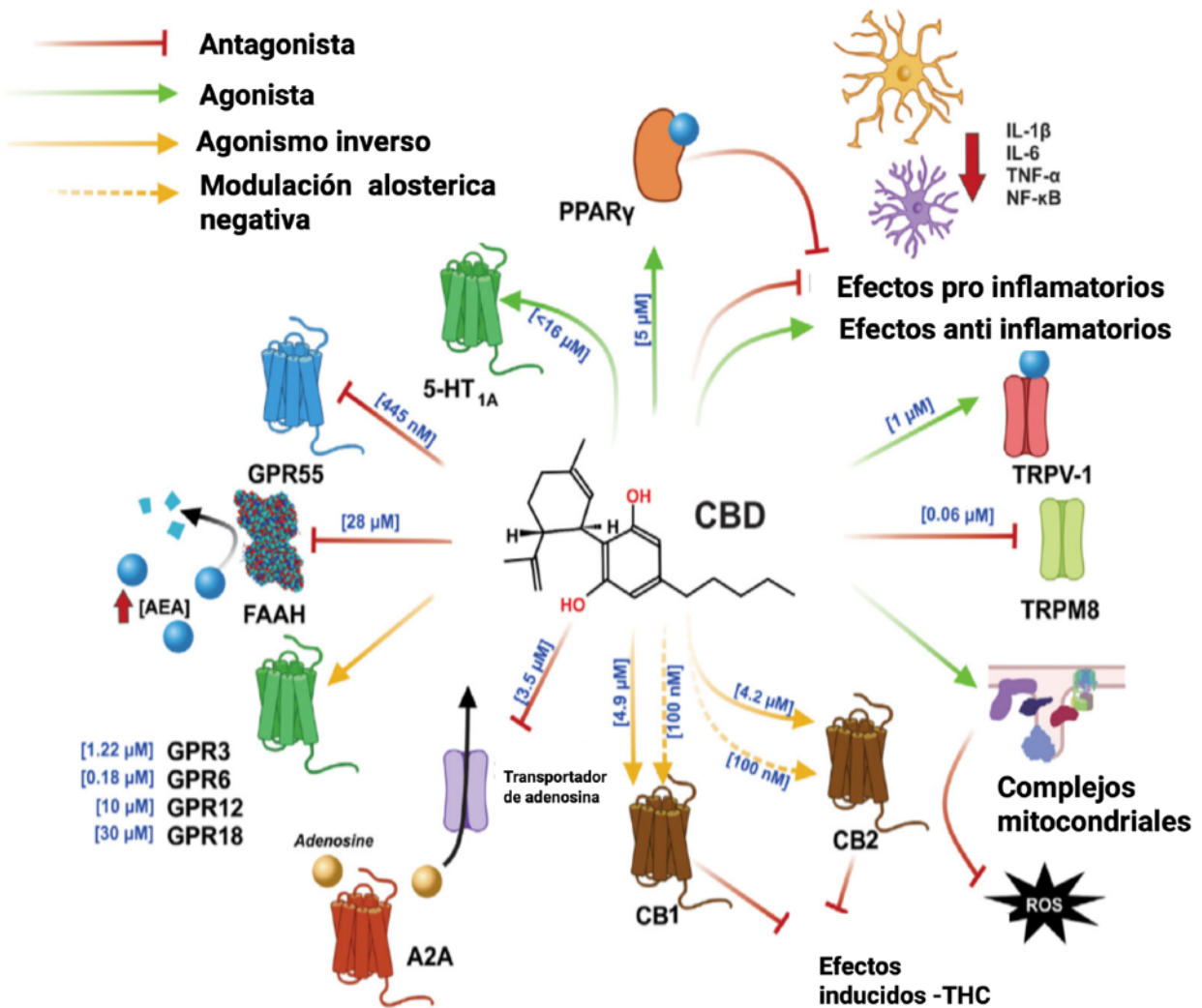


Figura 9. Dianas terapéuticas del CBD. Se observa al CBD como una molécula pleiotrópica con capacidad de inducir diferentes efectos de acuerdo a la diana a la que se una. Figura tomada y modificada de Patricio *et al.*, 2020.

1.13 URB-597 como molécula antiinflamatoria

El URB-597 o KDS- 4103 es un compuesto desarrollado para estudiar al sistema endocannabinoide a través de la modulación indirecta de los niveles de anandamida por medio de la inhibición selectiva de la FAAH. Se ha descrito por medio de experimentos *in vivo* que el UBR-597 alcanza su efecto máximo de inhibición a los 15 minutos posterior a la administración, manteniendo este efecto durante 16 h (Figura 10a). Estos resultados contrastan con las concentraciones de anandamida que incrementan a los 30 minutos posteriores a la administración y disminuyen a las 16 h (Figura10b). Así, la acumulación de anandamida en el espacio sináptico de las neuronas permite la activación de los receptores endocannabinoides CB1 y CB2, responsables de las propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias (Fegley *et al.*, 2004b).

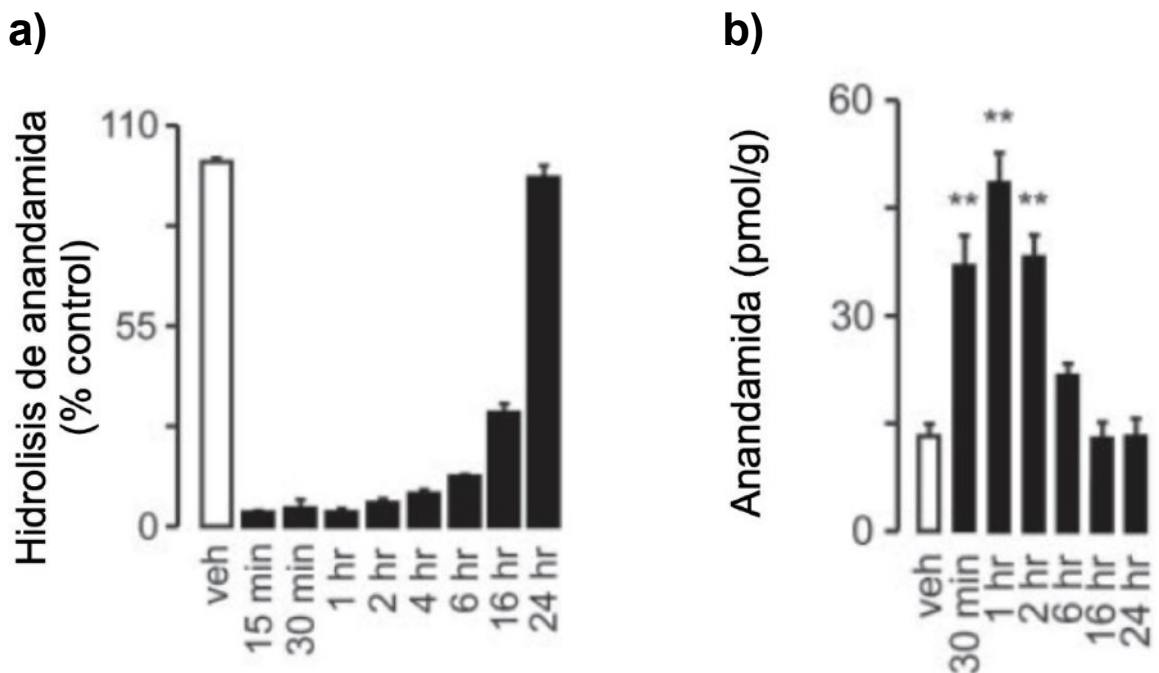


Figura 10. URB-597 aumenta los niveles de AEA cerebral al inhibir la FAAH. Administración sistémica de URB597 (0,3 mg/kg i.p.). a) La inhibición enzimática alcanzó un valor máximo dentro de los 15 minutos de la administración del fármaco y persistió durante al menos 16 h. b) Este efecto se asoció con un aumento paralelo en el contenido de anandamida cerebral, que alcanzó niveles máximos de 1 a 6 h después de la inyección.

Un trabajo en el que se estudió el efecto antiinflamatorio del URB-597, es el trabajo realizado *in vitro* de Standoli *et al.*, (2023) donde se midió la expresión del mRNA de TNF α e IL-1 β , moléculas asociadas a procesos inflamatorios, en células de microglía BV2 de ratón tratadas con LPS (100 ng/mL) y con URB-597. El tratamiento con LPS aumenta la expresión del mRNA de TNF α e IL-1 β indicando procesos inflamatorios presentes mientras que el tratamiento con URB-597 disminuye considerablemente su expresión (Figura 11).

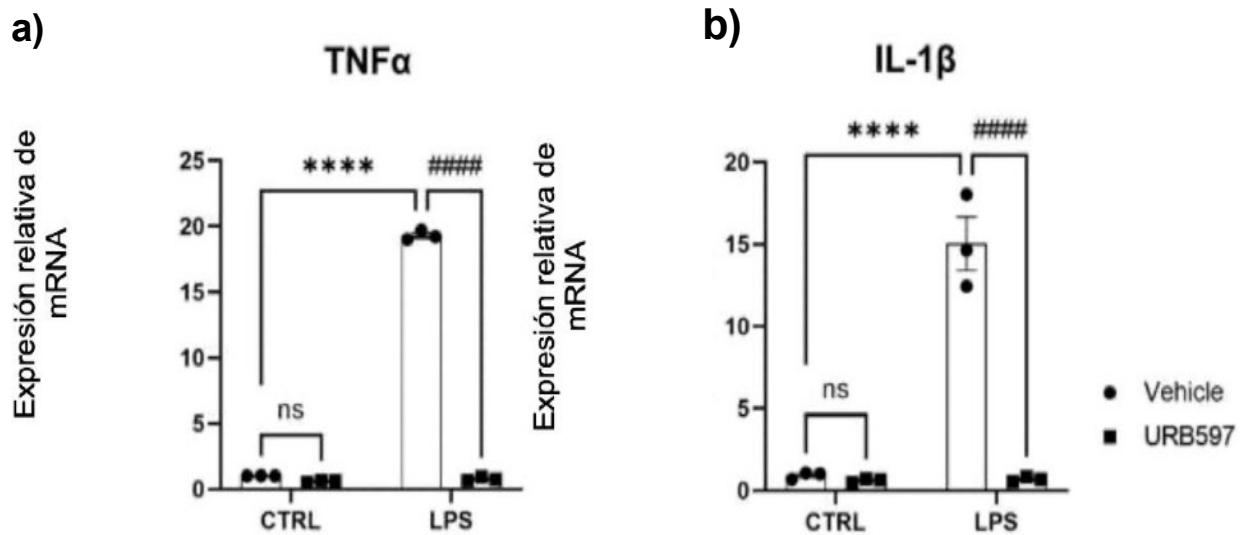


Figura 11. Inhibición de la inflamación inducida por LPS. a) Expresión relativa de ARNm de TNF α en un grupo tratado con LPS y con URB-597, b) Expresión relativa de ARNm de IL-1 β en un grupo tratado con LPS y URB-597. Figura tomada y modificada de Standoli *et al.*,2023.

La gran cantidad de evidencia sobre el URB597 como una molécula antiinflamatoria ha permitido su uso como una molécula control que compara los efectos de la inhibición de la FAAH con otros tratamientos dirigidos a la modulación del sistema endocannabinoide por lo que su uso establece un punto de comparación sólido frente a otros tratamientos.

2. Justificación

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes, que afecta alrededor del 1% de la población mundial. Entre sus diversas formas, la epilepsia refractaria, representa un desafío significativo, ya que al menos el 30% de pacientes con actividad epiléptica, no responden adecuadamente a los tratamientos farmacológicos convencionales (Ono & Galanopoulou, 2012). La falta de control sobre las crisis convulsivas conlleva a graves consecuencias, incluyendo deterioro cognitivo, discapacidad funcional y una mayor predisposición a la neurodegeneración. Asimismo, las crisis convulsivas provocan una cascada de eventos patológicos a nivel de sistema nervioso central como excitotoxicidad, neuroinflamación, estrés oxidativo y en última instancia muerte neuronal. Estas alteraciones han sido el foco de diversas investigaciones que buscan desarrollar nuevas estrategias terapéuticas capaces de mitigar tanto la sintomatología epiléptica como los procesos neurobiológicos subyacentes.

La administración de PTZ ha demostrado ser una herramienta confiable para promover los cambios neurológicos y bioquímicos observados en la epilepsia humana. Debido a su capacidad para replicar estados de hiperexcitabilidad neuronal y neuroinflamación, este modelo resulta ideal para evaluar la eficacia de nuevos tratamientos farmacológicos, incluyendo en cannabidiol (CBD) (Łukawski & Czuczwar, 2023; Zhu *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2022).

En este contexto, el sistema endocannabinoide ha cobrado interés en la investigación científica, ya que se describe como un sistema de señalización prohomeostático, que puede operar en cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales de la microglía y los astrocitos, además de contrarrestar los procesos neuroinflamatorios que ocurren en diversas enfermedades neurodegenerativas. Se ha propuesto que el CBD, un compuesto derivado de *Cannabis Sativa L.*, ejerce efectos anticonvulsivos en varios modelos de convulsiones experimentales y estudios clínicos, actuando a través de vías dependientes e independientes a los receptores cannabinoides (Jones *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2022). Además, el CBD ha mostrado propiedades neuroprotectoras y antiinflamatorias, por lo que es importante establecer su eficacia como una alternativa prometedora para

enfermedades neurológicas, incluida la epilepsia. Por otra parte, el URB-597 es una molécula caracterizada por sus efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la FAAH, de manera que su uso en este estudio pretende comparar su acción con el CBD sobre la astrogliosis pero además observar su efecto en la intensidad de las crisis. Esto debido a la relación existente entre la hiperexcitabilidad y la neuroinflamación. Sin embargo, aún es necesario comprender en mayor profundidad su impacto sobre la neuroinflamación mediada por astrocitos y su capacidad para modular la intensidad de las crisis convulsivas.

Por ello, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del CBD sobre la intensidad de las crisis convulsivas y la neuroinflamación mediada por astrocitos en un modelo de epilepsia generalizada aguda inducida con PTZ. Aunado a ellos, este trabajo busca generar un aporte en el conocimiento sobre los efectos que tiene el CBD en las crisis convulsivas y la neuroinflamación en un modelo de epilepsia generalizada aguda inducida con PTZ.

3. Hipótesis

La administración de cannabidiol disminuye la intensidad y la frecuencia de las crisis convulsivas, así como la actividad astrocítica, en ratas tratadas con pentilentetrazol.

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar el efecto del cannabidiol sobre la generación de crisis convulsivas y la activación astrocítica, en ratas tratadas con pentilentetrazol.

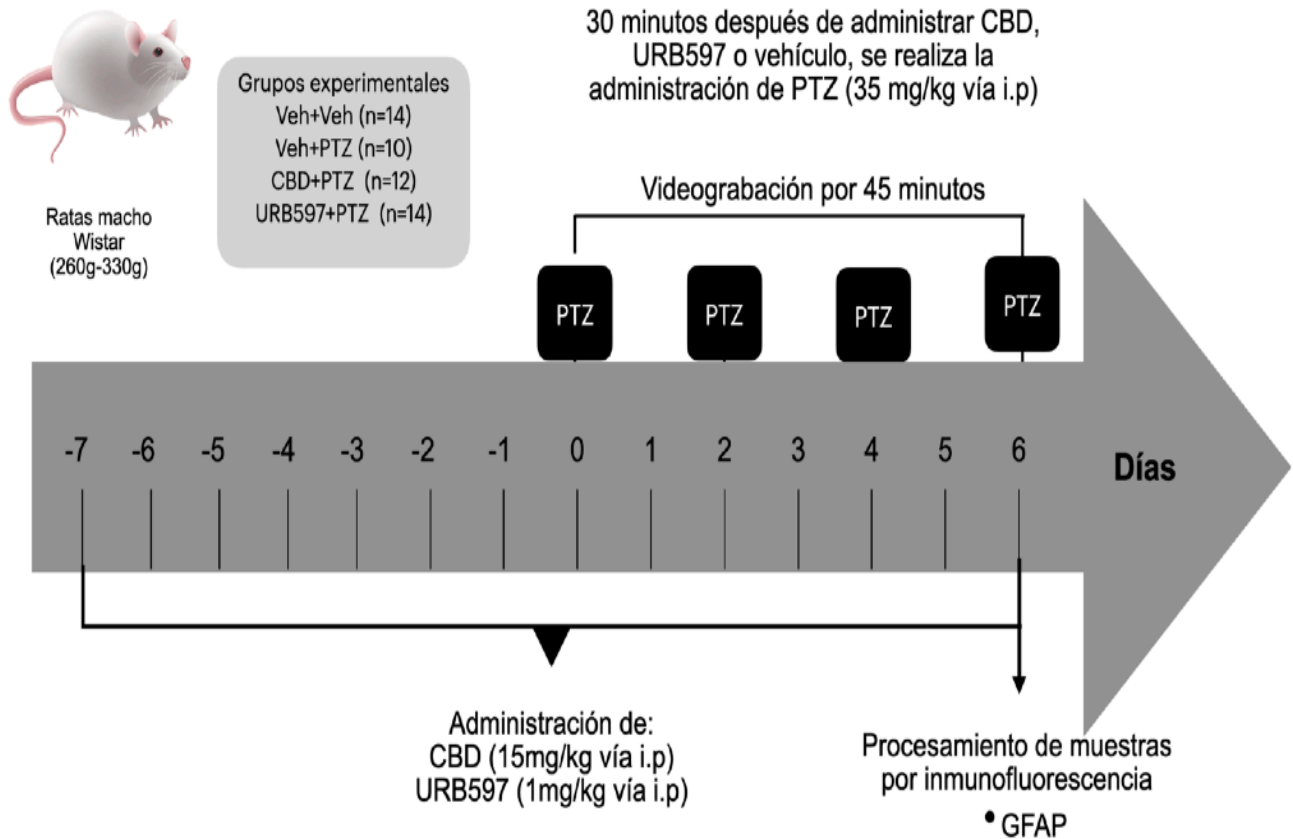
4.2 Particulares

4.2.1 Estudiar el efecto de la administración de cannabidiol sobre la intensidad y la frecuencia de las crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol mediante la escala de Racine.

4.2.2 Estudiar el efecto de la administración de cannabidiol sobre la activación astrocítica en el hipocampo y en la amígdala en ratas tratadas con pentilentetrazol, mediante la cuantificación del porcentaje de área teñida de GFAP medido por inmunofluorescencia.

5. Materiales y métodos

5.1 Diagrama de trabajo



5.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 50 ratas macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad (260-330g) provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales fueron agrupados en cuatro grupos experimentales: VEH+VEH (n=14); VEH+PTZ (n=10); CBD+PTZ (n=12) y URB-597+PTZ (n=14). Además, se mantuvieron en el vivario del Laboratorio de Neurofarmacología en grupos de 3 animales por caja, con acceso a agua y a alimento *ad libitum*. Las condiciones ambientales se mantuvieron controladas, con un ciclo de luz- oscuridad 12h/12h y temperatura de 22 ± 1 °C.

Todos los procedimientos se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Además, la

sustentante cursó y aprobó el curso de manejo y vías de administración en rata de laboratorio, impartido por el bioterio Claude Bernard de la BUAP.

5.3 Preparación y administración de fármacos

5.3.1 Cannabidiol (CBD)

El CBD (Hemp Meds ® México) se disolvió en un vehículo compuesto por etanol al 100%, Tween 20 y solución salina isotónica (SSI, cloruro de sodio al 0.9%) en una relación 1:1:8. Los animales recibieron una administración vía intraperitoneal de CBD a una dosis de 15 mg/kg durante 14 días consecutivos. El grupo control recibió exclusivamente el vehículo en las mismas condiciones de administración.

5.3.2 URB-597

El inhibidor de la FAAH, URB597 (Sigma-Aldrich), fue disuelto en un vehículo compuesto de dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 20 y solución salina isotónica (SSI, cloruro de sodio al 0.9%) en una relación 1:2:7. Su administración se realizó vía intraperitoneal a una dosis de 1 mg/kg durante 14 días, aplicándolo 30 minutos antes de la administración del agente convulsivante.

5.3.3 Pentilentetrazol (PTZ)

El PTZ (Sigma-Aldrich) se disolvió en solución salina isotónica (SSI, cloruro de sodio al 0.9%) y se administró a una dosis subconvulsiva de 35mg/kg. La administración se realizó durante días alternos a partir de octavo día desde el inicio del experimento, completando un total de cuatro días.

5.4 Evaluación de crisis convulsivas

Posterior a la inducción de crisis convulsivas, los animales fueron videograbados durante 45 minutos mediante una cámara de 48 megapíxeles f/1.79 de un Redmi Note 11. Los vídeos obtenidos fueron analizados posteriormente utilizando la escala de Racine para evaluar la intensidad de las crisis convulsivas (Tabla 1).

La escala de Racine utilizada para este estudio fue la propuesta por Lüttjohann, con modificaciones para este estudio, clasificando los cambios de comportamiento, de acuerdo a la escala de Racine modificada, en seis etapas: (0) sin respuesta a PTZ; (1)

piloerección, movimiento de vibrisas y sacudida de cabeza; (2) sacudidas mioclónicas; (3) clonus de extremidades anteriores; (4) posición de canguro; (5) crisis tónico clónico; (6) salto salvaje y muerte.







Escala de Racine propuesta		
0	Sin PTZ	
1	Piloerección, movimiento de vibrisas, guiño de ojo, movimiento y sacudida de cabeza	
2	Sacudidas mioclónicas	
3	Clonus de extremidades anteriores	
4	Posición de canguro	
5	Crisis tónico-clónica con pérdida de postura	
6	Salto salvaje y muerte	

Tabla 1. Representación gráfica de los seis estadios de la escala de Racine modificada. Esta escala representa la progresión de la intensidad de las crisis convulsivas, de la menos intensa a las más agresivas Lüttjohann *et al.*, 2009.

5.5 Eutanasia y preparación de tejidos cerebrales

Se realizó la eutanasia a los animales posterior a los 14 días de tratamiento (CBD/ URB-597) con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg, i.p) para realizar después una perfusión por punción intracardiaca de 150 ml de solución salina isotónica (SSI,

cloruro de sodio al 0.9%), para eliminar restos sanguíneos y posteriormente con 100 ml de paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) para la fijación de tejidos. Se realizó la extracción de los cerebros y se resguardaron en frascos con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) durante 72 horas para posteriormente intercambiarla por una solución de sacarosa al 15% + azida 0.1% en PBS (pH 7.4) para su almacenamiento a 4°C.

Posteriormente se realizaron cortes coronales secuenciales de 50 µm de grosor en un vibratomo (VT1000 Leica Germany). Los tejidos se resguardaron en placas de 24 pozos con una solución de sacarosa al 15% + azida 0.1% en PBS (pH 7.4) a una temperatura de 4°C. Se seleccionaron 3 cortes de cada región para el análisis de GFAP.

5.6 Inmunofluorescencia

Los tejidos seleccionados se colocaron individualmente en placas de 24 pozos para su tratamiento. Se realizaron 3 lavados consecutivos de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón X-100 (Tx, Sigma- Aldrich) al 0.3%, después se incubó durante 60 minutos con albúmina de suero bovino libre de IgG (Sigma Aldrich) al 2% en PBS-Tx y se removió con 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tx. Posteriormente, se colocó el anticuerpo Anti-GFAP a una dilución de 1/500 en PBS-Tx+Albúmina durante 48 horas a 4°C. Al finalizar la incubación, se retiró el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tx y se incubó el segundo anticuerpo específico acoplado a Rodamina- X-Red durante 120 minutos. En seguida, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tx y los tejidos se incubaron durante 60 minutos con el marcador nuclear 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10000 en PBS y se eliminó con 3 lavados en PBS.

Finalmente se montaron los tejidos en portaobjetos gelatinizados, se eliminó el exceso de PBS para cubrir y sellar con la resina y el protector de fluorescencia (MOWIOL+ DABCO, Sigma- Aldrich). Las muestras se dejaron secar en completa oscuridad y finalmente se almacenaron, protegidas de la luz, a 4°C hasta su visualización por microscopia de fluorescencia.

5.7 Obtención y análisis de las imágenes por fluorescencia

La observación de la marca de fluorescencia, GFAP, se llevó a cabo en un microscopio

de fluorescencia 1000 LED (Leica), el cual está acoplado a una cámara digital (ProgRes C14 plus). Se hizo uso de un filtro azul con el que se identificaron los núcleos, mientras que con el filtro rojo se identificó la inmunorreactividad de GFAP. La captura de las fotomicrografías se realizó con el programa Jenoptik Capture Pro con el objetivo de 20X.

El análisis histológico consistió en la cuantificación del porcentaje de área teñida para GFAP con una macro ejecutada en Image J. Se establecieron con 5 fotomicrografías al azar con GFAP de tal manera que solo se detectó la marca fluorescente (Figura 12).

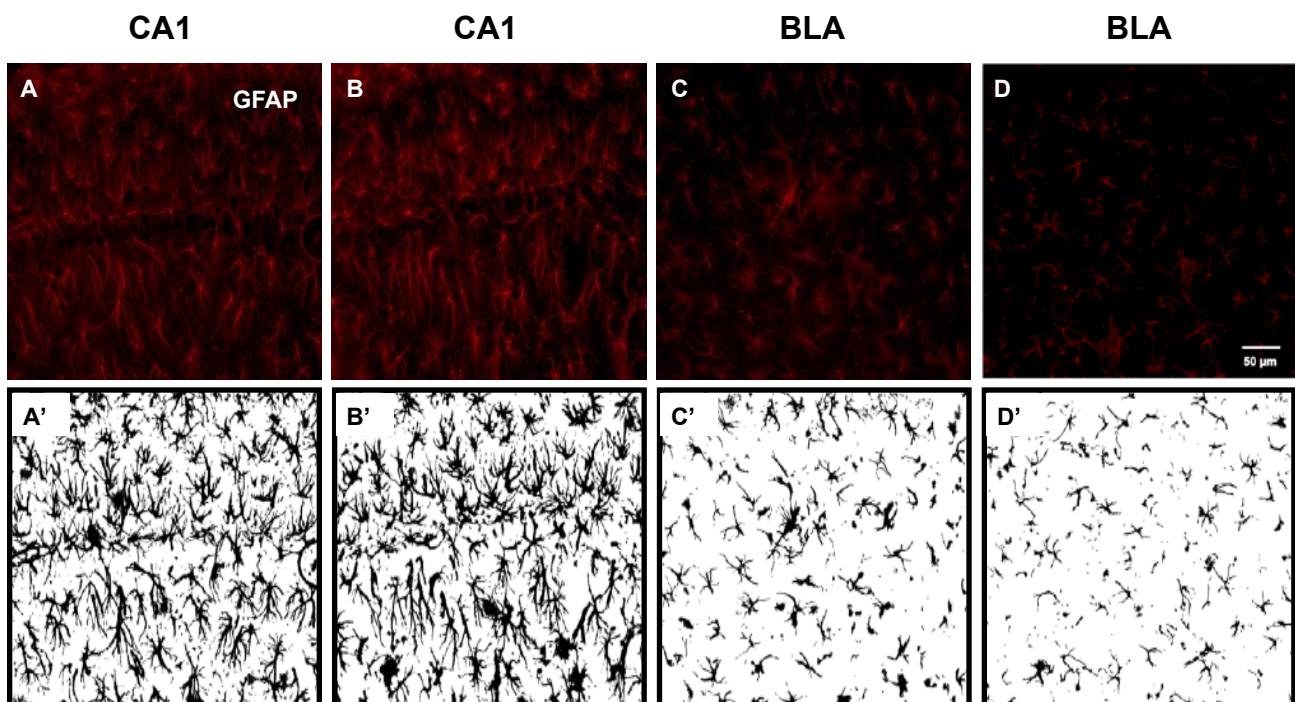


Figura 12. Identificación del área con inmunorreactividad a través de máscaras. En la fila superior izquierda (A,B) se observa la marca positiva a GFAP en la región CA1 de hipocampo mientras que del lado derecho superior (C,D) corresponde a la BLA. En la fila inferior se observa la máscara correspondiente a cada imagen, tanto de CA1 como de BLA (A'-D').

5.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, con un intervalo de confianza del 95%. Para el análisis de las diferencias significativas entre grupos experimentales en la intensidad de las crisis convulsivas y en el porcentaje de área teñida para GFAP, se hizo uso de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, tomando en cuenta que estas variables cumplen con la

distribución normal. Posteriormente se realizó un post-test de Tukey para la intensidad de las crisis y un post-test de Bonferroni para el porcentaje de área. Para el análisis de la frecuencia de las crisis convulsivas mioclónicas y tónico-clónicas se hizo análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, teniendo una distribución normal, seguida un post-test de Bonferroni's. Para el análisis de la latencia a la primera crisis mioclónica y tónico-clónica se empleó una prueba de Kruskal -Wallis, seguida de un análisis de comparaciones múltiples de Dunn. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism, versión 10.4.1.

6. Resultados

6.1 La administración de Cannabidiol o URB-597 disminuye la intensidad de las crisis convulsivas

Los tratamientos con CBD o URB597 se realizaron durante 7 días previos y posteriores a la administración de PTZ. El análisis de las crisis convulsivas se realizó utilizando la escala de Racine. Los resultados muestran que el grupo administrado con VEH+PTZ induce crisis convulsivas que van desde la escala 1, la cual involucra movimientos de bigotes, guiños de ojo y sacudidas de cabeza, hasta convulsiones del estadio 4, como la posición de canguro. Mientras que el grupo VEH+VEH no presentó crisis convulsivas. Al evaluar las crisis que presentan los grupos CBD+PTZ (media 3.3) y el grupo URB597+PTZ (media 3.0), se observa una disminución de un 20% ($+p \leq 0.05$) y de un 27% ($+++p \leq 0.001$) con respecto al grupo VEH+PTZ (media 4.1). Es importante mencionar, que en los grupos con ambos tratamientos solo se presentaron crisis de clonus de extremidades anteriores que corresponden al estadio 3 de la escala de Racine (Figura 13).

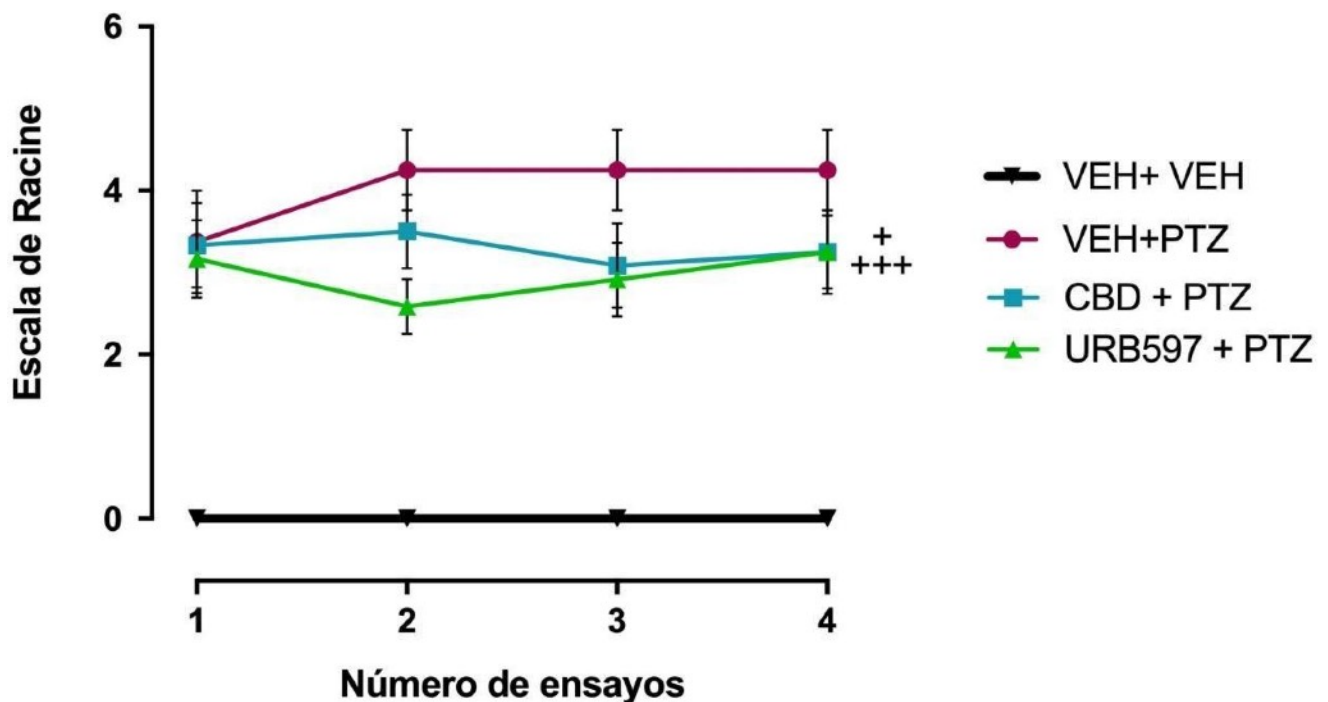


Figura 13. El tratamiento con CBD o URB597 disminuyen la intensidad de las crisis convulsivas. Se grafica la intensidad de crisis convulsivas que van desde la escala 1 a la 6 con respecto al número de ensayos realizados durante la administración de CBD o URB597 en ratas administradas con PTZ. Se muestra el promedio \pm EEM (ANOVA de una vía con un post-hoc Tukey. $+p \leq 0.05$, $+++p \leq 0.001$ vs VEH+PTZ).

6.2 La administración de CBD o URB-597 no disminuye la frecuencia de crisis tónico-clónicas y mioclónicas

Al evaluar la frecuencia de las crisis tónico-clónicas de cada grupo experimental, se observó que el grupo VEH+VEH no presenta crisis tónico-clónicas, sin embargo, el grupo VEH+PTZ presenta una media de 0.69, mientras que los grupos CBD+PTZ y URB597+PTZ presenta una media 0.38 y una media 0.31, respectivamente. Al realizar el análisis estadístico entre los grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas (Figura 14a). De la misma manera, al evaluar la frecuencia de las crisis mioclónicas se observó que el grupo VEH+VEH no presentó este tipo de crisis, mientras que el grupo VEH+PTZ muestra crisis mioclónicas, con una media de 67, los grupos CBD+PTZ y URB+PTZ muestran una media de 51 y una media de 47, respectivamente. Al realizar el análisis estadístico entre los grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas (Figura 14b).

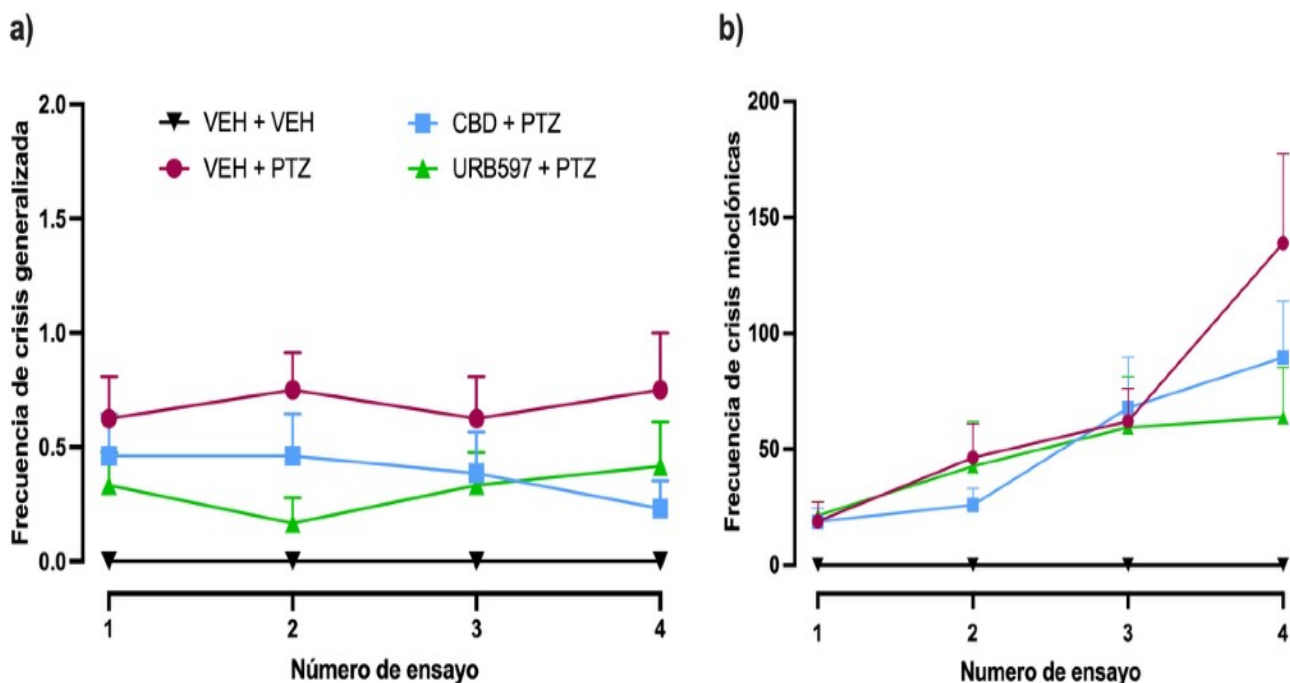


Figura 14. El tratamiento con CBD o URB-597 no modifica la frecuencia de crisis tónico-clónicas o mioclónicas. a) Se muestra la frecuencia de las crisis tónico-clónicas con respecto al número de ensayos realizados. Las crisis se evaluaron durante 45 minutos posterior a la administración de PTZ de todos los grupos experimentales. Se muestra el promedio \pm EEM (Kruskal Wallis con un post-hoc de Dunn's sin mostrar diferencias significativas.) b) Se muestra la frecuencia de las crisis mioclónicas con respecto al número de ensayos realizados. Se muestra el promedio \pm EEM (ANOVA de una vía con un post-hoc Bonferroni's) sin mostrar diferencias significativas.

6.3 La administración de CBD o URB-597 no modifica la latencia a la primera crisis tónico- clónica y la latencia a la primera crisis mioclónica

Al evaluar la latencia a la primera crisis tónico-clónico en cada grupo experimental, se observó que el grupo VEH+VEH no presentó crisis tónico-clónico, por lo tanto, no presentó latencia a la primera crisis. Por otra parte, el grupo VEH+PTZ muestra una progresión en las latencias durante los primeros tres ensayos (medias: 110, 218, 346) sin continuar con dicho efecto en el cuarto ensayo (media 192). Este comportamiento progresivo no se observa en los grupos CBD+PTZ (medias: 119,143, 103, 273) y URB+PTZ (media 60, 186, 41, 9). El análisis estadístico entre grupos no mostró diferencias significativas.

Al evaluar la latencia a la primera crisis mioclónica, el grupo VEH+VEH no mostró crisis mioclónicas, por lo tanto, no presentó latencia a la primera crisis. Al comparar las medias durante los cuatro ensayos de los grupos VEH+PTZ (media 190, 176, 426, 376), CBD+PTZ (media 166, 426, 393, 302) y URB597+PTZ (media 141, 138, 331, 278) no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 15b).

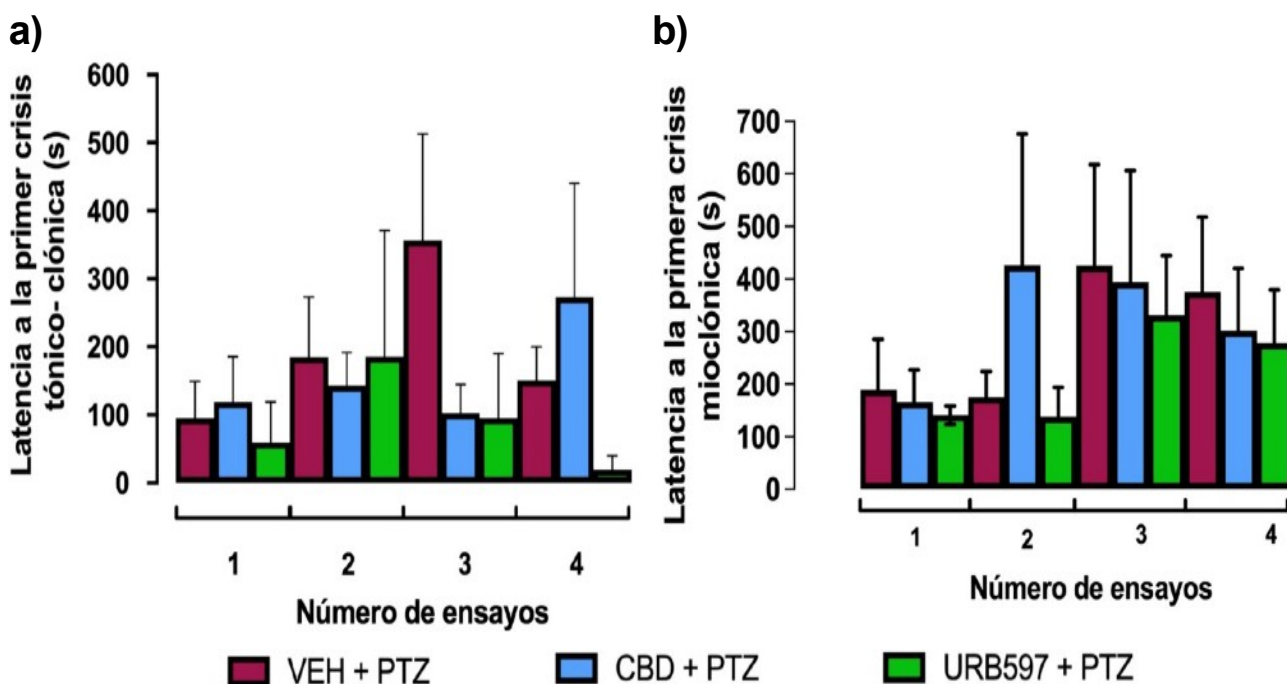


Figura 15. El tratamiento con CBD o URB-597 no modifica la latencia a la primera crisis tónico-clónica y mioclónica. a) Se grafica la latencia a la primera crisis tónico-clónica respecto al número de ensayos realizados. Se muestra el promedio \pm EEM (Kruskal Wallis con un post-hoc de Dunn's sin mostrar diferencias significativas). b) Se grafica la latencia a la primera crisis mioclónica respecto a los ensayos realizados. Se muestra el promedio \pm EEM (Kruskal Wallis con un post-hoc de Dunn's sin mostrar diferencias significativas).

6.4 La administración de CBD o URB-597 disminuye la expresión de GFAP en la región CA1 de hipocampo y en la amígdala basolateral

En la figura 16a y 17a se muestran las fotomicrografías representativas para la inmunorreactividad a GFAP en la región CA1 del hipocampo (Figura 16c) y en la amígdala basolateral (Figura 17c) respectivamente. Se graficó el porcentaje de área teñida de cada grupo experimental. En el grupo VEH+VEH, se muestra una expresión basal de la proteína GFAP (media 26 ± 1.7), mientras que el grupo VEH+PTZ (media 37 ± 2.3) mostró una expresión progresiva pero no significativa. Por otra parte, los grupos CBD+PTZ (media 20 ± 1.6) y URB597+PTZ (media 10 ± 0.5), mostraron una disminución significativa respecto al grupo VEH+VEH (** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$), y al grupo VEH+PTZ (**** $p \leq 0.0001$) (Figura 16b).

En la amígdala basolateral (BLA), el grupo VEH+VEH mostró una expresión basal promedio a la proteína GFAP (media de 16 ± 1.1), similar a lo que mostró el grupo VEH+PTZ (media 17 ± 0.8). Por su parte, los grupos con tratamiento, CBD+PTZ (media 10 ± 0.8) y URB597+PTZ (media 11 ± 1.1), mostraron una disminución significativa respecto al grupo VEH+VEH (*** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$) y al grupo VEH+PTZ(*** $p < 0.001$; + $p < 0.01$) (Figura 17b).

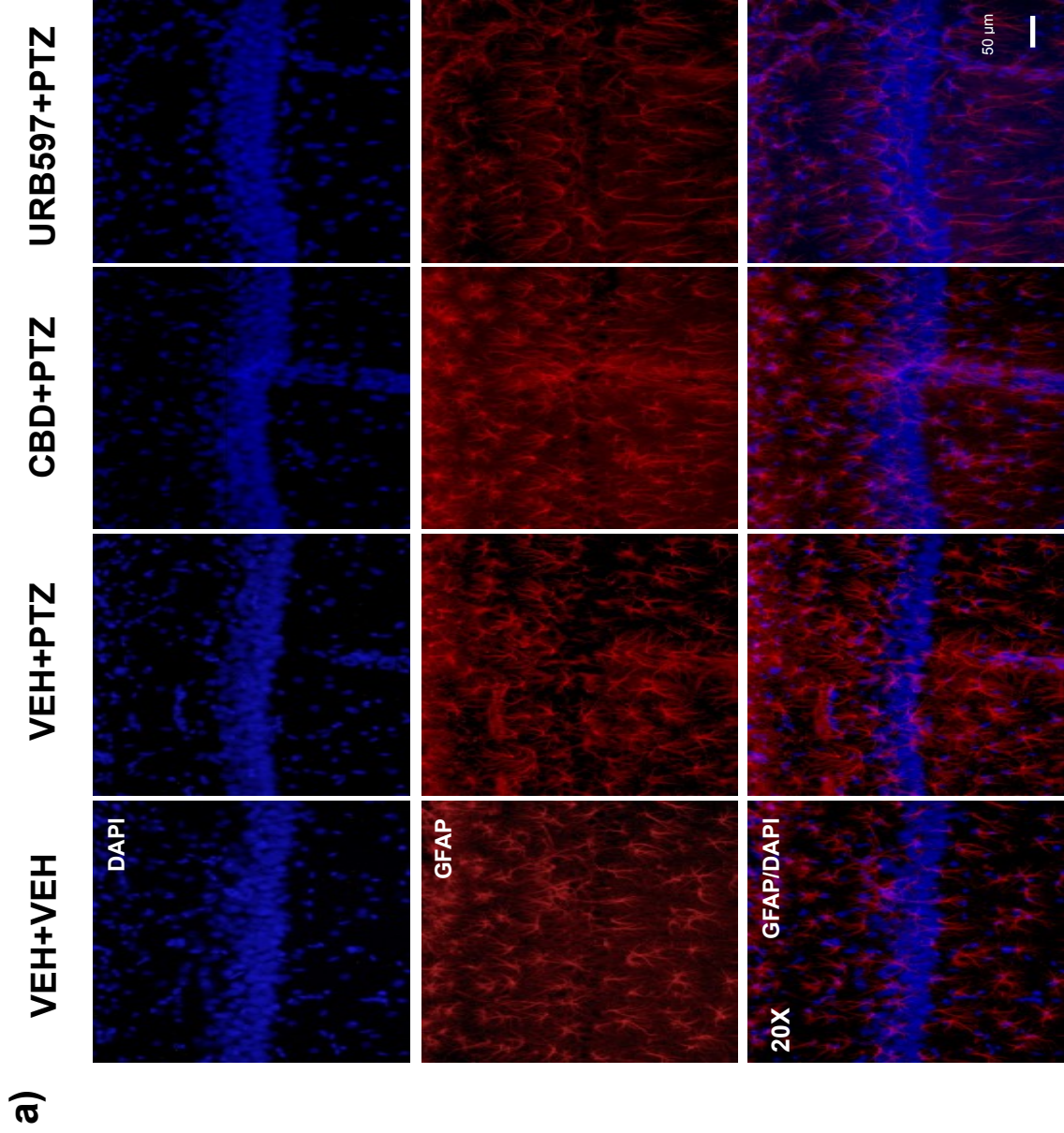


Figura 16. El CBD disminuye el porcentaje de área teñida de GFAP en la región CA1. a) Panel de fotomicrografías representativas del marcador DAPI (azul), de GFAP (rojo) y el empalme (azul y rojo) de los cuatro grupos experimentales (VEH+VEH; VEH+PTZ; CBD+PTZ; URB597+PTZ), tomadas con un objetivo de 20X; barra=50 μ m. b) Porcentaje de área teñida en CA1 de los grupos experimentales. Los valores muestran el promedio \pm EEM (ANOVA p \leq 0.05, post-hoc Bonferroni; ** p \leq 0.01; **** p \leq 0.0001 VEH+VEH; **** p \leq 0.0001; +++++ p \leq 0.0001 vs VEH+PTZ. c) Representación de la región CA1 respecto a bregma utilizada para el procesamiento de inmunofluorescencia. Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 1998.

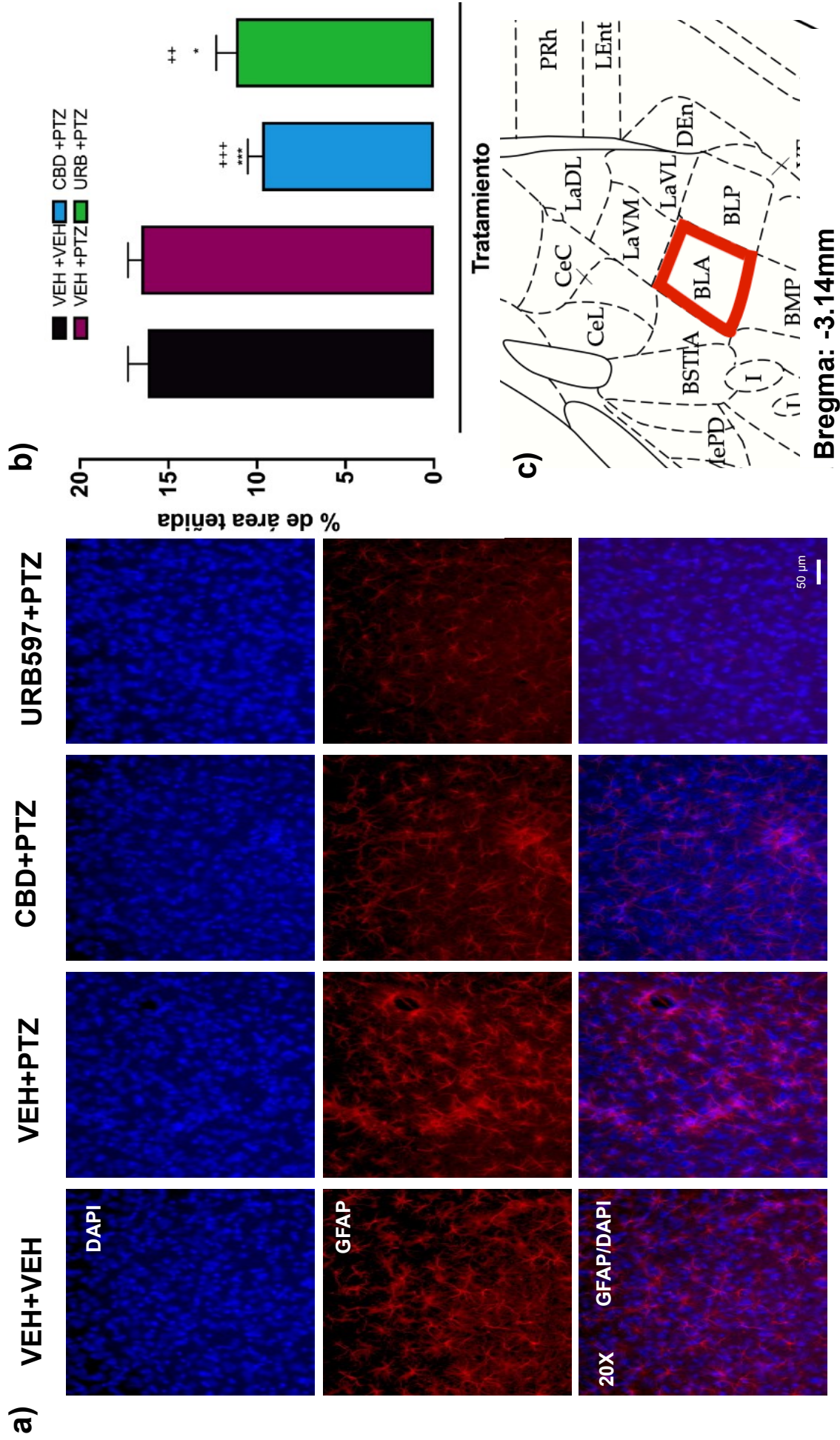


Figura 17. El CBD y URB597 disminuyen el porcentaje de área teñida de GFAP en BLA. a) Panel de fotomicrografías representativas del marcador DAPI (azul), de GFAP (rojo) y el empalme (azul y rojo) de los grupos experimentales (VEH+VEH;VEH+PTZ; CBD+PTZ; URB597+PTZ), tomadas con un objetivo de 20X; barra=50 µm. b) Porcentaje de área teñida en BLA de los cuatro grupos experimentales. Los valores muestran el promedio ± EEM (ANOVA ps 0.05, post-hoc Bonferroni ***p ≤ 0.001; *p≤0.05 vs VEH+VEH; ****p<0.001; **p<0.01 vs VEH+PTZ. c) Representación y localización de la región BLA respecto a Bregma. Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 1998.

7. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto neuroprotector del CBD en un modelo murino de crisis convulsivas inducidas por PTZ, considerando parámetros clave como la intensidad, la frecuencia y la latencia de las convulsiones, así como la reactividad astrocítica mediante la inmunorreactividad para GFAP. Como control farmacológico, se utilizó URB-597, un inhibidor de la enzima FAAH, con efectos antiinflamatorios bien caracterizados (Piomelli *et al.*, 2006). Esta estrategia se basa en la estrecha relación entre la epilepsia y la neuroinflamación, en donde una disfunción inmunoinflamatoria de la glía exacerba la hiperexcitabilidad neuronal, generando un ciclo patológico de retroalimentación positiva que favorece la aparición recurrente de crisis epilépticas (De Araújo Boleti *et al.*, 2024).

Los resultados del presente trabajo evidencian que la administración de PTZ en ratas genera crisis convulsivas, alcanzando una intensidad grado 4 en la escala de Racine, correspondiente a la “posición de canguro”. Este efecto se atribuye a que el PTZ, tanto en tratamientos agudos como crónicos, promueve de manera indirecta la activación del receptor NMDA desencadenando mecanismos de excitotoxicidad, estrés oxidativo y lipoperoxidación (Łukawski & Czuczwar, 2023; Zhu *et al.*, 2015; Flores-Soto *et al.*, 2021). Así, bajo el esquema de administración empleado en este estudio, se sugiere que dichos procesos patológicos fueron inducidos. Es importante destacar que la dosis y la frecuencia de administración de PTZ son determinantes en la inducción de las crisis convulsivas. En este caso el PTZ es aplicado a una dosis subconvulsiva cada tercer día durante 4 días. Este protocolo, de acuerdo con estudios previos como el de Zhu *et al.* (2015) y Zhu *et al.*, 2017, es capaz de inducir la hiperactivación del receptor NMDA, especialmente a través de su subunidad NR2B, facilitando una afluencia excesiva de Ca^{2+} al interior neuronal. Esta cascada, activa a la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), favoreciendo la producción de óxido nítrico ($NO\cdot$) y anión superóxido, los cuales reaccionan formando peroxinitrito, una molécula altamente citotóxica. El peroxinitrito daña las mitocondrias, compromete la función del retículo endoplásmico y promueve la muerte celular, además, exacerba la neuroinflamación mediante la activación glial y la liberación de citocinas proinflamatorias (Sofroniew, 2020; Zhu *et al.*, 2017).

De acuerdo con los hallazgos anteriormente descritos, los grupos tratados con CBD o URB-597 mostraron una reducción significativa en la intensidad de las crisis convulsivas en comparación con el grupo VEH+PTZ (Figura 13), manteniéndose en el estadio 3 de la escala de Racine, correspondiente al “clonus de extremidades anteriores” durante todo el protocolo experimental. Este efecto puede atribuirse a la acción anticonvulsiva parcial del CBD, mediada en parte por la activación de los receptores CB1 y CB2, los cuales regulan la liberación de glutamato, favorecen la homeostasis iónica y promueven una disminución de la neuroinflamación (Tambe *et al.*, 2023; Yousaf *et al.*, 2022). Cabe destacar que los efectos del CBD también dependen de la dosis administrada. En modelos murinos se ha reportado que dosis superiores a 50 mg/kg inducen efectos anticonvulsivos, mientras que dosis inferiores a 20 mg/kg están asociadas principalmente con efectos antiinflamatorios y neuroprotectores. En este estudio se empleó una dosis menor a 20 mg/kg con el objetivo de atenuar la neuroinflamación y, de forma indirecta, reducir la hiperexcitabilidad neuronal a través de la actividad del sistema endocannabinoide. Este efecto neuroprotector no solo involucra la acción sobre receptores CB1 y CB2, sino también la inhibición de la enzima FAAH, lo cual incrementa la biodisponibilidad de endocannabinoides como la anandamida (Manduca *et al.*, 2024). De forma paralela, el grupo tratado con URB-597 también presentó una disminución en la severidad de las convulsiones. Este compuesto, al actuar como inhibidor selectivo de la FAAH, eleva los niveles de anandamida, favoreciendo su interacción con receptores cannabinoides y canales TRPV1, lo cual contribuye a sus efectos antiinflamatorios y neuroprotectores (Jones *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2022;), como se observa en el grupo URB597+PTZ (Figura 13). No obstante, en la evaluación de la frecuencia y la latencia a la aparición de la primera crisis mioclónicas o tónico-clónicas, los tratamientos con CBD o URB-597 no produjeron cambios significativos respecto al grupo VEH+PTZ (Figura 14 y 15, respectivamente). Este hallazgo sugiere que los mecanismos de acción de ambos compuestos no se dirigen directamente a los receptores GABA_A o NMDA (principales dianas del PTZ), sino que atenúan las consecuencias neurotóxicas posteriores a la excitotoxicidad, principalmente mediante la modulación del entorno neuroinflamatorio.

Además de inducir crisis convulsivas, la administración recurrente de PTZ

desencadena procesos neuroinflamatorios, los cuales han sido menos estudiados, pero representan un componente crítico en la fisiopatología de la epilepsia. Esta inflamación es consecuencia de alteraciones en la homeostasis tanto neuronal como glial dentro del SNC. Diversos estudios han demostrado que el tratamiento repetido con PTZ incrementa la actividad glial expresada por la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β , TNF- α , las cuales inducen tanto cambios funcionales como morfológicos característicos de la reactividad glial (Flores-Soto *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2017). En el caso específico de los astrocitos, la reactividad se manifiesta a través de hipertrofia celular y del aumento en la expresión de proteínas como GFAP, un marcador ampliamente utilizado para evaluar astrogliosis. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la expresión de la proteína GFAP con el objetivo de dilucidar el efecto de la administración de CBD sobre la respuesta astrocítica. Esta proteína se ha detectado en niveles elevados en astrocitos hipocámpales en modelos de epilepsia inducida por PTZ, lo cual es particularmente relevante dado el papel central del hipocampo en la generación de actividad epileptiforme y su alta susceptibilidad a la excitotoxicidad (Díaz *et al.*, 2023; Flores-Soto *et al.*, 2021). En este contexto, los resultados del presente trabajo muestran que cuatro administraciones agudas de PTZ inducen una marcada hipertrofia astrocítica y un incremento en la inmunorreactividad para GFAP en la región CA1 del hipocampo (Figura 16). Estos hallazgos coinciden con la alta densidad de receptores NMDA en esta región y su reconocida vulnerabilidad al daño excitotóxico (Mao *et al.*, 2015; Cremer *et al.*, 2009). El mecanismo molecular subyacente a esta astrogliosis incluye la activación de vías de señalización como JAK/STAT, Notch y BMP-SMAD, reguladas por citocinas inflamatorias (en particular IL-6), que promueven la transcripción de GFAP (Preman *et al.*, 2021; Herrmann *et al.*, 2008). Además del hipocampo, otras estructuras límbicas interconectadas, como la corteza entorrinal y la amígdala, también participan en la red epileptogénica. Aunque la amígdala basolateral no está directamente involucrada en la generación inicial de las crisis, su conectividad con el hipocampo la convierte en una región clave para su propagación. No obstante, en el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en la inmunorreactividad de GFAP en la amígdala basolateral entre los grupos VEH+VEH y VEH+PTZ (Figura 17), lo cual podría atribuirse a una menor

densidad de receptores NMDA o a una mayor resistencia estructural de esta región frente al daño excitotóxico (Cremer *et al.*, 2009). A pesar de esta aparente resistencia, los tratamientos con CBD o URB-597 redujeron la inmunorreactividad basal para GFAP en la amígdala, lo que sugiere un efecto inmunomodulador incluso sin un daño evidente. De la misma manera, en la región CA1 del hipocampo se observa una disminución significativa de GFAP con ambos tratamientos (Figura 16). Esta acción podría estar mediada por la activación del receptor nuclear PPAR γ y la inhibición de la vía NF- κ B, con lo que se suprime la transcripción de genes proinflamatorios y de GFAP (Kozela *et al.*, 2009; Brenner & Messing, 2021). Asimismo, el CBD presenta propiedades antioxidantes, tanto por su estructura fenólica como por su capacidad de activar la vía Nrf2, lo que reduce la producción de radicales libres y atenúa el estrés oxidativo (Pagano *et al.*, 2023).

En conjunto, los hallazgos del presente estudio confirman que el modelo murino de crisis convulsivas inducidas por PTZ, no solo reproduce de manera confiable la actividad epiléptica, sino que también desencadena una respuesta neuroinflamatoria caracterizada por astrogliosis reactiva, evidenciada mediante el aumento de la inmunorreactividad para GFAP, especialmente en la región CA1 del hipocampo. Así mismo, se demuestra que el CBD ejerce un efecto neuroprotector relevante al atenuar tanto la intensidad de las convulsiones como la activación astrocítica. Estos resultados posicionan al CBD como un candidato terapéutico prometedor en el abordaje de epilepsias asociadas a inflamación glial, al igual que URB-597, cuyo mecanismo complementario amplifica la señalización endocannabinoide con efectos antiinflamatorios comparables. No obstante, para una comprensión más completa de los mecanismos implicados, será necesario en futuras investigaciones ampliar el análisis a otros tipos celulares involucrados en la neuroinflamación, como la microglía, así como incorporar el estudio de otros biomarcadores proinflamatorios como interleucinas. Esto permitirá dilucidar de manera precisa las vías moleculares implicadas en la respuesta inflamatoria inducida por PTZ y su modulación por cannabinoides.

8. Conclusiones

1. La administración de 15 mg/kg de CBD reduce la intensidad de las crisis convulsivas inducidas por PTZ, pero no modifica su frecuencia ni la latencia de aparición de crisis tipo tónico-clónico y mioclónico.
2. La administración de CBD a una dosis de 15 mg/kg reduce la expresión de GFAP en el hipocampo y en la amígdala basolateral de ratas tratadas con PTZ.

9. Perspectivas

1. Evaluar el efecto del CBD sobre la expresión del marcador microglial Iba-1 en un modelo de crisis convulsivas inducidas con PTZ.
2. Evaluar el potencial sinergismo farmacológico del CBD+URB-597 sobre la generación de crisis convulsivas en ratas tratadas con PTZ

10. Bibliografía

- AbuHasan, Q., Reddy, V., & Siddiqui, W. (2023, 17 julio). *Neuroanatomy, amygdala*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537102>
- Anokwuru, C. P., Makolo, F. L., Sandasi, M., Tankeu, S. Y., Elisha, I. L., Agoni, C., Combrinck, S., & Viljoen, A. (2022). Cannabigerol: a bibliometric overview and review of research on an important phytocannabinoid. *Phytochemistry Reviews*, 21(5), 1523-1547. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09794-w>
- Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>
- Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., & Andrea, C. M. (2018). El hipocampo: historia, estructura y función. *TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río*, 5(10). <https://doi.org/10.29057/estr.v5i10.3303>
- Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., Moriello, A. S., Davis, J. B., Mechoulam, R., & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal Of Pharmacology*, 134(4), 845-852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal Of Ethnopharmacology*, 227, 300-315. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004>
- Brenner, M., & Messing, A. (2021). Regulation of GFAP Expression. *ASN NEURO*, 13, 175909142098120. <https://doi.org/>
- Cassano, T., Villani, R., Pace, L., Carbone, A., Bukke, V. N., Orkisz, S., Avolio, C., & Serviddio, G. (2020). From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers In Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00124>
- Cavarsan, C. F., Malheiros, J., Hamani, C., Najm, I., & Covolan, L. (2018). Is Mossy Fiber Sprouting a Potential Therapeutic Target for Epilepsy? *Frontiers In Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01023>

- Chauhan, P., Jethwa, K., Rathawa, A., Chauhan, G., & Mehra, S. (2021). The Anatomy of the Hippocampus. En *Exon Publications eBooks* (p p . 1 7 - 3 0) . <https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus>
- Costa, A. C., Joaquim, H. P. G., Pedrazzi, J. F. C., De o Pain, A., Duque, G., & Aprahamian, I. (2022). Cannabinoids in Late Life Parkinson's Disease and Dementia: Biological Pathways and Clinical Challenges. *Brain Sciences*, 12(12), 1596. <https://doi.org/10.3390/brainsci12121596>
- Cremer, C., Palomero-Gallagher, N., Bidmon, H., Schleicher, A., Speckmann, E., & Zilles, K. (2009). Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 163(1), 490-499. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.068>
- De Araújo Boleti, A. P., De Oliveira Cardoso, P. H., Frihling, B. E. F., De Moraes, L. F. R. N., Nunes, E. A. C., Mukoyama, L. T. H., Nunes, E. A. C., Carvalho, C. M. E., Macedo, M. L. R., & Migliolo, L. (2024). Pathophysiology to Risk Factor and Therapeutics to Treatment Strategies on Epilepsy. *Brain Sciences*, 14(1), 71. <https://doi.org/10.3390/brainsci14010071>
- Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., Woodcock, H., Dorward, P., Pigliacampo, B., Close, S., Platt, B., & Riedel, G. (2011). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology*, 219(3), 859-873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>
- Di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2015b). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12(4), 692-698. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6>
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends In Neurosciences*, 21(12), 521-528. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01283-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01283-1)
- Díaz, F., Aguilar, F., Wellmann, M., Martorell, A., González-Arancibia, C., Chacana-Véliz, L., Negrón-Oyarzo, I., Chávez, A. E., Fuenzalida, M., Nualart, F., Sotomayor-Zárate, R., & Bonansco, C. (2023). Enhanced Astrocyte Activity and Excitatory Synaptic Function in the Hippocampus of Pentylentetrazole Kindling Model of Epilepsy. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(19), 14506. <https://doi.org/10.3390/ijms241914506>

- Eid, T., Thomas, M., Spencer, D., Rundén-Pran, E., Lai, J., Malthankar, G., Kim, J., Danbolt, N., Ottersen, O., & De Lanerolle, N. (2004). Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *The Lancet*, 363(9402), 28-37. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)15166-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)15166-5)
- Erkeç, O. E. (2015). Pentylene-tetrazol Kindling epilepsy model. *Journal Of The Turkish Epilepsi Society*. <https://doi.org/10.5505/epilepsi.2015.08108>
- Fabisiak, T., & Patel, M. (2022). Crosstalk between neuroinflammation and oxidative stress in epilepsy. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.976953>
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical aspects. En *Elsevier eBooks* (pp. 3-12). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800756-3.00001-6>
- Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., & Piomelli, D. (2004). Characterization of the Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor Cyclohexyl Carbamic Acid 3'-Carbamoyl-biphenyl-3-yl Ester (URB597): Effects on Anandamide and Oleoylethanolamide Deactivation. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 313(1), 352-358. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.078980>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Perez, E. R., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522-530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Flores-Soto, M., Romero-Guerrero, C., Vázquez-Hernández, N., Tejeda-Martínez, A., Martín-Amaya-Barajas, F. L., Orozco-Suárez, S., & González-Burgos, I. (2021). Pentylene-tetrazol-induced seizures in adult rats are associated with plastic changes to the dendritic spines on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Behavioural Brain Research*, 406, 113198. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113198>
- Fordjour, E., Manful, C. F., Sey, A. A., Javed, R., Pham, T. H., Thomas, R., & Cheema, M. (2023). Cannabis: a multifaceted plant with endless potentials. *Frontiers In Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1200269>
- Franco, G. D. R. R., Smid, S., & Viegas, C. (2021). Phytocannabinoids: General Aspects and Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 19(4), 449-464. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200720172624>

- Hájos, N. (2021). Interneuron Types and Their Circuits in the Basolateral Amygdala. *Frontiers In Neural Circuits*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.687257>
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., Korsak, R. A., Takeda, K., Akira, S., & Sofroniew, M. V. (2008). STAT3 is a Critical Regulator of Astroglial Scar Formation after Spinal Cord Injury. *Journal Of Neuroscience*, 28(28), 7231-7243. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1709-08.2008>
- Hu, H., Ho, W., Mackie, K., Pittman, Q., & Sharkey, K. (2012). Brain CB1 receptor expression following lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neuroscience*, 227, 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.067>
- Jones, N. A., Glyn, S. E., Akiyama, S., Hill, T. D., Hill, A. J., Weston, S. E., Burnett, M. D., Yamasaki, Y., Stephens, G. J., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2012). Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure*, 21(5), 344-352. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.03.001>
- Jones, N. A., Hill, A. J., Smith, I., Bevan, S. A., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2009). Cannabidiol Displays Antiepileptiform and Antiseizure Properties In Vitro and In Vivo. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 332(2), 569-577. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159145>
- Kanchi, S., & Meesala, G. (2024). Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Wistar Male Albino Rats with Reference to Glutamate Metabolism. *Journal Of Epilepsy Research*, 14(1), 21-28. <https://doi.org/10.14581/jer.24004>
- Koo, C. M., & Kang, H. (2017). Could Cannabidiol be a Treatment Option for Intractable Childhood and Adolescent Epilepsy? *Journal Of Epilepsy Research*, 7(1), 16-20. <https://doi.org/10.14581/jer.17003>
- Kozela, E., Pietr, M., Juknat, A., Rimmerman, N., Levy, R., & Vogel, Z. (2009). Cannabinoids Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol Differentially Inhibit the Lipopolysaccharide-activated NF- κ B and Interferon- β /STAT Proinflammatory Pathways in BV-2 Microglial Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(3), 1616-1626. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.069294>
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Hauser, W. A., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2009). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069-1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>

- Livingston, S. J., Quilichini, T. D., Booth, J. K., Wong, D. C. J., Rensing, K. H., Laflamme-Yonkman, J., Castellarin, S. D., Bohlmann, J., Page, J. E., & Samuels, A. L. (2019). Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *The Plant Journal*, *101*(1), 37-56. <https://doi.org/10.1111/tpj.14516>
- Löscher, W. (2009). Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *European Journal Of Pharmacology*, *610*(1-3), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.025>
- Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, *20*(5), 359-368. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.01.003>
- Lu, H., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological Psychiatry*, *79*(7), 516-525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Łukawski, K., & Czuczwar, S. J. (2023). Oxidative Stress and Neurodegeneration in Animal Models of Seizures and Epilepsy. *Antioxidants*, *12*(5), 1049. <https://doi.org/10.3390/antiox12051049>
- Lüttjohann, A., Fabene, P. F., & Van Luijtelaaar, 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>
- Manduca, A., Buzzelli, V., Rava, A., Feo, A., Carbone, E., Schiavi, S., Peruzzi, B., D'Oria, V., Pezzullo, M., Pasquadibisceglie, A., Polticelli, F., Micale, V., Kuchar, M., & Trezza, V. (2024). Cannabidiol and positive effects on object recognition memory in an in vivo model of Fragile X Syndrome: Obligatory role of hippocampal GPR55 receptors. *Pharmacological Research*, *203*, 107176. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107176>
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A. M., Rossetti, C., Molteni, M., Casalgrandi, M., Manfredi, A. A., Bianchi, M. E., & Vezzani, A. (2010b). Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nature Medicine*, *16*(4), 413-419. <https://doi.org/10.1038/nm.2127>
- Mason, C. R., & Cooper, R. M. (1972). A permanent change in convulsive threshold in normal and Brain-Damaged Rats with repeated small doses of Pentylenetetrazol*. *Epilepsia*, *13*(5), 663-674. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1972.tb04401.x>

- Monteiro, Á. B., Alves, A. F., Portela, A. C. R., Pires, H. F. O., De Melo, M. P., Barbosa, N. M. M. V., & Felipe, C. F. B. (2024). Pentylenetetrazole: a review. *Neurochemistry International*, 180, 105841. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105841>
- Ngoupaye, G. T., Adassi, M. B., Foutsop, A. F., Yassi, F. B., & Bum, E. N. (2022). Pentylenetetrazole kindling-induced epilepsy rat models: Insight on the severity state, a comparative study. *IBRO Neuroscience Reports*, 13, 164-176. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.08.003>
- Noriega-Morales, G., & Shkurovich-Bialik, P. (2020). Situación de la epilepsia en México y América Latina. *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC*, 65(3), 224-232. <https://doi.org/10.35366/95680>
- Ono, T., & Galanopoulou, A. S. (2012). Epilepsy and Epileptic Syndrome. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 99-113. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_8
- Pagano, C., Savarese, B., Coppola, L., Navarra, G., Avilia, G., Laezza, C., & Bifulco, M. (2023). Cannabinoids in the Modulation of Oxidative Signaling. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(3), 2513. <https://doi.org/10.3390/ijms24032513>
- Patricio, F., Morales-Andrade, A. A., Patricio-Martínez, A., & Limón, I. D. (2020). Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Frontiers In Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>
- Pesqueira, G. Q., San-Juan, D., Albarrán, R. H., Vazquez, M. L., Canales, G. Q., & Pesqueira, J. G. (2023). A systematic review of the epidemiology of epilepsy in Mexico during 1970 to 2020. *Archivos de Neuro-Psiquiatria*, 81(01), 074-080. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1758647>
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T. R., Dasse, O., Monaghan, E. P., Parrott, J. A., & Putman, D. (2006). Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews*, 12(1), 21-38. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00021.x>
- Pitkänen, A., Tuunanen, J., Kälviäinen, R., Partanen, K., & Salmenperä, T. (1998). Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, 32(1-2), 233-253. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(98\)00055-2](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(98)00055-2)
- Preman, P., Alfonso-Triguero, M., Alberdi, E., Verkhratsky, A., & Arranz, A. M. (2021). Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways. *Cells*, 10(3), 540. <https://doi.org/10.3390/cells10030540>

- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & ElSohly, M. A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules*, 26(9), 2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Reséndiz-Aparicio, J. C., Pérez-García, J. C., Olivas-Peña, E., García-Cuevas, E., Roque-Villavicencio, Y. L., Hernández-Hernández, M., Castro-Macías, J. I., & Rayo-Mares, J. D. (2023). Guía clínica. Definición y clasificación de la epilepsia. *DELETED*, 20(2). <https://doi.org/10.24875/rmn.m19000052>
- Sanz, P., & Garcia-Gimeno, M. A. (2020). Reactive Glia Inflammatory Signaling Pathways and Epilepsy. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(11), 4096. <https://doi.org/10.3390/ijms21114096>
- Sarlo, G. L., & Holton, K. F. (2021). Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. *Seizure*, 91, 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.06.028>
- Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current Neurology And Neuroscience Reports*, 7(4), 348-354. <https://doi.org/10.1007/s11910-007-0053-z>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512-521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- 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>
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends In Immunology*, 41(9), 758-770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The cannabis terpenes. *Molecules*, 25(24), 5792. <https://doi.org/10.3390/molecules25245792>
- Standoli, S., Rapino, C., Di Meo, C., Rudowski, A., Kämpfer-Kolb, N., Volk, L. M., Thomas, D., Trautmann, S., Schreiber, Y., Heringdorf, D. M. Z., & Maccarrone, M. (2023). Sphingosine Kinases at the Intersection of Pro-Inflammatory LPS and Anti-Inflammatory Endocannabinoid Signaling in BV2 Mouse Microglia Cells. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(10), 8508.

- Tanaka, M., Yagyu, K., Sackett, S., & Zhang, Y. (2019). Anti-Inflammatory Effects by Pharmacological Inhibition or Knockdown of Fatty Acid Amide Hydrolase in BV2 Microglial Cells. *Cells*, 8(5), 491. <https://doi.org/10.3390/cells8050491>
- 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>
- Treiman, D. M. (2001). GABAergic Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia*, 42(s3), 8-12. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3008.x>
- Van Erum, J., Van Dam, D., & De Deyn, P. P. (2019). PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy & Behavior*, 95, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.02.029>
- Walter, L., & Stella, N. (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *British Journal Of Pharmacology*, 141(5), 775-785. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705667>
- Wang, Y., Wei, P., Yan, F., Luo, Y., & Zhao, G. (2022). Animal Models of Epilepsy: A Phenotype-oriented Review. *Aging And Disease*, 13(1), 215. <https://doi.org/10.14336/ad.2021.0723>
- Yousaf, M., Chang, D., Liu, Y., Liu, T., & Zhou, X. (2022). Neuroprotection of Cannabidiol, Its Synthetic Derivatives and Combination Preparations against Microglia-Mediated Neuroinflammation in Neurological Disorders. *Molecules*, 27(15), 4961. <https://doi.org/10.3390/molecules27154961>
- Zhou, B., Zuo, Y., & Jiang, R. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6), 665-673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>
- Zhu, X., Dong, J., Han, B., Huang, R., Zhang, A., Xia, Z., Chang, H., Chao, J., & Yao, H. (2017). Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to PTZ Kindling Epilepsy-Induced Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Damage. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00377>
- Zhu, X., Dong, J., Shen, K., Bai, Y., Zhang, Y., Lv, X., Chao, J., & Yao, H. (2015). NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. *Brain Research Bulletin*, 114, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.04.002>

11. Anexos

11.1 Estructura química del CBD

El CBD es uno de los muchos derivados de cannabinoides identificados en *Cannabis sativa*. Esta molécula, a diferencia del THC se puede aplicar como un agente terepeúutico potencial sin efectos psicotr6picos. Si bien ambas mol6culas derivan de la misma planta, sus diferencias estructurales permiten que tengan actividades fisiol6gicas diferentes. Ambas mol6culas comparten una estructura terpenofen6lica de 21 6tomos de carbono que incluye un anillo de dibenzopirano y una cadena de alquilo hidrof6bica, la diferencia entre estas dos mol6culas radica en el anillo heterociclo abierto en el CBD (Figura 19. A) y este mismo anillo cerrado en el THC (Figura 19. B) (Franco *et al.*, 2021).

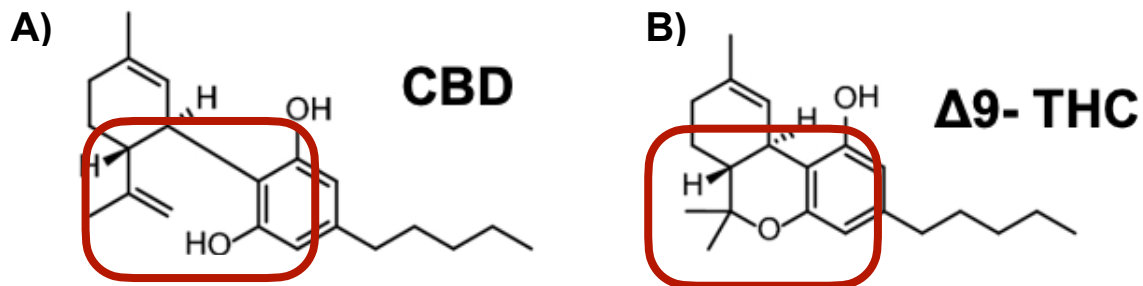


Figura 19. Estructura qu6mica de CBD y THC. A) Estructura qu6mica del CBD con el anillo heterociclo abierto, B) Estructura qu6mica del THC con el anillo heterociclo cerrado. Figura tomada y modificada de Franco *et al.*, 2021b & Anokwuru *et al.*, 2022.

11.2 Farmacocin6tica del CBD

El cannabidiol es una mol6cula no psicotr6pica que presenta beneficios terap6uticos de neuroprotecci3n, antiinflamaci3n, antinociceptivos y antioxidativos a trav6s de su actividad pleiotr6pica en receptores como CB1, CB2, GPR55, PPARγ y TRPV1. Esto la convierte en un mol6cula de inter6s farmac6utica para el tratamiento de diversas patolog6as como Alzheimer, Parkinson y recientemente epilepsia (Kwan *et al.*, 2009).

Hasta el momento, existe una amplia gama de estudios relacionados con el CBD, entre ellos, aquellos donde se vislumbra informaci3n sobre su actividad farmacocin6tica en modelos de roedores. Estos estudios permiten conocer el comportamiento del f6rmaco en el organismo posterior a su administraci3n. En un estudio de Deiana *et al.* (2011)

reportan la farmacocinética del CBD en ratas macho Wistar (200-250 g) tras una administración intraperitoneal (i.p) a una dosis de 120 mg/kg, obteniendo las características farmacocinéticas mostradas en la Figura 20.

Parámetro PK	CBD (120 mg/kg) Cremophor
Plasma	
C_{máx} (µg/ml)	2.6
T_{máx} (mín)	120
Vida media de eliminación aparente (min)	465
AUC 0–6 h (µg/ml min)	636
AUC 0–24 h (µg/ml min)	1.577
AUC 0–∞ (µg/ml min)	1.778
Cerebro	
C_{máx} (µg/ml)	6.8
T_{máx} (mín)	120
Vida media de eliminación aparente (min)	347
AUC 0–6 h (µg/ml min)	1.683
AUC 0–24 h (µg/ml min)	4.297
AUC 0–∞ (µg/ml min)	4.532

Figura 20. Datos farmacocinéticos del CBD administrado intraperitonealmente. Se muestran datos farmacocinéticos del CBD posterior a una administración de 120 mg/ kg. C_{máx}, Concentración máxima serica; T_{máx}, Tiempo máximo; AUC, Área bajo la curva. Tomado y modificado de Deiana *et al.*, 2011.

Es importante resaltar que el CBD se somete a metabolismo oxidativo y conjugativo hepático por las enzimas citocromo P450 y UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), respectivamente (Mazur *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2011). Sin embargo, las contribuciones de cada enzima al metabolismo del CBD no se han caracterizado por completo. Se ha reportado que CYP2C19 y CYP3A4 son las principales enzimas implicadas en la oxidación del CBD a múltiples metabolitos monooxigenados. Se

informó que CYP2C19 forma principalmente 7-hidroxi-CBD (7-OH-CBD), mientras que CYP3A participó en la formación de 6 α -OH-CBD, 6 β -OH-CBD y productos de hidroxilación de la cadena lateral como 2"-OH- y 4"-OH-CBD Mazur *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2011).

11.3 Farmacocinética y estructura química del URB-597

El URB-597, KDS-4103 o también llamado ácido ciclohexil carbámico 3-carbamoil-bifenil-3-il éster, es una molécula con propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Este efecto se debe a su acción inhibitoria sobre la enzima FAAH, una enzima que degrada a la anandamida pero que al ser inhibida, promueve el aumento de las concentraciones de AEA. Hasta el momento, se ha descrito de forma limitada su perfil farmacocinético en modelos *in vitro* e *in vivo*. En modelos *in vivo* se ha reportado que en ratas con una administración sistémica de URB-597 (0.3 mg/ kg i.p), la inhibición enzimática alcanzó su valor máximo dentro de los 15 minutos posteriores a la administración del fármaco y este se mantuvo durante 16 h, lo cual se contrasta con las concentraciones de anandamida que incrementan a los 30 minutos posteriores a la administración y disminuyen a las 16 h. En otro estudio, ratas administradas con una suspensión oral mostraron las siguientes características farmacocinéticas: (C_{max}) alcanzadas a las 1,2 h y semi vida de eliminación de aproximadamente 2 h. En cuanto a los niveles cerebrales máximos, se alcanzaron aproximadamente 1 hora después de la administración (Piomelli et al., 2006b).

En cuanto a su estructura química, el URB-597 posee una estructura basada en un anillo bencénico sustituido (Figura 21. A), con los siguientes grupos funcionales: un carbamato unido al anillo aromático (Figura 21. B) y una cadena fenilpropil unido al nitrógeno de una benzamina (Figura 21. C). Además, en su estructura tiene dos donantes de enlace de hidrógeno y cinco aceptores de enlace hidrógeno. Esto le confiere un alto grado de permeabilidad y una estabilidad ante diversas condiciones (calor, ácido, peróxido, luz y líquido gástrico simulado).

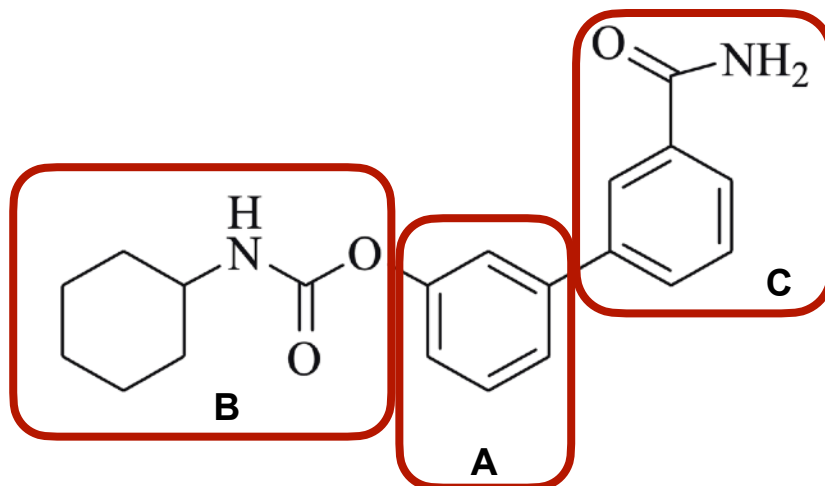


Figura 21. Estructura química del URB-597 o KDS-4103. El URB-597 se caracteriza por tener un anillo benéfico sustituido (A) con un carbamato unido al anillo aromático (B) y una cadena fenilpropil (C). Tomado y modificado de Piomelli *et al.*, 2006b.

El presente trabajo fue presentado en dos ediciones del Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (2023 y 2025) y uno en la Society for Neuroscience en 2024.



Sociedad Mexicana de
Ciencias Fisiológicas A.C.

**LXVI CONGRESO NACIONAL DE LA
SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.**

17-21 de septiembre 2023



Puebla, Pue. a 22 de Agosto, 2023

Estimado(a) **Nadezhda Tamara Tzompantzi Juarez**

Le informamos que su trabajo:

Efecto del Cannabidiol sobre la citoarquitectura cerebral en ratas con epilepsia inducida por PTZ

De los autores:

Tzompantzi-Juarez Nadezhda Tamara, Martínez-Juárez Enoc Alvaro, de la Cruz-Amador Claudia, Patricio Felipe, Ilhuicamina Daniel Limón, Patricio-Martínez Aleidy

ha sido **ACEPTADO** para ser presentando en el marco del *LXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas* que se llevará a cabo en el Complejo Cultural Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en la ciudad de Puebla del 17 al 21 de septiembre de 2023.

Así mismo, le solicitamos consultar la modalidad, fecha, hora y características de presentación en la página del congreso a partir del 28 de agosto, 2023.
<https://www.smcf.org.mx/2023/>

Atentamente,



Dra. Carmen Cortés
Presidente

Mesa Directiva
2022-2023

Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez
Presidenta

Dra. Margarita Martínez Gómez
Vicepresidenta

Dr. Francisco Castelán
Secretario

Dr. José Everardo Avelino Cruz
Tesorero



Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.

CARTA DE ACEPTACIÓN

Tlaxcala, Tlax, a 10 de julio de 2025

Tzompantzi-Juarez NT, Martínez-Juárez EA, Patricio F, Limón ID,
Patricio-Martínez A.

Nos complace comunicarles la ACEPTACIÓN del resumen titulado "EL CANNABIDIOL REDUCE LAS CRISIS CONVULSIVAS Y LA ASTROCITOSIS EN RATAS CON PENTILENTETRAZOL".

Mesa Directiva
2023-2025
Dra. Margarita Martínez Gómez
Presidenta
Dr. Jorge Manzo Denes
Vicepresidente
Dr. Francisco Castelán
Tesorero
Dra. Leticia Nicolás Toledo
Secretaria
Correo Electrónico
mesadirectivasmcf@gmail.com

El trabajo se presentará en las SESIONES DE CARTELES del LXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C., que se celebrará del 02 al 05 de septiembre del 2025, en las instalaciones de la UNAM, Campus Juriquilla, Qro.

Por favor, considere la siguiente información específica de la sesión en que su trabajo ha sido programado.

Sesión de carteles: número 2
Cartel: número 26
Fecha y hora: miércoles 03 de septiembre a las 16:00 hrs.
Ubicación: Área del velatorio del instituto de neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla.

Dimensiones del cartel: 160 cm de ancho x 120 cm de altura

El Comité Organizador agradece su valiosa contribución al programa académico.

Atentamente


Dra. Margarita Martínez Gómez
Presidenta de la SMCF

LXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas
Septiembre 2-5, 2025
Juriquilla, Qro.


[Print this Page for Your Records](#)
[Close Window](#)
Control/Tracking Number: 2024-S-9834-SfN

Activity: Scientific Abstract

Current Date/Time: 5/7/2024 3:17:13 PM

Cannabidiol reduces seizures and modifies glial markers in rats with pentylenetetrazol
AUTHOR BLOCK: *A. PATRICIO-MARTÍNEZ^{1,2}, N. TZOMPANTZI JUAREZ^{1,2}, E. MARTINEZ JUAREZ¹, F. PATRICIO MARTÍNEZ^{1,3}, I. D. LIMON PEREZ DE LEON¹;

¹Lab. de Neurofarmacología-FCQ, ²Facultad de Ciencias Biológicas, ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Univ. Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

Abstract:

Epilepsy is a disorder characterized by hyperstimulation of the central nervous system that manifests itself with symptoms such as seizures. In refractory epilepsy, there is a constant state of neuroinflammation in addition to modifications in the cytoarchitecture of the cerebral cortex and the hippocampus, which is why great interest has been generated in the search for drugs that control the symptoms of epilepsy and provide neuronal protection. Cannabidiol (CBD) is the main non-psychoactive component of marijuana, the first reports of the properties of cannabidiol proposed it as an anticonvulsant agent, later many pharmacological effects were reported, including anti-inflammatory and neuroprotective. This variety of effects caused by CBD is due to its pleiotropic action since the actions are mediated by cannabinoid 1 (CB1) and 2 (CB2) receptors, also involving receptors 18 and 55 coupled to G protein (GPR18 and GPR55). CBD is a non-psychoactive substance that is involved in the modulation of different receptors outside the endocannabinoid system and these interactions highlight its antiepileptic, and anti-inflammatory. For this reason, this study aimed to determine the effect of Cannabidiol on seizures and microglia in rats with pentylenetetrazole (PTZ). In the present work, an epilepsy model induced with PTZ (35mg/kg, i.p) was established in male rats of the Wistar strain, weighing 260-330g. CBD was administered at a dose of 15mg/kg and the CBD vehicle was ethanol: tween-20:SSl. Three experimental groups were formed (n=12): CBD vehicle+ PTZ vehicle (vehicle+vehicle); Vehicle + PTZ and CBD + PTZ. The administration of the drugs or the vehicle was carried out for fourteen days, seven days before and seven days after the administration of PTZ. On days 0, 2, 4, and 6, PTZ was administered, immediately after administration, the animals were videotaped to subsequently quantify seizures using the Racine scale. At the end of the treatment days, the animals were euthanized to remove the brains and evaluate GFAP and Iba-1 protein, markers of astrocytes and microglia. The expression of each protein was assessed by fluorescence microscopy in the cortex and hippocampus. The results show that the administration of CBD+PTZ significantly reduces the intensity of seizures compared to the group administered only with PTZ. Furthermore, the administration of CBD+PTZ induces changes in the expression of GFAP and Iba-1 in the motor cortex and hippocampus of rats treated only with PTZ. These results suggest that CBD administration may have a regulatory role in the toxic effect of PTZ at subconvulsive doses.

Author Disclosure Information:

A. Patricio-Martinez: None. **N. Tzompantzi Juarez:** None. **E. Martinez Juarez:** None. **F. Patricio Martinez:** None. **I.D. Limon Perez De Leon:** None.

Presentation Preference (Complete): Poster Only

Linking Group Selection (Complete): None selected

Theme and Topic (Complete): B.08.d. Animal models ; B.08.e. Anticonvulsant and antiepileptic therapies

Linking Group and Nano Info (Complete):
Keyword (Complete): CANNABINOID ; SEIZURE ; GLIA

Support (Complete):
Support: Yes

Grant/Other Support: : CONAHCYT CF-2023-I-539

Grant/Other Support: : CONAHCYT CF-G-597

Special Requests (Complete):
How do you plan to participate in Neuroscience 2024?: In-Person Only

At this time, is your author block complete?
Note that you will have a chance to edit your author block through the editing deadline and again in July.: Yes

Religious Conflict?: No Religious Conflict

Additional Conflict?: No

Is the presenting author of this abstract a high school or undergraduate student?: None

Select: Non-primate mammal

H.Puebla de Zaragoza, a 18 de septiembre de 2025
Asunto: Solicitud de examen profesional

Dra. Dolores López Morales
Secretaria Académica
Facultad de Ciencias Biológicas
PRESENTE

Por este medio, la que suscribe **Nadezhda Tamara Tzompantzi Juarez** estudiante de la Licenciatura en Biología con matrícula **201749611** se dirige a usted para informar que la tesis con título "**Efecto del cannabidiol sobre la respuesta astrocítica y la generación de crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol en ratas**" ha sido revisada y aprobada por el comité revisor para continuar con los trámites correspondientes.

De acuerdo con lo anterior, dicho examen se llevará a cabo el **lunes 13 de octubre de 2025** en un horario de **11:00 a 13:00 h** de forma **presencial** en el Auditorio Alfonso L. Herrera; FCB-BUAP.

Sin otro particular, le agradezco la atención a la presente.

Atentamente

Nadezhda Tamara
Tzompantzi Juarez
Sustentante

Dra. Aleidy Patricia Martínez
Directora de tesis

Dr. Ilhucamina Daniel
Limón Pérez de León
Co-director de tesis

Dra. Adriana Berenice Silva
Gómez

M. en C. Montserrat
Vázquez Balbuena

Dr. Felipe Patricio Martínez