



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

“ANÁLISIS TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE FITOQUÍMICOS EN EL PROCESO DE
LA EPILEPSIA”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA
PRESENTA: MARIANA VALENCIA APANGO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. NORMA ANGÉLICA CABALLERO CONCHA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - BUAP
LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA COMPUTACIONAL - BUAP

CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ALEIDY PATRICIO MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - BUAP
LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA - FCQ BUAP

OCTUBRE DE 2025

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



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

Así como por la beca otorgada mediante el proyecto con ID CVIEP 00337, ID
PROY 00059.



El presente trabajo fue apoyado por el proyecto VIEP-24-039 otorgado por la
vicerrectoría de investigación y estudios de Posgrado a la Dra. Aleidy Patricio
Martínez de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



El presente trabajo fue realizado en colaboración con el laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias Químicas – BUAP, a cargo del Dr. Daniel Limón Pérez de León y bajo la dirección de la Dra. Aleidy Patricio Martínez

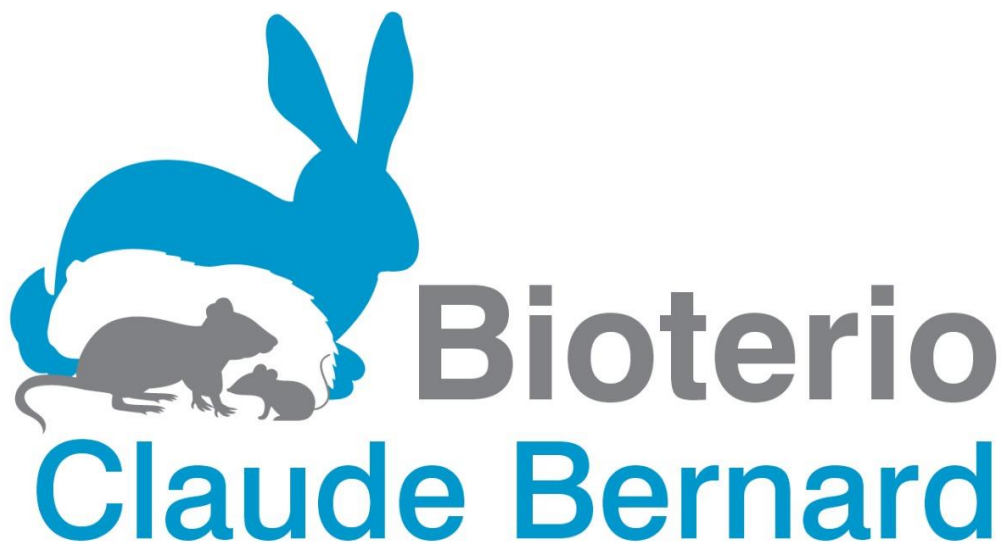


Laboratorio Nacional de Supercómputo
del Sureste de México

El presente trabajo fue realizado en colaboración con el laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México con el proyecto No. 202301007C



El presente trabajo fue apoyado por la empresa HempMeds con la donación de los principios activos de Cannabidiol y el Cannabigerol.



Los animales utilizados para 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, así como por el tiempo y la dedicación brindados durante este proceso académico.

M. en C. Montserrat Vázquez Balbuena

Adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP

Dra. Ariadna Berenice Silva Gómez

Adscrita a la facultad de Ciencias Biológicas, BUAP

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Adscrita a la Facultad de Ciencias Químicas, BUAP

Contenido

Índice de figuras	8
Abreviaturas	9
Resumen	11
1. Introducción.....	13
Neuroinflamación.....	13
La epilepsia y su prevalencia a nivel mundial	16
<i>Modelo convulsivo con pentilentetrazol</i>	<i>22</i>
Sistema endocannabinoide.....	23
<i>Receptores cannabinoides en el cerebro.....</i>	<i>24</i>
<i>Fitocannabinoides como alternativa terapéutica en la epilepsia</i>	<i>24</i>
<i>Cannabidiol y Cannabigerol en el proceso de epilepsia</i>	<i>27</i>
Uso de herramientas <i>in silico</i> para el estudio de fármacos.....	30
<i>Bases de datos estructurales.....</i>	<i>33</i>
<i>Predicción estructural de proteínas</i>	<i>35</i>
2. Justificación	38
3. Hipótesis	39
4. Objetivo general	39
Objetivos particulares	39
5. Material y Métodos	40
<i>Diagrama de trabajo experimental</i>	<i>40</i>
<i>Sujetos de experimentación.....</i>	<i>41</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>44</i>
6. Metodología <i>in silico</i>.....	45
Obtención de Receptores.....	46
<i>Predicción estructural</i>	<i>46</i>
<i>Alineamiento de secuencias</i>	<i>46</i>
<i>Modelado estructural</i>	<i>47</i>

Obtención y optimización de las estructuras de ligandos	48
<i>Selección de estructuras.....</i>	48
Acoplamiento molecular	50
<i>Autodock Vina.....</i>	51
<i>Visualización y análisis de resultados.....</i>	53
7. Resultados experimentales	54
<i>La co-administración del cannabidiol y el cannabigerol disminuyó la intensidad de las crisis convulsivas en ratas administradas con pentilentetrazol.....</i>	54
<i>La coadministración de cannabidiol y cannabigerol no modificó la latencia a la primera crisis mioclónica, pero sí redujo la duración de las crisis tónico-clónicas.....</i>	56
8. Resultados teóricos	58
Acoplamiento molecular	61
<i>Receptor rCB2</i>	61
<i>Receptor rPPARγ</i>	65
9. Discusión	71
10. Conclusiones.....	81
11. Perspectivas	82

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación clásica y alternativa de la microglía.

Figura 2. Procesos neuroinflamatorios en la epilepsia.

Figura 3. Las crisis convulsivas aumentan las citocinas proinflamatorias.

Figura 4. Esquema representativo de las dianas farmacológicas de los fármacos antiepilépticos más utilizados clínicamente.

Figura 5. Modelo convulsivo con Pentilentetrazol.

Efecto del pentilentetrazol en la expresión de mRNA de los receptores CB2 de rata en la corteza, en el hipocampo dorsal e hipocampo ventral.

Figura 6. Estructura química de Δ -9-tetrahidrocannabinol, cannabidiol y cannabigerol.

Figura 7. Efecto del PTZ sobre la expresión del ARNm del receptor CB2 en cerebro de rata

Figura 8. Blancos terapéuticos del CBD.

Figura 9. Blancos terapéuticos del CBG.

Figura 10. Diagrama de trabajo experimental.

Figura 11. Diagrama de metodología teórica.

Figura 12. Estructura química de ligandos.

Figura 13. Intensidad de crisis convulsivas durante cada ensayo según la escala de Racine.

Figura 14. Frecuencia de las crisis convulsivas según la escala de Racine.

Figura 15. Latencia a la primera crisis mioclónica por cada ensayo y duración de crisis convulsivas tónico-clónicas.

Figura 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del receptor CB2.

Figura 17. Alineamientos de secuencias de aminoácidos del receptor PPAR γ .

Figura 18. Alineamiento estructural en PDBeFold.

Figura 19. Sitios de unión y de mayor potencial farmacológico en rCB2 y rPPAR γ mediante la herramienta DogSiteScore de Proteins+

Figura 20. Estructuras optimizadas en Gaussian 16 al nivel de teoría B3LYP/6-31G de los ligandos utilizados.

Figura 21. Diagrama 2D de las interacciones de los ligandos en el sitio ortostérico de *rCB2*.

Figura 22. Visualización 3D del receptor *rCB2* en complejo con las poses de menor energía de cada ligando.

Figura 23. Diagramas 2D de las interacciones de los ligandos en *rPPAR γ* .

Figura 24. Visualización 3D del receptor *rPPAR γ* en complejo con las poses de menor energía de cada ligando.

Figura 25. Mecanismo hipotético de la activación de *rCB2* y *rPPAR γ* por CBD y CBG.

Abreviaturas

2-AG - 2 Araquidonilglicerol

5HT1-A – Receptor 5 hidroxitriptamina 1-A

AC – Adenilato ciclasa

AEA - Anandamida

AMPC – adenosín monofosfato cíclico

ATP – Adenosín trifosfato

BHE - Barrera hematoencefálica

CB - Cannabinoide

CB1 - Receptor cannabinoide de tipo I

CB2 - Receptor cannabinoide de tipo II

CBD - Cannabidiol

CBG - Cannabigerol

CCDC - Cambridge Crystallographic Data Centre

DAMP – Patrones moleculares asociados a daño

eCB - endocannabinoide

FAAH – Fatty acid amide hidrolase (Amida hidrolasa de ácidos grasos)

FABP – Fatty acid binding protein (Proteína de unión a ácidos grasos)
GABA – Acido gamma aminobutírico
GABA_A – Receptor a ácido gamma aminobutírico tipo A
GPR55 – Receptor 55 acoplado a proteína G
HMGB1 - High Mobility Group Box 1
IFN γ - Interferón gamma
I κ B – Inhibidor de cinasas B
IL-1 - Interleucina 1 beta
IL-10 – Interleucina 10
IL-37 – Interleucina 37
IL-6 - Interleucina 6
ILAE – Liga internacional contra la epilepsia
NF- κ B - Factor Nuclear kappa B
NK – Natural killer
PDB – Protein data bank
pLDDT - predicted Local Distance Difference (Diferencia de distancia local prevista)
PPAR γ - Receptor activado por proliferador de peroxisoma tipo gamma
pTM - predicted Template Modeling score (Puntuación de modelado de plantillas prevista)
PTZ - Pentilentetrazol
SEC - Sistema endocannabinoide
SI – Sistema inmune
SNC – Sistema Nervioso Central
THC - Tetrahidrocannabinol
TM - Transmembrana
TNF α - Factor de necrosis tumoral alpha
TRPV1 - Receptor transitorio de potencial vaniloide tipo I

Resumen

La neuroinflamación es un común denominador en diversas patologías neurológicas, un ejemplo es la epilepsia, enfermedad caracterizada por la presencia de crisis convulsivas debido a un desequilibrio en la actividad excitatoria e inhibitoria de ciertas regiones del cerebro. Actualmente, no existe un tratamiento que cure la enfermedad, por lo que recientemente se ha propuesto el uso de fitoquímicos cannabinoides como una alternativa farmacológica ya que han mostrado ser moléculas capaces de ejercer efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en diversas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el efecto de la coadministración de estas moléculas en un modelo de epilepsia. El uso de herramientas *in silico* en la investigación para el desarrollo de fármacos ha sido útil en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue, evaluar el efecto sinérgico del cannabidiol (CBD) y del cannabigerol (CBG) sobre las crisis convulsivas y realizar el modelado computacional del acoplamiento molecular de dichos cannabinoides con los receptores CB2 y PPAR γ . Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar aleatorizadas en 6 grupos experimentales. Se realizó un tratamiento previo de 7 días con CBD (15 mg/Kg) y CBG (50 mg / Kg) y posteriormente se indujeron crisis convulsivas con pentilentetrazol (PTZ) (35 mg/kg) cada 48 horas con un total de 4 administraciones de PTZ, a la par tratamiento con cannabinoides. Posteriormente, se realizaron cálculos de acoplamiento molecular para analizar los tipos de interacciones del CBD y del CBG con el receptor a cannabinoides Tipo II (CB2) y con el receptor activado por proliferador de peroxisoma tipo gamma (PPAR γ), ambos receptores de la especie *Rattus norvegicus*, utilizando el programa *Autodock Vina*. Este análisis mostró la capacidad del CBD y CBG para unirse al sitio ortostérico de CB2 (-6.3 / -9.3 kcal/mol) y al sitio alostérico de PPAR γ (-7.8 / -7.9 kcal/mol) mediante residuos importantes para la unión y la activación del receptor, siendo estos: His95, Val113, Trp258 y Ser285 para CB2 y Cys313, Ser317, Phe309 y Met392 para PPAR γ , mientras que los resultados conductuales muestran una disminución de la

intensidad y de la frecuencia de las crisis convulsivas principalmente del tipo tónico-clónico, posiblemente mediante la modulación de vías antiinflamatorias. En conclusión, la coadministración de CBD y CBG disminuye la intensidad y la frecuencia de aparición de las crisis convulsivas inducidas por PTZ, lo cual permite proponer un efecto sinérgico derivado de la activación de múltiples vías, incluidas las de CB2 y PPAR γ . La modulación de estas vías podría tener un papel neuroprotector y antiinflamatorio ante la excitotoxicidad causada por las crisis convulsivas.

1. Introducción

Neuroinflamación

Los seres vivos poseen un complejo sistema de defensa ante los daños a los que puedan estar expuestos conocido como Sistema Inmune (SI), clasificado en innato y adaptativo. El SI innato actúa como la primera línea de defensa, mediante mecanismos que son llevados a cabo por células como los macrófagos y las células presentadoras de antígenos que producen sustancias ante un daño en el tejido con el fin de reclutar a las células inmunes como linfocitos y las *natural killer* (NK) necesarias para la reparación del daño o la eliminación de un patógeno. De esta manera, el SI protege al organismo de enfermedades, agresiones externas, infecciones, y microorganismos patógenos (Olarreaga, 2014).

En el Sistema Nervioso Central (SNC) existe un control más estricto sobre el paso de sustancias entre el cerebro y la periferia. Esta selectividad se logra gracias a la barrera hematoencefálica (BHE), una estructura que rodea los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro y está compuesta por células endoteliales, pericitos y células de la glía. Estas células participan activamente en el monitoreo de la integridad del tejido neuronal y en el mantenimiento estructural de la BHE (Bundgaard y Abbott, 2008). Se denomina glía al conjunto de células que colaboran en el funcionamiento adecuado del SNC, entre las cuales se encuentran los astrocitos y la microglía. La microglía representa un 15% de la glía total, y corresponde a los macrófagos residentes del SI innato. Estas células desempeñan funciones esenciales en el desarrollo del SNC, como el apoyo a la supervivencia neuronal, la regulación de la muerte celular, la sinaptogénesis y al mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso. De esta manera, actúan como la primera línea de defensa en el cerebro, mediante la fagocitosis de patógenos y la eliminación de desechos celulares provocados por lesiones (Muzio y cols., 2021).

La microglía tiene la capacidad de liberar moléculas proinflamatorias, con el objetivo de reclutar a otras células inmunes como, los leucocitos y así iniciar una

respuesta de defensa frente al daño presente (Olarreaga, 2014). Cuando el SNC está expuesto a estímulos nocivos constantes como las crisis convulsivas, las células inmunes residentes liberan mediadores como el interferón gamma (IFN γ). Este, al unirse a su receptor situado en otras células microgliales, induce su activación hacia un fenotipo M1 (figura 1), caracterizado por un perfil proinflamatorio (de Vries, 1996). Este proceso, conocido como activación clásica, y desencadena cascadas inflamatorias celulares que resultan en la liberación de mediadores como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), la interleucina-1-beta (IL-1 β), la interleucina-6 (IL-6) y radicales libres (Michelucci y cols., 2009).

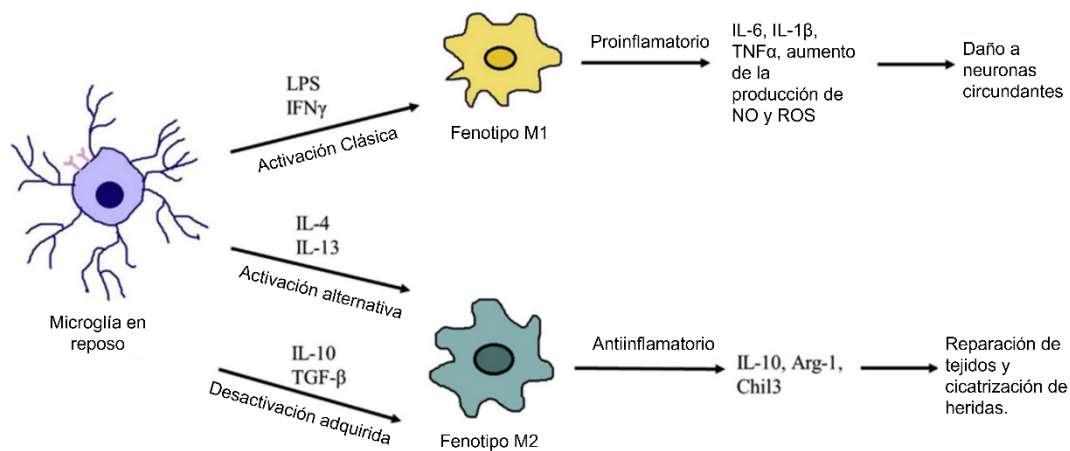


Figura 1. Clasificación clásica y alternativa de la microglía. Ante un estímulo nocivo, la microglía en estado de reposo puede adoptar un fenotipo proinflamatorio, proceso conocido como activación clásica. En contraste, cuando la microglía es expuesta a moléculas antiinflamatorias como IL-10, puede adquirir un fenotipo alternativo, en un proceso denominado activación alternativa. Tomado y modificado de Subhramanyam y cols., 2019.

La microglía activada contribuye a la persistencia del fenotipo M1 debido al daño circundante en el tejido neuronal, como un intento del sistema para reducir el insulto al encéfalo. Sin embargo, esta activación prolongada favorece el aumento de la permeabilidad de la BHE, permitiendo la entrada sostenida de leucocitos y otras células reparadoras. Cuando esta respuesta inflamatoria es estimulada de forma constante se altera el equilibrio homeostático del SNC, debido a la exposición a sustancias proinflamatorias en concentraciones elevadas, lo que conduce al desequilibrio de diversos procesos celulares, entre ellos: la sobreproducción de

radicales libres, generando estrés oxidativo y nitrosativo, y la disrupción continua de la BHE, que facilita la infiltración desmedida de leucocitos periféricos (van Vliet, 2007). Como resultado, una respuesta inmune exacerbada puede volverse contraproducente, comprometiendo la supervivencia y el funcionamiento normal de las neuronas (Banati, 1993).

A este proceso biológico se le conoce como neuroinflamación, y es una característica presente en diversas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la epilepsia. La neuroinflamación incrementa la excitotoxicidad en el tejido neuronal, lo que contribuye a la aparición de síntomas como convulsiones, pérdida progresiva de neuronas y la consecuente liberación de moléculas reconocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMP's). Entre estos DAMP's se encuentran el adenosín trifosfato (ATP) y la proteína HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*, por sus siglas en inglés) que, al liberarse en el espacio extracelular, son detectadas por la microglía como señales propias del tejido dañado. Esta detección conduce a la activación de la respuesta inmune, lo que perpetúa un círculo vicioso de inflamación crónica (Meng y Yao, 2020).

Por otro lado, la glía puede adoptar un fenotipo antiinflamatorio, conocido como M2 (Gordon, 2003), en respuesta a la liberación de IL-4 e IL-13. Estas citocinas inducen la llamada "activación alternativa" en la microglía, promoviendo la liberación de moléculas antiinflamatorias, como IL-10 y Arg-1, que pueden atenuar o contrarrestar la respuesta inflamatoria exacerbada. Por ello, la búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas a favorecer la caracterización del fenotipo microglial antiinflamatorio y a restablecer el equilibrio frente a procesos proinflamatorios resultan de gran interés en el estudio de enfermedades neurológicas.

La epilepsia y su prevalencia a nivel mundial

La epilepsia es una de las patologías neurológicas más prevalentes a nivel mundial, y se caracteriza por una predisposición crónica a presentar crisis convulsivas, causadas por la propagación anormal e incontrolada de impulsos eléctricos entre las neuronas (Fisher, 2005). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 70 millones de personas viven con epilepsia, lo que representa cerca del 1% de la población mundial, afectando a personas de todas las edades, afectando con mayor prevalencia en la población infantil (Singh y Trevick, 2016). Además, se estima que cerca del 80% de los casos se encuentran en países en vías de desarrollo. En el caso de México, se calcula que entre 2 y 2.5 millones de personas padecen esta enfermedad (Secretaría de Salud, 2015).

Las crisis epilépticas pueden manifestarse de formas clínicas diversas, que van desde crisis no motoras, como los episodios de ausencia o auras (estas últimas consideradas el inicio consciente de una crisis focal y caracterizadas por síntomas sensitivos, autonómicos o psíquicos) hasta crisis motoras generalizadas, como las tónico-clónicas (*grand mal*), que se caracterizan por una fase de rigidez muscular seguida de contracciones y extensiones violentas de los músculos en todo el cuerpo (Scheffer y cols., 2017).

A pesar de los avances terapéuticos, se estima que sólo alrededor del 70% de las personas con epilepsia logran un control eficaz de las crisis convulsivas mediante un tratamiento farmacológico. El 30% restante representa lo que se conoce como epilepsia resistente a fármacos, una condición en la que los tratamientos disponibles, no logran suprimir las crisis, lo que representa un desafío clínico significativo (Kwan y cols., 2010). Esta falta de respuesta terapéutica no solo perpetúa la recurrencia de las convulsiones, sino que también, mantiene activa la cascada neuroinflamatoria previamente descrita, favoreciendo la excitotoxicidad, la progresión de la enfermedad y el deterioro cognitivo. Como consecuencia, estos

pacientes presentan una alta morbilidad y una marcada disminución en su calidad de vida (Bender, 2018).

Etiología y fisiopatología de la epilepsia

Las causas que subyacen a la epilepsia son diversas y se agrupan en seis categorías principales: genéticas, estructurales, metabólicas, infecciosas, inmunológicas y desconocidas (Scheffer y cols., 2017). A pesar de esta clasificación etiológica, múltiples estudios sugieren que existen mecanismos fisiopatológicos comunes que participan en la generación y en la cronificación de las crisis, independientemente de la causa específica. Entre estos factores destacan la hiperactividad persistente del SNC, la activación de la microglía, la sobre expresión de mediadores proinflamatorios y la disrupción de la BHE, que en su conjunto continúan estimulando la respuesta inflamatoria y contribuyen al progreso de las crisis convulsivas y de las comorbilidades de la enfermedad (Meng y Yao, 2020; Vezzani, 2014; Su y cols., 2014; Karan y cols., 2021).

Posteriormente, este desequilibrio homeostático conduce a la muerte neuronal y a la liberación de restos celulares al espacio extracelular incluidos ATP y HMGB1. Estos componentes son reconocidos como DAMPs, lo que desencadena nuevamente la activación de la respuesta inmune innata, principalmente mediada por la microglía M1. Este proceso perpetúa un ciclo de neuroinflamación crónica que favorece la progresión de la enfermedad (figura 2) (Vezzani 2014).

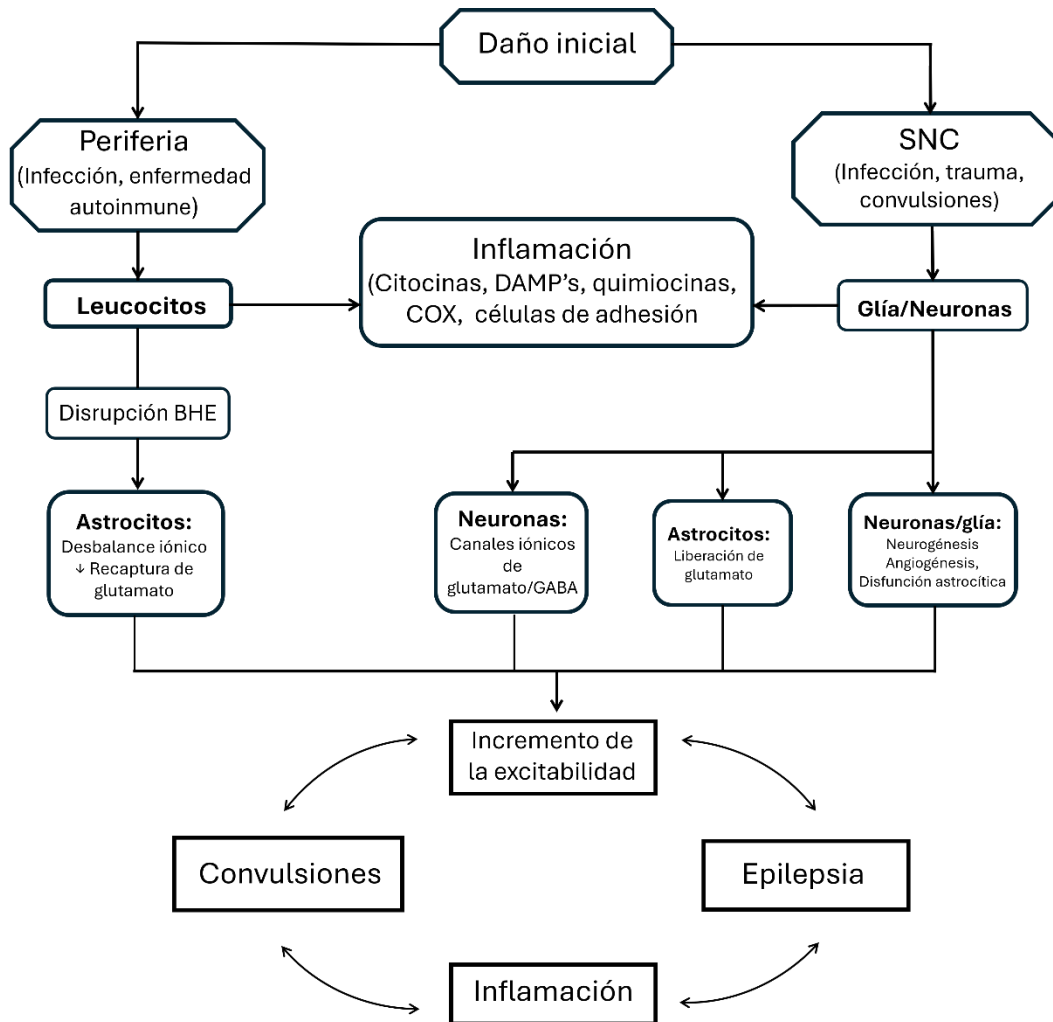


Figura 2. Procesos neuroinflamatorios en la epilepsia. Después de un daño inicial, se desencadenan respuestas de defensa por medio de las células gliales, lo que desencadena diferentes procesos que contribuyen al incremento de la excitabilidad y de la recurrencia de las crisis convulsivas. Tomado y modificado de Vezzani, 2014.

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han confirmado el papel fundamental de los mediadores inflamatorios en el desarrollo y mantenimiento de las crisis convulsivas. Un ejemplo destacado es el trabajo de Su y cols. (2015), en el que se cuantificaron los niveles de IL1 β , IL-6 y TNF- α en la corteza prefrontal, en el hipocampo y en la amígdala de ratas sometidas a un modelo de crisis convulsivas inducidas por ácido kaínico. Los resultados mostraron un aumento significativo en

la concentración de estas citocinas proinflamatorias, correlacionado con la aparición de crisis convulsivas, especialmente del tipo tónico-clónico (figura 3).

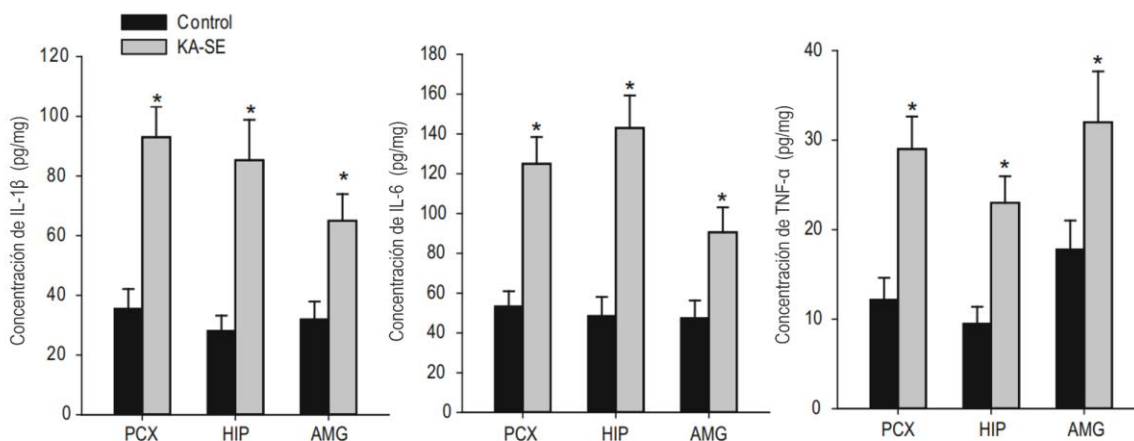


Figura 3. Las crisis convulsivas aumentan las citocinas proinflamatorias. La administración de ácido kaínico (agonista de los receptores de kainato, permeables a glutamato) aumenta la concentración de citocinas proinflamatorias en la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala. Se observa un aumento de los niveles de IL-1 β IL-6 y TNF- α en estas tres regiones cerebrales asociadas con el inicio de crisis convulsivas y muerte neuronal provocada por excitotoxicidad. Tomado y modificado de Su y cols., 2015.

Por otra parte, se observó que la elevación de los niveles de mediadores proinflamatorios induce un aumento en la expresión de los transportadores de GABA, GAT-1 y de GAT-3, lo que reduce la disponibilidad de GABA en el espacio extracelular. Esta disminución limita la entrada de iones Cl⁻ a las neuronas, dificultando su repolarización y favoreciendo un estado de hiperexcitabilidad neuronal (Su y cols., 2015).

En este contexto, la presencia crónica de las crisis convulsivas induce a la microglía y astrocitos a producir y liberar moléculas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α que amplificarán la señalización inflamatoria celular (Vezzani, 2014). Debido a esto, los tratamientos más recientes para el tratamiento de la epilepsia se han inclinado a la utilización de compuestos con propiedades antiinflamatorias capaces de modular la respuesta inmune en el cerebro para atenuar el progreso de la enfermedad.

Principales fármacos antiepilépticos

A lo largo de los últimos 160 años, se han desarrollado diversos fármacos con el objetivo de reducir la frecuencia y en la intensidad de las crisis epilépticas. Estos fármacos actúan a través de distintos mecanismos, dirigidos a corregir los principales desequilibrios fisiológicos observados en la epilepsia. Entre los mecanismos de acción más comunes se encuentran: la modulación de canales iónicos (como los canales de sodio y calcio), la potenciación de la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA, y la inhibición del sistema glutamatérgico excitatorio (figura 4). Además, existen fármacos que actúan sobre otros procesos sinápticos, como la inhibición de la liberación de vesículas sinápticas, mecanismos por el cual actúan compuestos como: levetiracetam y el brivaracetam (Sills y Rogawski, 2020).

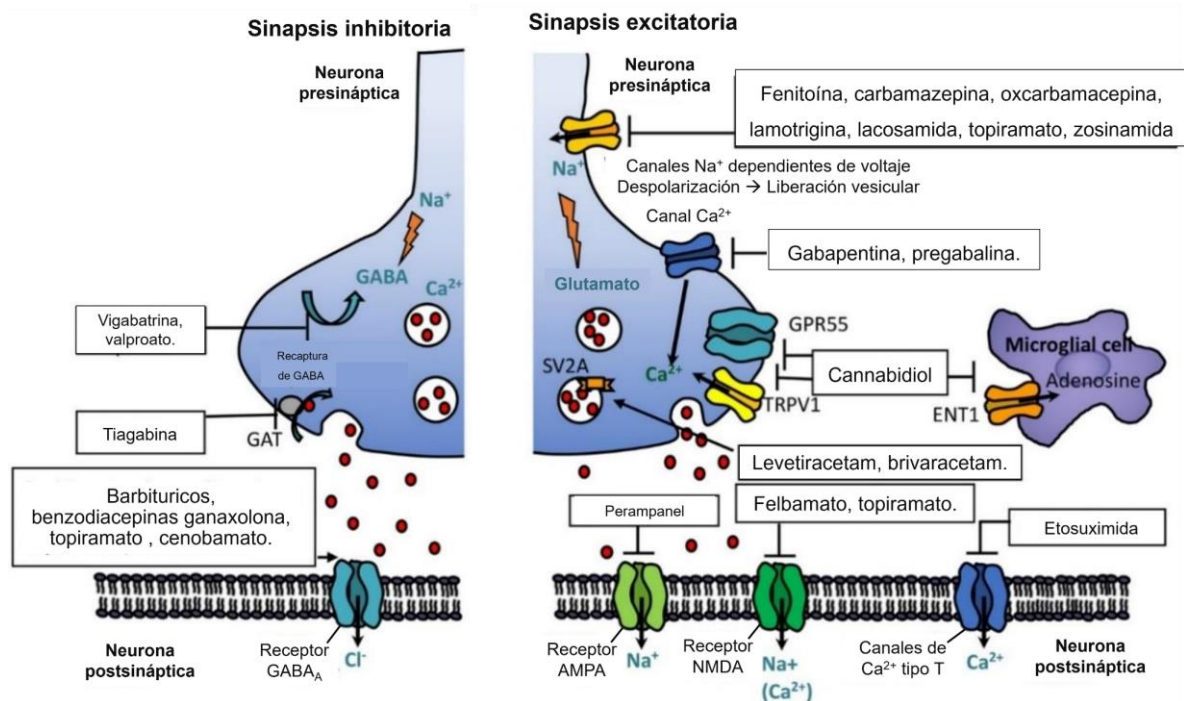


Figura 4. Esquema representativo de las dianas farmacológicas de los fármacos antiepilépticos más utilizados clínicamente. Tomado y modificado de Johannessen Landmark y cols., 2023.

Dado que muchos de los fármacos antiepilépticos actuales presentan importantes limitaciones tanto en eficacia como en seguridad, se ha incrementado el interés por desarrollar alternativas terapéuticas complementarias y más específicas.

Es frecuente que algunos pacientes requieran la administración concomitante de dos o más fármacos antiepilépticos para lograr un control adecuado de las crisis convulsivas. Sin embargo, esta politerapia puede incrementar la incidencia de efectos adversos como, daño hepático, alteraciones conductuales, deterioro cognitivo, trastornos gastrointestinales, leucopenia, disfunciones endocrinas, teratogenicidad, psicosis, depresión, y desarrollo de farmacoresistencia, entre otros (Greenwood, 2000; Marson y cols., 2007).

A pesar de que los tratamientos farmacológicos actuales logran suprimir las convulsiones en muchos casos, no actúan sobre los procesos inflamatorios subyacentes, ni detienen la progresión del trastorno epiléptico.

Ante esta limitación, la investigación de nuevas alternativas terapéuticas para la epilepsia se ha ampliado más allá de los modelos experimentales tradicionales *in vivo* e *in vitro* incorporando también estrategias *in silico*. Estas herramientas computacionales permiten modelar y predecir las interacciones moleculares entre fármacos (ligandos) y dianas biológicas, proporcionando un respaldo teórico para el diseño y optimización de tratamientos, en complemento con los enfoques experimentales.

En este contexto, ha cobrado relevancia el estudio de compuestos de origen natural como los fitoquímicos (sustancias bioactivas producidas por plantas), debido a que podrían ofrecer perfiles de seguridad más favorables en comparación con los fármacos convencionales. Un grupo particularmente prometedor son los *fitocannabinoides*, compuestos derivados de *Cannabis sativa* s., ya que se ha observado que el sistema endocannabinoide participa en la modulación de múltiples mecanismos celulares alterados en la epilepsia.

Modelo convulsivo con pentilentetrazol

El PTZ es una molécula bicíclica derivada del tetrazol, compuesta por un anillo de tetrazol, un grupo metilo y un grupo butilo (figura 5A). Actúa como antagonista del receptor GABA_A —canales ionotrópicos permeables a Cl— bloqueando la inhibición presináptica mediada por GABA y favoreciendo la excitabilidad neuronal (Banna y Hazbun, 1969; Brunton y cols., 2018). Debido a su alta solubilidad, capacidad para atravesar la BHE y bajo costo, es ampliamente utilizado para inducir crisis convulsivas en modelos animales, tanto para el estudio de la fisiopatología epiléptica como para la evaluación de nuevos fármacos anticonvulsivos (Mason y Cooper, 1975; Weller y Mostofsky, 1995; Hoeller, 2017). A diferentes dosis, el PTZ provoca crisis de diferente intensidad (figura 5B). Las dosis subconvulsivas (20–40 mg/kg) administradas en intervalos de 24–48 h permiten inducir el fenómeno de *kindling*, en el cual los animales desarrollan crisis espontáneas sin necesidad de nuevas administraciones (Mason y Cooper, 1972; Caín, 1981; Weller, 1995). Con repeticiones suficientes (3–6 inyecciones), la mayoría progresa a crisis tónico-clónicas generalizadas (Brunton y cols., 2018), lo que convierte a este en un modelo idóneo para evaluar la eficacia anticonvulsiva de manera dosis-dependiente (Sarkisian y cols., 2001).

En el plano neuroquímico, el PTZ induce un aumento excesivo de glutamato extracelular y la liberación de mediadores proinflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que contribuyen al daño neuronal y a la perpetuación de la actividad epileptiforme (Marescaux y cols., 1984; Snead y cols., 1992; Keogh y cols., 2005; Zhao y cols., 2006; Velíšková, 2006).

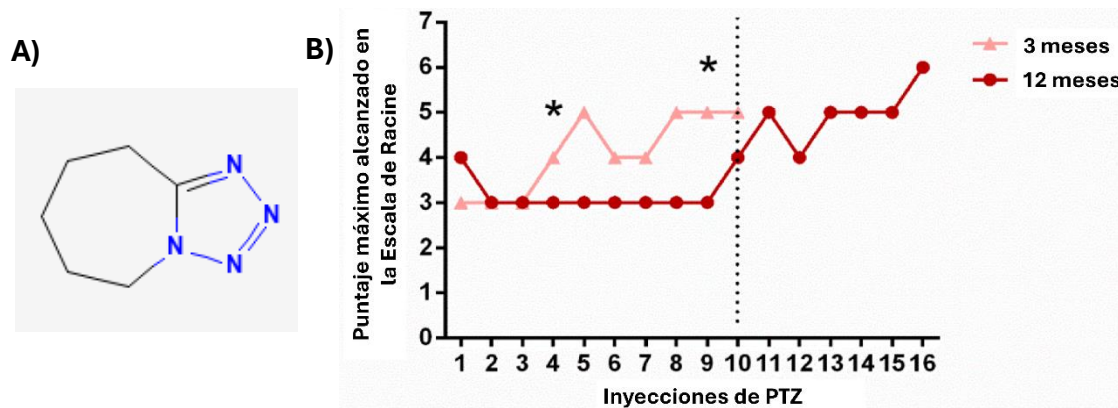


Figura 5. Modelo convulsivo con Pentilentetrazol. A) Estructura química del PTZ (Tomado del repositorio PubChem, 2024). B) Modelo convulsivo inducido por PTZ (35 mg/kg vía i.p.), se registra el puntaje más alto alcanzado por día respecto a la escala de Racine, en dos tratamientos con diferente duración y edad de los biomodelos (10 inyecciones de PTZ en ratas de 3 meses y 16 inyecciones en ratas de 12 meses). Se observa el aumento de la intensidad de las crisis convulsivas al aumentar el número de inyecciones de PTZ. Tomado y modificado de Hoeller y cols., 2017.

Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC), descrito en la década de 1980 es una compleja red de señalización involucrada en diversos procesos celulares fisiológicos y cognitivos, con el objetivo de mantener la homeostasis celular y tisular. Este sistema está mediado por moléculas lipídicas denominadas endocannabinoides (eCB) (Devinsky y cols., 2014; Farelly y cols., 2021). El SEC está conformado por tres componentes principales: (1) los receptores cannabinoides (CBR) CB1 y CB2, (2) los ligandos endógenos que lo activan — principalmente la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) —, y (3) las enzimas responsables de su síntesis y degradación — la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) — (Di Marzo y cols., 1998; Mechoulam y Parker, 2013).

El receptor CB1 fue descubierto en 1988 (Matsuda y cols., 1990) y el CB2 en 1992 (Munro y cols., 1993); ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Poco tiempo después, se identificaron los primeros ligandos endógenos del SEC: la AEA (Devane y cols., 1992) y el 2-AG; (Mechoulam y Hanuš,

2000). Estos eCB son sintetizados por las neuronas en respuesta al aumento de Ca^{2+} intracelular y liberados de manera retrógrada para unirse a sus receptores, regulando la liberación de neurotransmisores en la sinapsis (Di Marzo y cols., 1998; Di Marzo y cols., 2015). Tras su acción, la AEA y el 2-AG son degradados por la FAAH y la MAGL, respectivamente.

Además de CB1 y CB2, el SEC se considera actualmente una red de señalización más amplia, en la que participan otros receptores como TRPV1, GPR55 o PPARs. Los fitocannabinoides pueden unirse a varios de estos receptores y desencadenar respuestas celulares específicas (Kano y cols., 2009).

Receptores cannabinoides en el cerebro

Los CBR, presentan 7 dominios transmembranales (TM1-TM7) y se acoplan principalmente a proteínas $G_{i/o}$ (Shahbazi y cols., 2020). El receptor CB1 es el GPCR más abundante en el SNC y se localiza principalmente en las terminales axónicas de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, donde regula la liberación de neurotransmisores (Mechoulam y Parker, 2013), un mecanismo que podría estar implicado en los efectos anticonvulsivos de los fitocannabinoides.

Por su parte, el receptor CB2 se expresa en células neuronales, gliales y endoteliales de diversas regiones del cerebro, incluyendo corteza cerebral, hipocampo, tálamo, mesencéfalo, cerebelo, amígdala, bulbo raquídeo, tronco encefálico y sustancia nigra (Devane y cols., 1988; Munro y cols., 1993; Van Sickle y cols., 2005; Gong y cols., 2006; Brusco y cols., 2008a; Brusco y cols., 2008b). Sin embargo, su mayor expresión se observa en células inmunitarias, especialmente la microglía, donde puede modular cascadas inflamatorias activadas durante las crisis epilépticas (Bow y Rimoldi, 2016; Karan y cols., 2021).

Fitocannabinoides como alternativa terapéutica en la epilepsia

Cannabis sativa, es una planta medicinal de la familia Cannabaceae que ha sido utilizada con fines terapéuticos desde la antigüedad. Los registros de su uso

se remontan al año 2700 a. C. en la medicina tradicional China, donde se empleaban preparados de las flores y resinas para tratar afecciones como: reumatismo, dismenorrea, fiebre, estreñimiento, y convulsiones. El descubrimiento del sistema endocannabinoide y su interacción con los compuestos de *C. sativa* ha renovado el interés farmacológico en esta planta, particularmente para enfermedades neurológicas como la epilepsia (Devinsky y cols., 2014; Bow y Rimoldi, 2016).

El interés actual se centra en su fitocomplejo que incluye más de 500 metabolitos secundarios, entre ellos al menos 100 *fitocannabinoides*, que son compuestos terpenofenoles que actúan sobre el SEC (Fasinu y cols., 2016). Entre los más estudiados se encuentra el Δ -9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG) (figura 6) debido a sus efectos moduladores sobre la neurotransmisión, la inflamación y la función inmunitaria (Di marzo y cols., 2015; Farrelly y cols., 2021).

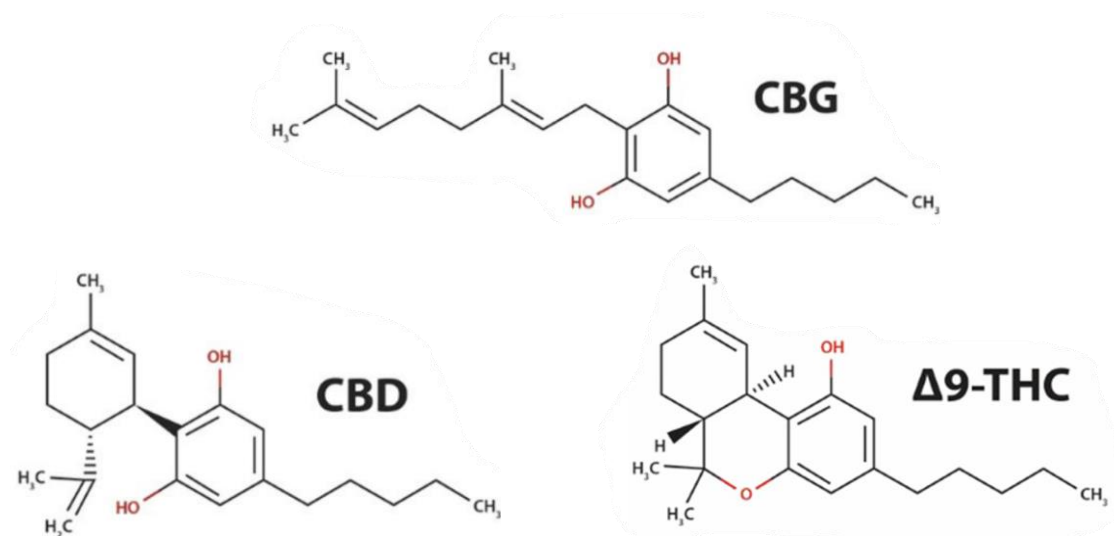


Figura 6. Estructuras químicas correspondientes al **a)** Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9THC), **b)** cannabidiol (CBD) y **c)** cannabigerol (CBG).

No obstante, aún se requiere una comprensión más profunda de los mecanismos de acción de cada fitoquímico, así como de sus posibles efectos sinérgicos o antagónicos cuando se administran en combinaciones específicas.

El sistema endocannabinoide en la epilepsia

El SEC está implicado en la fisiopatología de la epilepsia, mostrando alteraciones tanto en su expresión como en su función reguladora tras eventos convulsivos (Devinsky, 2014). Diversos estudios en modelos animales han demostrado que el receptor CB1 participa en la modulación de la liberación de neurotransmisores, lo que podría explicar el efecto anticonvulsivo observado con el uso de extractos de *Cannabis sativa* en el tratamiento de las crisis epilépticas (Kano y cols., 2009). Estos hallazgos posicionan al CB1 como una posible diana terapéutica para el control de la actividad neuronal excesiva característica de esta enfermedad. Además, se ha reportado un incremento en la expresión del receptor CB2 en ciertas regiones del cerebro tras crisis convulsivas. Por ejemplo, Karan y cols., (2021) evaluaron la expresión de CB2 en la neocorteza y el hipocampo en un modelo de epilepsia inducido por pentilentetrazol (PTZ). Observaron un aumento significativo de la expresión de este receptor solo en el hipocampo dorsal a las seis horas después de la inducción de las crisis tónico-clónicas (70 mg/Kg). En contraste, este aumento no se evidenció en crisis de tipo ausente (30 mg/Kg). Esto, a diferencia de la corteza y del hipocampo ventral donde no se observó un aumento significativo de la expresión del receptor CB2, lo cual, plantea que este receptor tiene un papel modulador en la inflamación en el hipocampo tras la presencia de una crisis tónico-clónica generalizada, mientras que la modulación de inflamación cortical y leptomeníngea no depende de estos receptores (figura 7).

A diferencia del CB1, la activación del CB2 no parece ejercer un efecto antiepiléptico directo, sin embargo, se ha asociado con acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras. Por ello, el CB2 representa una diana potencial para mitigar las

consecuencias inflamatorias y estructurales provocadas por las crisis, más que para prevenir la actividad convulsiva *per se*.

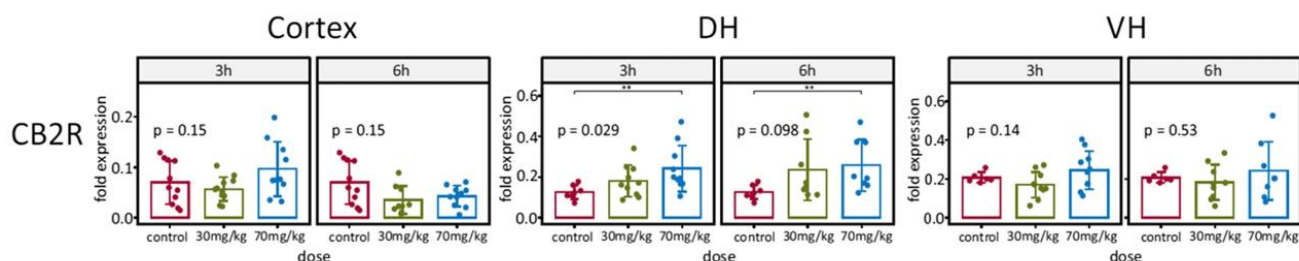


Figura 7. Efecto del PTZ sobre la expresión del ARNm del receptor CB2 en cerebro de rata. Se presentan los niveles de expresión del receptor CB2 tras la administración de dos dosis de PTZ (30 mg/kg y 70 mg/kg) en la neocorteza, en el hipocampo dorsal (DH) y en el hipocampo ventral (VH), evaluados a las 3 y 6 horas postratamiento. Tomado de Karan y cols., 2021.

Cannabidiol y Cannabigerol en el proceso de epilepsia

El CBD es uno de los *fitocannabinoides* más estudiados para el tratamiento de la epilepsia. A diferencia del THC no presenta efectos psicoactivos y actúa sobre múltiples dianas moleculares (pleiotropismo), incluidas más de 60 proteínas receptoras, entre ellas el receptor CB2. Uno de sus principales mecanismos de acción es la inhibición de la enzima FAAH, lo que aumenta la biodisponibilidad de los endocannabinoides AEA y 2-AG, prolongando así, la acción sobre los receptores CB1 (figura 8; Pertwee, 2008; Leweke, y cols., 2012). Además, diversos estudios han validado su seguridad farmacológica, incluso en poblaciones pediátricas, a diferencia del THC, que produce efectos eufóricos y alteraciones cognitivas (Friedman, y cols., 2019; Ghovanloo y cols., 2022).

Entre sus dianas adicionales destaca el receptor activado por proliferador de peroxisoma tipo gamma (PPAR γ), un factor de transcripción nuclear involucrado en la regulación del metabolismo, la homeostasis energética, la diferenciación celular y los procesos inflamatorios (O'Sullivan, 2006).

promueve la regulación de genes antiinflamatorios mediante la inducción de la vía del factor nuclear relacionado con el eritroide 2 (Nrf2) y la inhibición de la actividad del factor nuclear-kappa B (NF-kB), lo que suprime la expresión de citocinas proinflamatorias como: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 y la COX-2 (Cai y cols., 2022, Laurindo y cols., 2023). Esta acción es particularmente relevante en la epilepsia, ya que los episodios convulsivos inducen inflamación neurotóxica que favorece la progresión de la enfermedad.

El receptor PPAR γ se expresa en células inmunitarias, en el tejido adiposo, en astrocitos y microglía, y en el SNC se localiza principalmente en las células granulosas del giro dentado del hipocampo (Braissant y cols., 1996; Bernardo y cols., 2000). Su activación se ha asociado con efectos anticonvulsivos dependiente de la dosis, reducción del óxido nítrico (relacionado con estrés oxidativo), preservación de la barrera hematoencefálica (BHE) y prevención de apoptosis de neuronas GABAérgicas, lo que favorece el mantenimiento de la neurotransmisión inhibitoria afectada en epilepsia (Lowenstein y cols., 1991).

Además del CBD, el cannabigerol (CBG) ha despertado interés por su potencial terapéutico debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. El CBG presenta una afinidad de unión a PPAR γ incluso mayor que el CBD (D'Aniello y cols. 2019) y también actúa como agonista parcial del receptor CB2 con una constante de inhibición (K_i) de 2.6 μ M (Gauson y cols., 2007), modulando respuestas neuroinmunes (Macêdo y cols., 2018). Esto resulta especialmente relevante dado que las neuronas, por su elevada actividad metabólica y limitada capacidad antioxidante, son altamente susceptibles al daño por estrés oxidativo (Baxter, 2016) El CBG también interactúa con múltiples dianas moleculares implicadas en la epilepsia (figura 9; Nachnani y cols., 2021; Jastrząb y cols., 2022).

No obstante, el CBG podría contribuir a disminuir la neuroinflamación y el estrés oxidativo asociados a la excitotoxicidad inducida por entrada masiva de Ca²⁺, mediante la reducción de marcadores inflamatorios como IL-1 β y TNF- α (Deiana, 2017; Granja y cols., 2012; Giacoppo y cols., 2017).

Estos efectos, sumados a su capacidad para modular canales iónicos y la recaptura de GABA, posicionan al CBG como un modulador indirecto con potencial terapéutico complementario al CBD en la epilepsia.

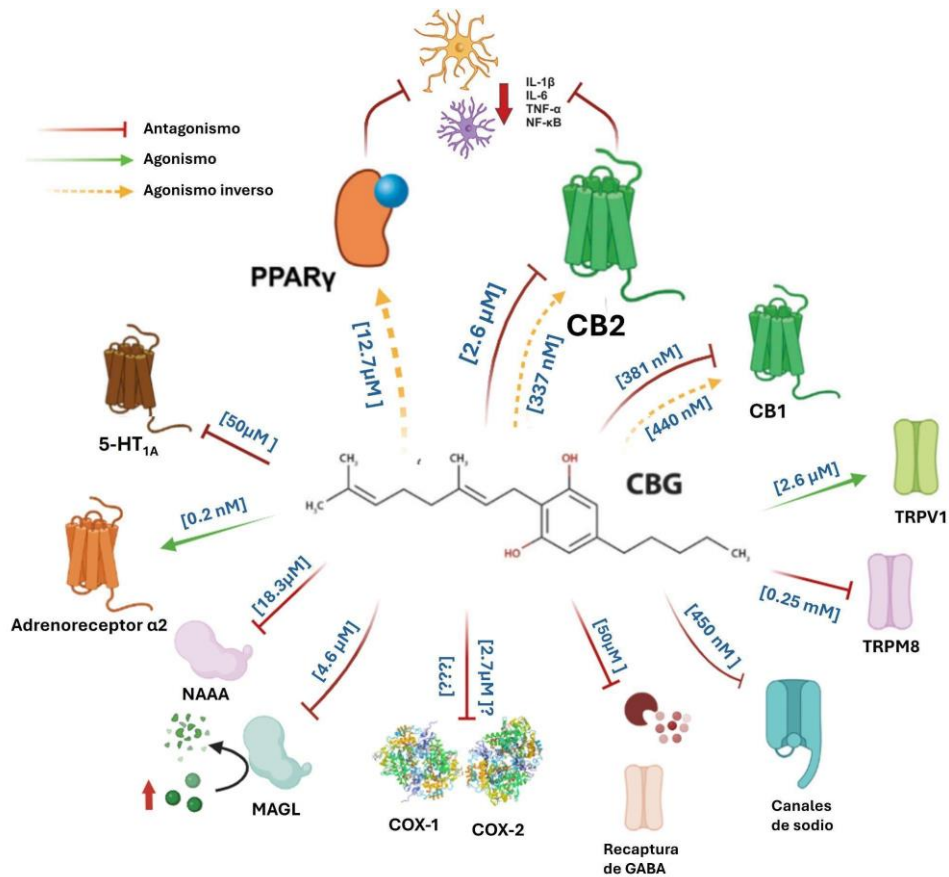


Figura 9. Dianas biológicas del Cannabigerol involucradas en procesos de epilepsia. Efectos y dosis del cannabigerol sobre diferentes receptores que participan en procesos anticonvulsivos y antiinflamatorios. El cannabigerol tiene un efecto antiinflamatorio mediante los receptores PPAR γ , 5-HT $_1A$, COX-1 y COX-2. Si bien el cannabigerol por sí solo no tiene efectos anticonvulsivos en modelos animales, puede actuar sobre diversas dianas como el TRPV-1, la inhibición de los transportadores de GABA, y la inhibición de la FAAH, mecanismos que de ser potenciados podrían inhibir la aparición de las crisis convulsivas. Tomado y modificado de Patricio y cols., 2020.

Uso de herramientas *in silico* para el estudio de fármacos.

Además de los modelos experimentales tradicionales, el desarrollo de alternativas farmacológicas para el tratamiento de diversas patologías (incluida la

epilepsia) ha incorporado metodologías teóricas propuestas por disciplinas como la Bioinformática, la Química y la Biología computacional. Estas técnicas en conjunto son conocidas como métodos *in silico*, es decir, "hecho por computadora o simulación computacional" y contribuyen, entre otras cosas, a la comprensión de los procesos implicados en la comunicación y en la generación de respuestas celulares derivadas de la interacción entre fármacos y sus receptores biológicos.

Por una parte, la bioinformática es la rama de la biología que se centra en adquirir, organizar, analizar y distribuir información proveniente de datos experimentales, aplicando análisis de datos, modelos matemáticos y simulaciones computacionales para estudiar sistemas biológicos, conductuales y sociales, con el fin de organizar, archivar o analizar esa información (Rastogi y cols., 2013)

Por otra parte, la química y la biología computacional son ramas de la biología empleadas para varios propósitos, entre ellos destaca la propuesta de dianas farmacológicas de interés, el diseño de fármacos basados en la estructura, la predicción estructural de proteínas, el acoplamiento entre moléculas, el análisis de la estabilidad de complejos ligando-receptor a lo largo del tiempo, entre otros. Estas técnicas se extienden a otras ramas de la biología como la genética, la farmacología, la biología molecular, la bioquímica, entre otras, contribuyendo a la resolución de problemas mediante el análisis teórico de las conformaciones e interacciones moleculares resultantes (Geppert y cols., 2010). Cabe resaltar que estas metodologías ayudan a predecir y/o a respaldar un resultado obtenido de manera experimental, ya sea *in vitro* o *in vivo*, mediante la simulación de procesos biológicos de manera teórica para su posterior análisis, optimizando el uso de recursos económicos y disminuyendo el tiempo empleado para la obtención e interpretación de resultados experimentales de manera complementaria—(López-Vallejo y cols., 2011; Ferreira y cols., 2015).

Por ello, el creciente avance de estas tecnologías computacionales en los últimos años nos ha permitido organizar la información biológica, crear bases de datos universales y desarrollar algoritmos para seleccionar y manejar datos

estructurales y de secuencias aminoacídicas, los cuales aportan información importante para proponer y desarrollar proyectos que requieren de estructuras proteicas que pueden ya haber sido resueltas o no de manera experimental, y que tengan una aplicación farmacológica potencial.

Acoplamiento Molecular

El **acoplamiento molecular** (*molecular docking*) es un procedimiento computacional (*in silico*) que intenta predecir con ayuda de *software*, las conformaciones y la afinidad que tiene una macromolécula (receptor) por una molécula pequeña (ligando) o bien por otra macromolécula. Esta herramienta se desarrolló en la década de 1980 y, a la fecha, el número de trabajos científicos que hacen uso de esta técnica ha aumentado considerablemente, ya que la información que provee ha contribuido al desarrollo de compuestos con potencial farmacológico, por lo que hacer uso de esta técnica puede contribuir al establecimiento de hipótesis, así como para respaldar resultados obtenidos mediante técnicas experimentales. El fundamento de esta técnica se basa en la interpretación de datos fisicoquímicos que resultan en una conformación tridimensional posible en un complejo ligando-receptor. La interpretación de datos que poseen los átomos entre ambas moléculas se realiza mediante el cálculo de funciones de puntuación y la simulación de las posibles conformaciones que adoptaría un ligando en el receptor en un espacio tridimensional (Filgueira, 2019). El acoplamiento de un compuesto se puede dar en diferentes sitios de una proteína, donde el sitio principal es conocido como sitio ortostérico. El sitio ortostérico se define como el sitio donde se une el ligando endógeno. Los sitios alostéricos se definen como dominios receptores distintos que modulan la unión del ligando ortostérico y la actividad del receptor a través de cambios en la conformación del receptor (Pertwee, 2008; Wenthur y cols., 2014).

Para la realización del acoplamiento molecular, es necesario el reconocimiento de las estructuras tridimensionales de las moléculas que se

utilizarán y se usan software especializados para dicha tarea, los cuales se basan en algoritmos que interpretan los datos fisicoquímicos. La naturaleza de la molécula que fungirá como receptor puede ser variada, por ejemplo, una proteína, una enzima, un segmento de ácido nucleico, algún carbohidrato o péptido, cuya información estructural y de secuencia están disponibles en bases de datos internacionales de acceso público, algunas de las cuales se comentan en la siguiente sección.

Bases de datos estructurales

La búsqueda y la selección de estructuras tridimensionales de los receptores y de los ligandos requeridos para las pruebas de acoplamiento molecular, se realiza en diferentes bases de datos de libre acceso, en las que está depositada la información de un gran número de estructuras resueltas por diversas técnicas experimentales o teóricas, como la difracción de rayos X, la crioscopia, la inteligencia artificial, etc. Esta información se encuentra recopilada y almacenada en formatos compatibles para los distintos programas computacionales utilizados para su visualización y análisis. Antes de ser publicadas, estas estructuras son previamente revisadas y aceptadas por especialistas de las distintas organizaciones que las recopilan.

Protein Data Bank

El Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés), es uno de los repositorios de estructuras 3D de macromoléculas biológicas (proteínas, ADN y ARN) más completos a nivel mundial, y son esenciales para la investigación y la educación en biología básica, salud, energía y biotecnología. Estas estructuras han sido determinadas experimentalmente mediante cristalografía, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), microscopía electrónica, crioscopia e inteligencia artificial (Burley, 2017). Cada archivo PDB contiene las coordenadas tridimensionales (x, y, z) de los átomos que componen la proteína y las superpone

en el espacio 3D. Esta base de datos alberga alrededor de 228,227 estructuras cristalográficas a diciembre de 2024 (*Protein Data Bank* - <https://www.rcsb.org/>, 2024), y está vinculada a aproximadamente 50 bases de datos con las que comparte información para tener fichas técnicas más amplias.

Algunas de estas bases de datos vinculadas son UniProt, DrugBank, Gene Oncology, NCBI, AlphaFold, y PubChem (RSCB-PDB, 2025; Joosten y cols., 2010).

Base de Datos Estructurales de Cambridge (CSD)

La *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC, ccdc.cam.ac.uk) es una plataforma digital que contiene un registro completo de todas las estructuras químicas (dilucladas en su mayoría por difracción de rayos X) de moléculas pequeñas orgánicas y organometálicas que han sido publicadas. Actualmente aloja 1.25 millones de archivos, los cuáles son procesados tanto computacionalmente como por expertos en química estructural antes de ingresar a la base de datos. Un componente clave de este procesamiento es la asociación de la identidad química de la estructura estudiada con los datos experimentales para ayudar a garantizar que los datos sean fiables y ampliamente utilizables (Groom y cols., 2016). De esta base de datos se obtiene la información de las moléculas pequeñas cuyo papel en el acoplamiento molecular es de ligando.

Alineamiento de secuencias

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) pertenece al *National Library of Medicine* (NLM), que forma parte del *National Institute of Health* (NIH). Es un instituto que cuenta con acceso público a un conjunto de recursos computacionales que permiten el análisis molecular de sistemas biológicos, y a una serie de bases de datos con información genética, proteica, taxonómica, bibliográfica, etc., referente a temas asociados a las ciencias naturales y de la salud (Guzmán-López y cols., 2023). La herramienta BLAST (de sus siglas en inglés: Herramienta básica

de búsqueda de alineación local - [Basic Local Alignment Search Tool](#)) es capaz de comparar, por pares, una secuencia problema de nucleótidos o aminoácidos contra una gran cantidad de secuencias depositadas en esta y otras bases de datos como GenBank y determinar el porcentaje de identidad y similitud entre ellas mediante algoritmos que puntúan las coincidencias y no coincidencias, así como la significación de cada resultado (Boratyn, 2013).

Los alineamientos por pares y múltiples de secuencias que se realizan en BLAST, se pueden utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a identificar miembros de familias de genes y proteínas. Además, es de gran utilidad en la predicción estructural de proteínas no resueltas experimentalmente, constituyéndose como el primer paso teórico de este procedimiento.

Predicción estructural de proteínas

En el desarrollo o modificación teórica de fármacos es indispensable contar con la estructura del receptor blanco dilucidada por métodos experimentales (Cristalografía, difracción de rayos X, etc.). En caso de no contar con esta información, existen metodologías que aportan una aproximación aceptable de dichas macromoléculas, ya que predecir cómo una secuencia aminoacídica (estructura primaria de las proteínas) llega a su conformación final, es un gran reto debido a la complejidad de las interacciones entre los átomos que conforman a la proteína (Schaarschmidt y cols., 2018; Jumper, 2021).

Desde hace 50 años se ha planteado la posibilidad de resolver estas estructuras mediante procesos computacionales y predecir la conformación tridimensional de una macromolécula (nos referiremos a las proteínas por ser las que se trabajarán en este estudio) lo más cercana a la realidad (Anfinsen, 1973). En general, estas metodologías parten de datos previos de estructuras similares ya resueltas cristalográficamente, en conjunto con el análisis de secuencias de aminoácidos de diferentes especies emparentadas para mapear la covariación

entre secuencias, y la aplicación de redes neuronales profundas para identificar patrones en la secuencias y acoplamientos coevolutivos para convertirlos en mapas de contacto (Li y cols., 2021). Por otro lado, en los últimos 10 años, el desarrollo de sistemas de inteligencia artificial ha provisto de nuevas herramientas para la predicción de estructuras moleculares con una gran precisión (Jumper y cols., 2021) como es el caso de Alpha Fold, cuya descripción se encuentra a continuación.

AlphaFold

Entre las distintas herramientas desarrolladas para la predicción de modelos proteicos se encuentra AlphaFold, que es un sistema de inteligencia artificial (IA) desarrollado por DeepMind, revolucionando el campo de la biología estructural (AlphaFold - alphafold.ebi.ac.uk) (Varadi y cols., 2023). Tiene como objetivo principal predecir las estructuras tridimensionales de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos, lo cual había sido un desafío complejo durante las últimas décadas.

AlphaFold ha sido capaz de resolver el problema del “plegamiento de proteínas” con base en técnicas de aprendizaje profundo (deep learning) y redes neuronales para predecir la estructura de las proteínas. Toma como datos de entrada las estructuras primarias de las proteínas, o bien, las secuencias de proteínas homólogas obtenidas de bases de datos como Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), PDB, Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), entre otras, empleando redes neuronales convolucionales que analizan dichas secuencias para modelar patrones locales y globales, predecir las distancias y ángulos entre pares de átomos y así, construir un modelo 3D. Posteriormente, este modelo se optimiza para garantizar que sea un modelo acorde a las leyes de la física y la química (Jumper y cols., 2021).

En 2020, DeepMind presentó resultados en los que AlphaFold fue capaz de predecir con una gran precisión estructuras proteicas que no habían podido ser resueltas de manera experimental. Actualmente, la plataforma proporciona acceso

abierto a una biblioteca de más de 200 millones de predicciones estructurales de proteínas para acelerar la investigación científica (Varadi y cols., 2023).

Alineamiento estructural

Existen métodos de comparación entre dos estructuras basándose en la geometría tridimensional, en lugar de solo sus secuencias de aminoácidos. PDBeFold (herramienta proporcionada por el Protein Data Bank in Europe-PDBe, <http://ebi.ac.uk>), funciona como una herramienta de alineación por pares o múltiple basándose en las coordenadas atómicas de cada proteína, para encontrar estructuras similares.

PDBeFold toma como información de entrada las conformaciones tridimensionales de las proteínas, generalmente en formato PDB (Protein Data Bank). El programa utiliza diferentes métricas para la validación de las comparaciones secuenciales integradas en el Q-score el cual evalúa su calidad mediante la combinación de parámetros como el RMSD (*Root Mean Square Deviation*/Desviación cuadrática media, por sus siglas en inglés), la cobertura del alineamiento y la calidad global de la alineación.

2. Justificación

La epilepsia no solo se caracteriza por la presencia de crisis convulsivas (síntoma que por sí mismas puede resultar altamente incapacitante), sino que también se asocia con diversas comorbilidades psiquiátricas y cognitivas. Entre las más comunes se encuentran la ansiedad, la depresión y los trastornos mentales, condiciones que afectan significativamente la calidad de vida del paciente y de su entorno familiar. Los tratamientos antiepilépticos disponibles permiten controlar las crisis hasta en aproximadamente el 70% de los casos, pero un porcentaje importante de pacientes presenta farmacoresistencia y efectos adversos no deseados como deterioro cognitivo, hepatotoxicidad y alteraciones del comportamiento. Por ello, es de gran interés la búsqueda de nuevas alternativas que puedan tener una amplia actividad sobre el organismo sin comprometerse a efectos adversos graves, por lo que en los últimos años se ha optado por el uso de fitoquímicos.

Se ha demostrado que el cannabidiol puede ejercer efectos anticonvulsivos mediante diferentes vías celulares, y recientemente, se ha propuesto su administración con cannabigerol en algunos modelos experimentales. La evidencia sugiere que puede existir una sinergia entre ambos compuestos, sin embargo, esta combinación no ha sido empleada en modelos de epilepsia.

El uso de metodologías computacionales, como el acoplamiento molecular, en el diseño de nuevos fármacos ha permitido explorar, a nivel teórico, las interacciones moleculares fármaco-receptor para el respaldo de pruebas experimentales. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto sinérgico de CBD y CBG en las crisis convulsivas inducidas por PTZ *in vivo* y analizar *in silico* la afinidad de ambos fitoquímicos por los receptores CB2 y PPAR γ , debido a que la conformación de estos ligandos en estos receptores podría activarlos en cierta medida y participar en la modulación de la respuesta inflamatoria y neuronal en el SNC a causa de las crisis convulsivas, atenuando el progreso de la enfermedad y los síntomas asociados.

3. Hipótesis

La coadministración de cannabidiol y de cannabigerol reduce la intensidad y la frecuencia de las crisis convulsivas en ratas administradas con pentilentetrazol, los resultados experimentales serán respaldados de manera teórica mediante técnicas *in silico*.

4. Objetivo general

Evaluar el efecto de la coadministración del cannabidiol y el cannabigerol sobre la intensidad y la frecuencia de las crisis convulsivas en ratas inducidas con pentilentetrazol, así como realizar el modelado computacional del acoplamiento molecular entre estos cannabinoides con los receptores CB2 y PPAR γ .

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la coadministración del cannabidiol y el cannabigerol sobre la intensidad y la frecuencia de las crisis convulsivas inducidas por pentilentetrazol en ratas Wistar
- Evaluar el efecto de la coadministración del cannabidiol y el cannabigerol sobre la latencia a la primera crisis mioclónica y sobre la duración de las crisis tónico-clónicas inducidas por pentilentetrazol en ratas Wistar.
- Predecir las estructuras proteicas del receptor cannabinoide tipo II (CB2) y del receptor activado por proliferador de peroxisoma tipo gamma (PPAR γ) de la especie *Rattus norvegicus* (rCB2 y rPPAR γ).
- Analizar, mediante la técnica de acoplamiento molecular, los posibles sitios y modos de unión del cannabidiol y cannabigerol con los receptores rCB2 y rPPAR γ .

5. Material y Métodos

Diagrama de trabajo experimental

Se empleó el diseño experimental que se muestra en la figura 10, con una duración total de 14 días.

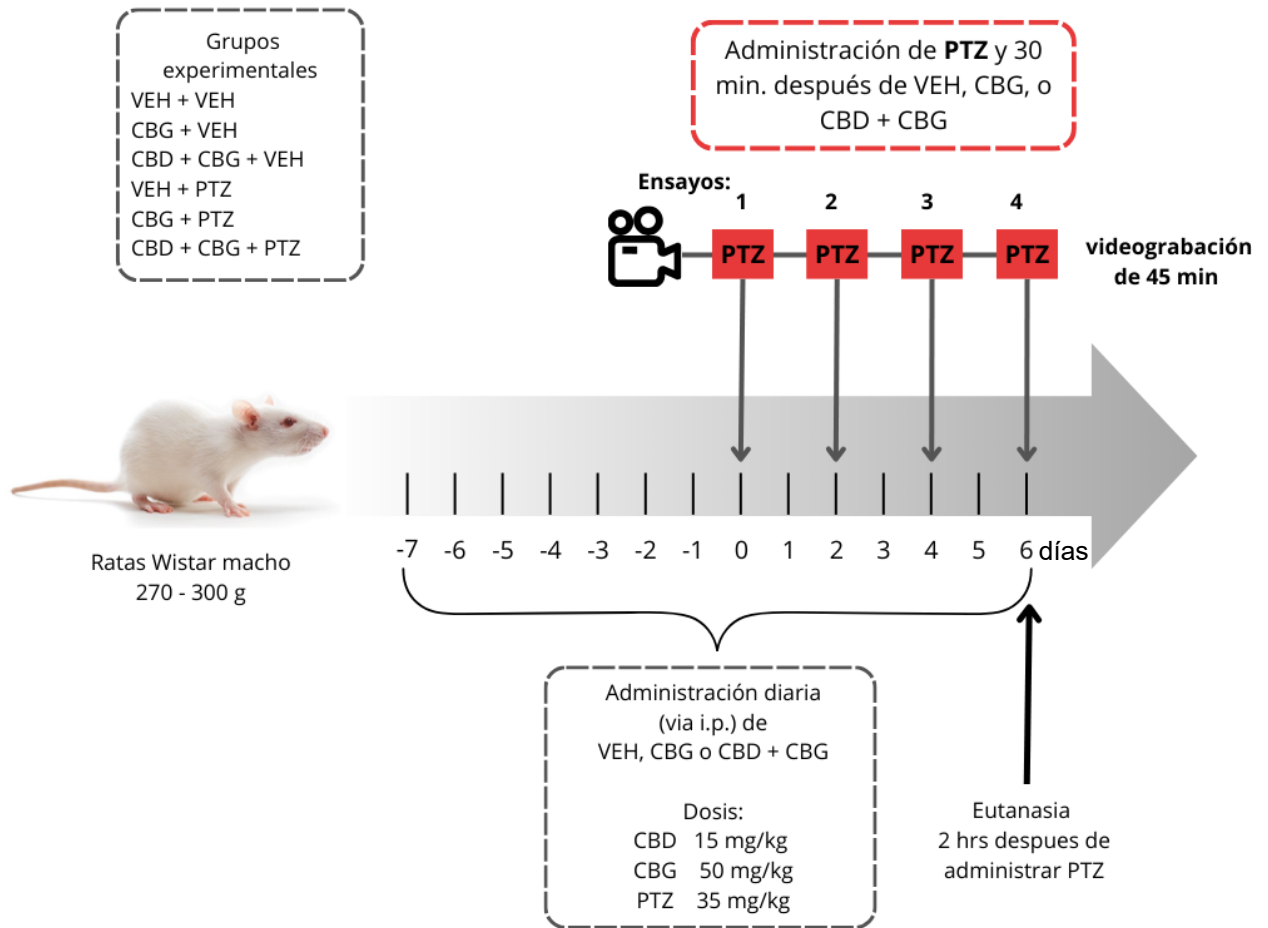


Figura 10. Diagrama de trabajo experimental. Desde el día -7 hasta el día 6 se administró, según el grupo experimental, vehículo, CBG o la combinación CBD+CBG. A partir del día 0 se inició el tratamiento con PTZ para la inducción de crisis convulsivas, el cual se aplicó en cuatro sesiones. Después de cada administración de PTZ, los animales fueron videograbados durante 45 minutos para la evaluación conductual. El día 6, dos horas después de la última administración de PTZ, los animales fueron eutanasiados para la obtención de muestras.

Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (n=43) con un peso de 270-320g, proporcionados por el bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Los animales se mantuvieron en el Laboratorio de Neurofarmacología-FCQ en cajas de acrílico transparente a una temperatura de 22 ± 1 °C, con un ciclo luz/oscuridad de 12 h/12 h (fase de luz: 07:00–19:00h), con acceso *ad libitum* de agua y alimento. El manejo, cuidado y todos los procedimientos experimentales se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 - Especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio, y contaron con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP para el Proyecto-VIEP-24-0397. La alumna responsable del presente trabajo acreditó el Curso de “Manejo y vías de administración de animales de laboratorio”, impartido por el personal del bioterio “Claude Bernard”.

Fármacos

El pentilentetrazol (1,5-Pentametenetrazol, Sigma-Aldrich) se administró a una dosis de 35 mg/kg, disuelto en solución salina isotónica (SSI) al 0.9%, obteniendo una concentración final de 70 mg / 2 ml.

El CBD y el CBG fueron proporcionados por HempMeds México® S.A. de C.V. Ambos fármacos se disolvieron en etanol, cremophor y SSI en una proporción 1:1:18 (vehículo). El CBD se administró a una dosis de 15 mg/kg y el CBG a una dosis de 50 mg/kg. Todos los fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal.

Grupos experimentales

Los sujetos de experimentación se mantuvieron en las condiciones de bioterio previamente descritas hasta alcanzar el peso establecido. Una vez alcanzado el intervalo de peso requerido, se asignaron aleatoriamente a 6 grupos

experimentales: VEH + VEH (n=6), CBG + VEH (n=8), CBD + CBG + VEH (n=8), VEH + PTZ (n=5), CBG + PTZ (n=8) y CBD + CBG + PTZ (n=8).

Durante los 14 días del protocolo experimental se administró vehículo, CBG, o CBD + CBG, según el grupo asignado. A partir del día 0, todos los grupos experimentales recibieron 1 inyección de PTZ o SSI (vehículo del PTZ), 30 minutos después de la administración de cannabinoides o vehículo, repitiendo este procedimiento durante cuatro ensayos (figura 10).

Análisis de crisis convulsivas en las videograbaciones

La conducta de los animales fue videograbada durante 45 min después de la administración de PTZ/vehículo en cajas de acrílico transparente (45 x 45 x 45 cm). Todos los animales recibieron la eutanasia 2 h después de la última administración de PTZ/vehículo. Posteriormente los videos fueron analizados manualmente por el experimentador utilizando el *software* de Reproductor Multimedia de Windows 10, se registró la frecuencia de las distintas categorías de crisis convulsivas, de acuerdo con la escala de Racine modificada por Lüttjohann en 2009 (Tabla 1). Asimismo, se cuantificó la latencia a la primera crisis convulsiva y la duración de las crisis tónico-clónicas. Se consideró como *latencia* al tiempo transcurrido (en segundos) desde la administración de PTZ hasta la aparición de la primera crisis, y como *duración* al tiempo total (en segundos) desde el inicio hasta la finalización de la crisis de tipo tónico-clónica.



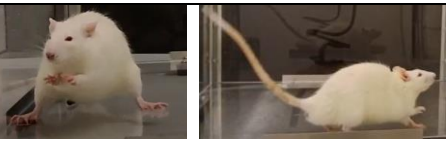

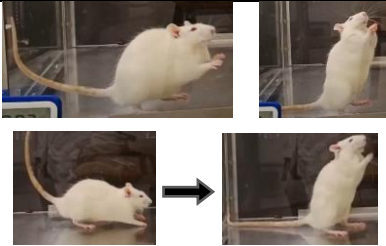

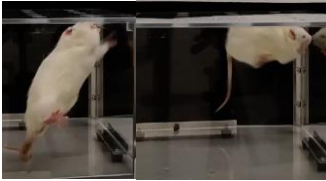
Categoría	Descripción	Expresión conductual
0 – Sin cambios	Ausencia de comportamiento convulsivo	
1– Manifestaciones leves	Temblor de bigotes, sacudidas faciales, sacudidas de cuello	
2–Crisis mioclónicas	Sacudidas breves o tirones musculares o en la porción anterior, patas delanteras y/o el cuello	
3–Clonus de extremidades	Se producen movimientos rítmicos sostenidos de los miembros a ambos lados del cuerpo.	
4–Posición de Canguro	Postura erguida sobre las extremidades traseras.	
5–Crisis tónico-clónicas	Pérdida del tono postural y movimientos de las extremidades tipo “nado” con el animal sobre un costado.	
6–Salto salvaje y muerte	Carrera brusca inicial o un salto seguido de una caída, acompañada por la pérdida del reflejo de enderezamiento o muerte súbita del animal.	

Tabla 1. Escala de Racine. Descripción de las diferentes categorías de crisis convulsivas respecto a la escala de Racine modificada para este estudio.

Análisis estadístico

La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro Wilk. Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron mediante una ANOVA de dos vías, considerando como variable independiente el tratamiento administrado a cada grupo experimental, y como segunda variable el número de ensayos. Posteriormente se realizó una prueba *pos hoc* de Bonferroni. Todos los datos se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA), considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

6. Metodología *in silico*

A continuación, se muestra el diagrama de trabajo donde se comienza por comparar las secuencias aminoacídicas de los receptores biológicos de *Rattus norvegicus* y de *Homo sapiens*, posteriormente obtener los archivos de las estructuras tridimensionales de los receptores CB2 y PPAR γ que se utilizaron para posteriormente someterlas a acoplamiento molecular (figura 11).

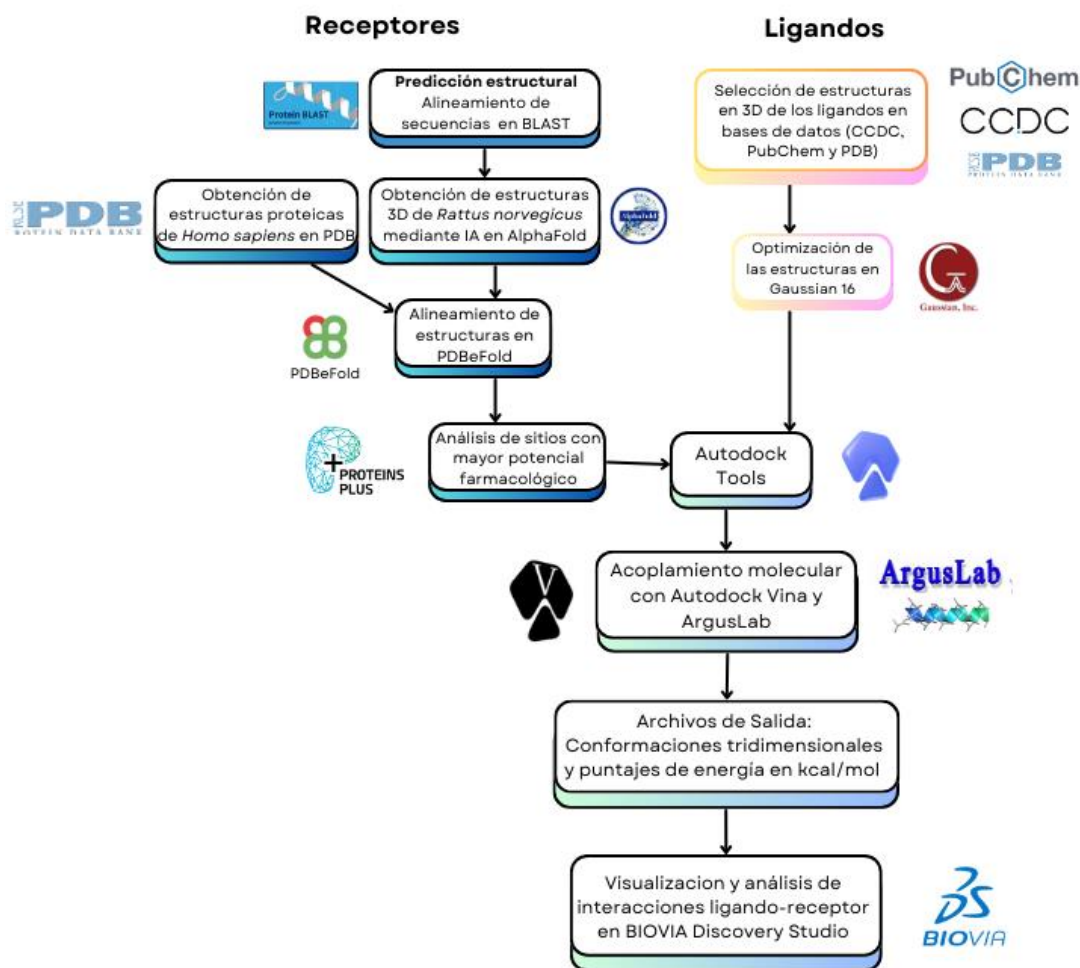


Figura 11. Diagrama de la metodología *in silico*. Se comienza con la búsqueda de estructuras que fungirán como ligando y receptor, las cuales serán sometidas a cálculos de acoplamiento molecular después de pasar por procesos de optimización y de validación estructural.

Obtención de Receptores

Predicción estructural

Las estructuras correspondientes a los receptores CB2 y PPAR γ de *R. norvegicus*, no se encuentran disponibles de manera cristalizada en la base de datos PDB, por lo que fue necesario obtener sus estructuras haciendo uso de herramientas computacionales de predicción de proteínas.

Alineamiento de secuencias

Como primer paso en la predicción estructural, se realizó un alineamiento de secuencias para conocer el grado de similitud entre la secuencia problema y la secuencia molde a utilizar. Para ello, existen diversos programas de libre acceso como es el caso de BLAST, que forma parte del instituto NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. El alineamiento se llevó a cabo por pares entre las secuencias de aminoácidos de *Homo sapiens* (*h*) y *Rattus norvegicus* (*r*) de los receptores CB2 y PPAR γ .

Estas secuencias se descargaron en formato FASTA en la base de datos *Protein Data Bank* perteneciente a NCBI con los códigos de acceso *h*CB2 (NP_001832.1), *r*CB2(NP_001416630.1), *h*PPAR γ (NP_056953.2) y *r*PPAR γ (NP_001416630.1). Posteriormente, se ingresaron las secuencias correspondientes al receptor CB2 de *R. norvegicus* y *H. sapiens* para su alineamiento y de igual manera para los receptores PPAR γ de ambas especies en la interfaz de BLAST. Se estableció la matriz de sustitución Blossom90, una penalización por extensión de brecha de 10 y los demás parámetros se mantuvieron por defecto. La misma metodología se empleó para el alineamiento de ambos receptores.

Una vez realizado el alineamiento, se identificaron en las secuencias los residuos que conforman los sitios clave de unión o funcionalidad en ambos receptores, basándose en lo ya reportado en la literatura (Studer y cols., 2013).

Modelado estructural

Se utilizarán las estructuras de los receptores de *R. norvegicus* para los acoplamientos moleculares. Se utilizó el sistema de IA de AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) para la obtención de dichas estructuras.

Para utilizar estas estructuras modeladas, se verifica su fiabilidad consultando los parámetros de precisión y validez provistos por AlphaFold, siendo estos la puntuación del "pase de confianza" pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) y la puntuación de "conformación global" pTM (predicted Template Modeling score).

Después, se hizo uso de la herramienta online **PDBeFold** (<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) para generar un modelo superpuesto de las estructuras extraídas desde PDB y *AlphaFold* de *hCB2* y *rCB2*, así como de *hPPAR γ* y *rPPAR γ* , para analizar la similitud tridimensional entre las estructuras de ambas especies. Para ello, se emplearon los archivos provenientes de la base de datos PDB (ID 5ZTY para *hCB2* y ID 4EMA para *hPPAR γ*) y las que se extrajeron de *AlphaFold*. Para evaluar el alineamiento estructural se tomó en cuenta el parámetro Q-score (Ver Anexo 1) que establece una puntuación entre 0 y 1, donde un valor más cercano a uno indica una mayor similitud.

Obtención de sitios con mayor potencial farmacológico.

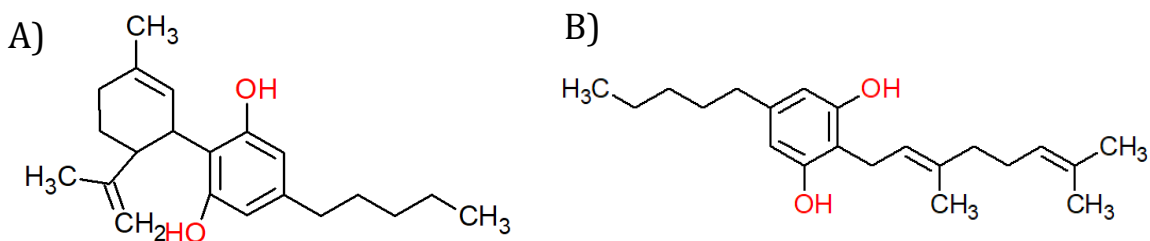
Una vez obtenidos los modelos de los receptores *rCB2* y *rPPAR γ* , se hizo uso de la herramienta *online DogSiteScore* (ubicada en la dirección web, <http://protein.plus>) para analizar las cavidades aptas para la unión de ligandos (es decir, moléculas pequeñas como fármacos) además de cuantificar características como tamaño, accesibilidad e hidrofobicidad, asignando un puntaje final a estos bolsillos.

Obtención y optimización de las estructuras de ligandos

Selección de estructuras

Se realizó la búsqueda de las estructuras de los ligandos dentro de las bases de datos del CCDC, Pubchem y PDB. Como ligandos de referencia se eligieron a la Anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), ligandos endógenos tanto del receptor CB2 como de PPAR γ (Mechoulam y Parker, 2013; Gaddipati, 2014; O'Sullivan, 2016), además de un ligando sintético para cada receptor, siendo AM10257 para rCB2, y Rosiglitazona para hPPAR γ (figura 12) (Kumar y cols., 2020, Ju y cols., 2020). Los ligandos que se obtuvieron en la base de datos PDB se separan del complejo cristalizado mediante el programa Chimera 1.17.1, <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html> (Pettersen y cols., 2018).

Posteriormente, a todos los ligandos se les realizó una optimización de geometría y cálculos de energía electrónica en el programa Gaussian 16 (<https://gaussian.com/gaussian16/>) usando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) (Frisch y cols., 2016) con BY3LYP como funcional debido a que es adecuada para la optimización de moléculas orgánicas que poseen flexibilidad en su estructura y 6-31G como conjunto de base. Se empleó el modelo de solvatación IEFPCM el cual es un método para modelar solventes en cálculos teóricos para calcular la interacción con el soluto. Dentro de este modelo, se empleó cloroformo como disolvente para la optimización de todos los ligandos.



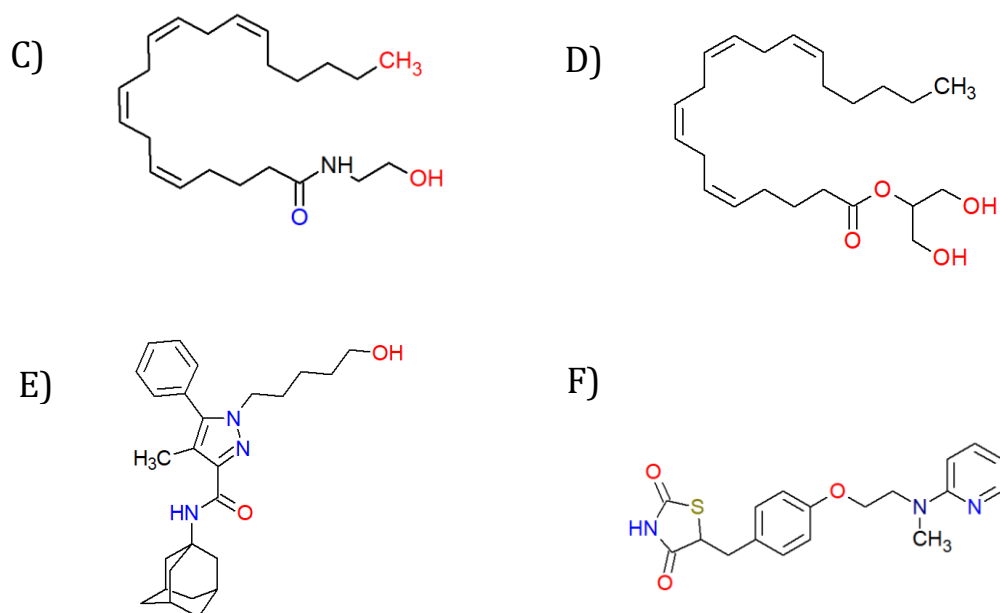


Figura 12. Estructura química de ligandos. **A)** Cannabidiol, **B)** Cannabigerol, **C)** Anandamida, **D)** 2-Araquidonilglicerol, **E)** AM10257 **F)** Rosiglitazona-.

Optimización de ligandos

La estructura optimizada de la anandamida (ligando endógeno de referencia para ambos receptores), fue proporcionada por el laboratorio de Química Teórica de la FCQ-BUAP, habiéndose empleado la Teoría del Funcional de la Densidad para caracterizar teóricamente su estabilidad (Castro y cols., 2023). 2-AG (ligando endógeno de referencia para ambos receptores) se obtuvo del archivo PDB: 6BTH, el AM10257 (ligando sintético de referencia para receptor CB2) se obtuvo del archivo PDB:5ZTY en complejo con el receptor *h*CB2 y la rosiglitazona (ligando sintético de referencia para receptor PPAR γ) se obtuvo del archivo PDB:4EMA cristalizada en complejo con la estructura del *h*PPAR γ . 2-AG, A10257 y Rosiglitazona fueron extraídos de cada complejo cristalizado mediante el programa Chimera, posteriormente se guardaron y fueron sometidos a cálculos de optimización de geometría al mismo nivel de teoría que la anandamida, esto, con el fin de que todas las estructuras de ligandos estuvieran optimizadas geoméricamente bajo los mismos parámetros para obtener las conformaciones

teóricas que tomarían bajo las mismas condiciones fisicoquímicas, esto se realizó mediante el programa Gaussian 16 (figura 20).

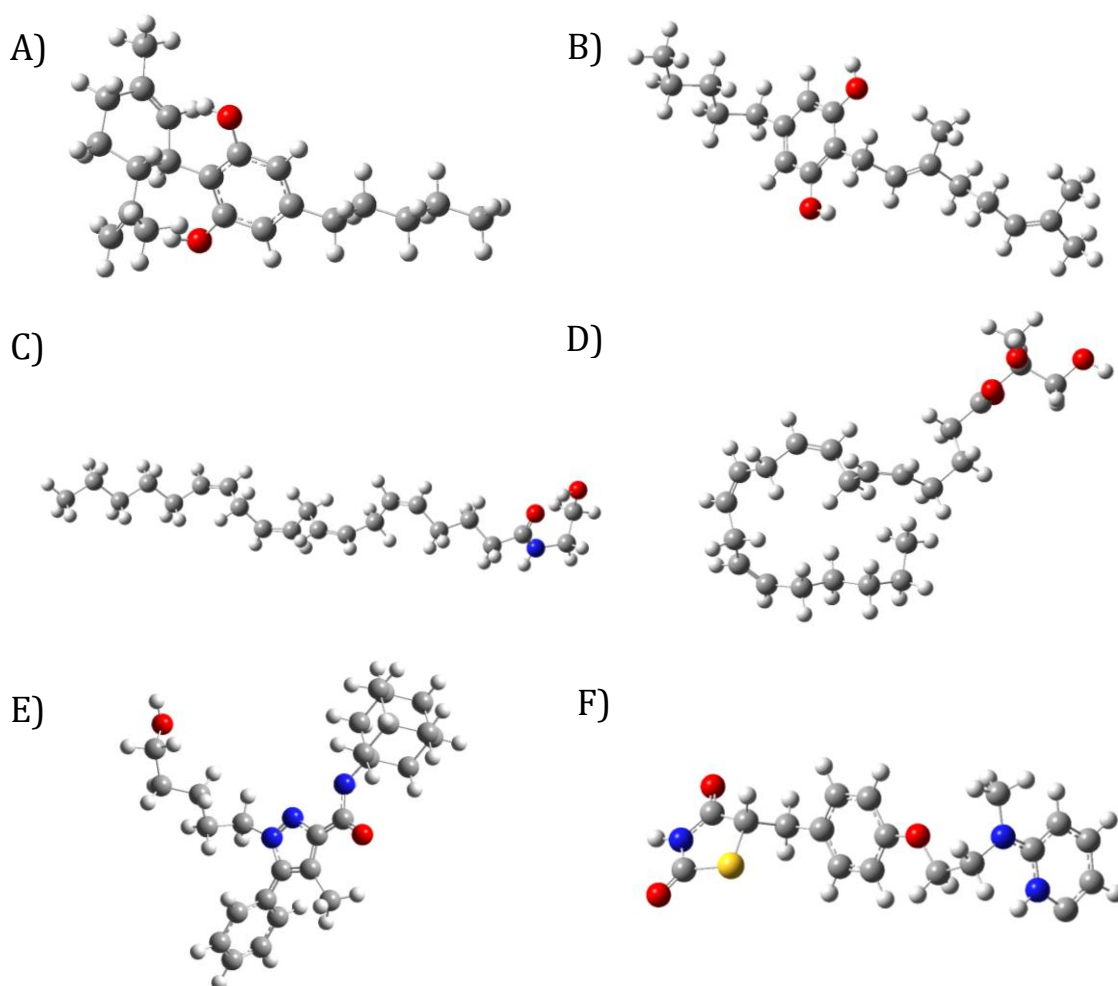


Figura 20. Estructuras optimizadas en Gaussian 16 al nivel de teoría B3LYP/6-31G de los ligandos utilizados. **A)** Cannabidiol, **B)** Cannabigerol, **C)** Anandamida, **D)** 2-Araquidonil-glicerol, **E)** AM10257, **F)** Rosiglitazona.

Acoplamiento molecular

Una vez obtenidas las estructuras de los receptores y de los ligandos optimizados, se realizaron los cálculos de acoplamiento molecular. Para ello, se usaron los programas Autodock Vina v.1.2.5 (Trott y cols., 2010, <https://vina.scripps.edu/>) y ArgusLab 4.0.1. (Thompson 2004, <http://arguslab.com>). (Ver anexo 2).

Estos programas proveen una puntuación de energía representada por la energía libre de Gibbs (ΔG) a cada acoplamiento ligando-receptor mediante la ecuación: $\Delta G^\circ = -R \ln K$.

Autodock Vina es un programa de código abierto que emplea un algoritmo genético basado en un método estocástico y es de libre acceso. Por su parte, ArgusLab también utiliza un algoritmo genético, pero se enfoca en la búsqueda rápida de conformaciones, lo que lo hace menos especializado que Autodock Vina, pero al igual que este, ArgusLab es de uso gratuito (Bitencourt-Ferreira y cols., 2019).

De manera inicial las estructuras se prepararon de manera independiente en la interfaz MGLTools.1.5.6. (Parte del módulo de Autodock Vina, <https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>) la cual permite realizar ajustes estructurales en las moléculas antes de realizar los cálculos de acoplamiento molecular. Se añadieron átomos de hidrógeno polares y cargas Kollman a las macromoléculas (receptores). Por otra parte, en cada ligando se establecieron las torsiones de los átomos, permitiendo que los enlaces de la molécula fueran rotables. Finalmente, estas estructuras se guardaron en formato .pdbqt (formato compatible con Autodock Vina), y en formato .pdb (formato aceptado por ArgusLab).

Una vez listas las estructuras se realizó un acoplamiento molecular ciego en ambos programas en el receptor *rCB2* con cada ligando, y de igual manera, con el receptor *rPPAR γ* y los ligandos correspondientes. Esto con el objetivo de ubicar el sitio de unión más favorable para cada ligando en la totalidad del volumen de cada receptor, y posteriormente, hacer un acoplamiento dirigido a tales sitios.

Autodock Vina

En Autodock Vina se limitó la región tridimensional donde se realizó la búsqueda conformacional del ligando mediante la herramienta *gridbox*. Para el acoplamiento molecular ciego se configuró el *gridbox* a un tamaño de 90x90x90 Å de tal manera que abarcara la mayor parte del espacio (en las coordenadas x, y, z) de cada receptor. Después de obtener las poses de este acoplamiento, se ubicaron

los sitios en los que cada ligando presentó mayor afinidad y probabilidad de unión para posteriormente delimitar el área del *gridbox* a tales sitios.

En el acoplamiento dirigido en el receptor *rCB2*, los cálculos de búsqueda conformacional ubicaron el *gridbox* en las coordenadas 12.374, -6.364, -12.0 Å para los ejes x, y, z, respectivamente, con un tamaño de 40x40x40 Å contemplando a los residuos Phe94, Val113, Phe117, Phe183, Trp254 y Ser285. (Yuan y cols., 2022).

En el receptor PPAR γ la búsqueda en el sitio ortostérico se realizó con el *gridbox* en las coordenadas -15.575 Å, -6.797 Å y 3.976 Å para los ejes x, y, z, respectivamente, contemplando los residuos Cys313, Leu358, His477, Met376 y Tyr501. En el sitio alostérico denominado como "A" se establecieron las coordenadas -15.575, -6.797 y 3.976 Å, para los ejes x, y, z, respectivamente, contemplando los residuos Phe309, Cys313, Ala320 Leu358, Met392 (Bruning y cols., 2007; D'Aniello, y cols., 2019).

ArgusLab

En este programa, se ingresaron las estructuras de los receptores previamente preparadas en MGLTools 1.5.7. en formato .pdb, al igual que las estructuras de cada ligando. Se realizó un acoplamiento de tipo ciego en la totalidad del espacio ocupado por la macromolécula. Por otra parte, el ligando se estableció como flexible en su totalidad para su adaptación durante el proceso de acoplamiento.

Una vez obtenidos los complejos resultantes del acoplamiento molecular ciego, se ubicaron los sitios con las poses más favorables de cada ligando y posteriormente se dirigió el acoplamiento hacia estos sitios, seleccionando únicamente los residuos que establecen interacciones en dichas poses, de esta manera ArgusLab calcula automáticamente las coordenadas del *gridbox* en las zonas específicas de los residuos seleccionados.

Visualización y análisis de resultados

Para analizar cada complejo ligando-receptor obtenido, se usó el programa Discovery Studio Visualizer 2021 - <https://www.3ds.com/products-services/biovia/> (Dassault Systèmes BIOVIA, 2021), y se utilizaron las herramientas de visualización 2D y 3D para ubicar los residuos clave que establecen interacciones moleculares en cada complejo obtenido.

7. Resultados experimentales

La co-administración del cannabidiol y el cannabigerol disminuyó la intensidad de las crisis convulsivas en ratas administradas con pentilentetrazol.

Los grupos VEH+VEH, CBG+VEH y CBD+CBG+VEH no presentaron crisis convulsivas durante la evaluación. El grupo VEH+PTZ mostró crisis convulsivas significativas en comparación con los grupos controles. El grupo CBG+PTZ no presenta cambios en la intensidad de las crisis con respecto al grupo VEH+PTZ. Sin embargo, el grupo CBD+CBG+PTZ muestra una disminución significativa de la intensidad de las crisis convulsivas respecto al grupo VEH+PTZ (figura 13; Interacción: $F(15, 148) = 1.443$, $P=0.1344$; Ensayos: $F(3, 148) = 5.399$, $P=0.0015$; Tratamiento: $F(5, 148) = 123.5$, $P<0.0001$).

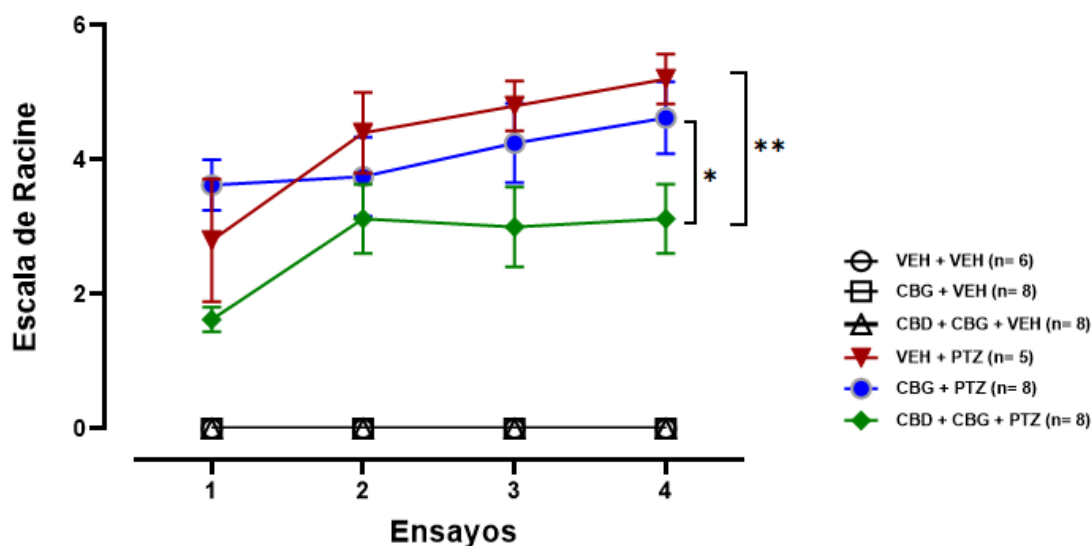


Figura 13. Intensidad de las crisis convulsivas según la escala de Racine. Los grupos administrados que no fueron tratados con PTZ (VEH+VEH, CBG+VEH y CBD+CBG+VEH) no manifestaron crisis convulsiva y están representados por la línea horizontal a nivel de la escala cero-0 de manera sobrepuesta. Por otra parte, los grupos administrados con PTZ presentaron un aumento gradual de la intensidad de las crisis al transcurrir cada ensayo. Los datos se analizaron con una ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

La coadministración de cannabidiol y cannabigerol disminuyó la frecuencia de las crisis tónico-clónicas.

Durante los 4 ensayos realizados, se registró la frecuencia total de cada tipo de crisis convulsiva, clasificada según la escala de Racine, en los 6 grupos experimentales.

En la categoría de crisis mioclónicas, el grupo CBG+PTZ presentó un incremento significativo en el número de crisis respecto al grupo VEH+PTZ, mientras que el grupo CBD+CBG+PTZ no hubo cambios respecto a el grupo VEH+PTZ (figura 14-A; Interacción: $F(15, 147) = 3.004, P=0.0003$; Ensayos: $F(3, 147) = 9.295, P<0.0001$; Tratamiento: $F(5, 147) = 22.11, P<0.0001$). En cambio, en la categoría de clonus de extremidades y posición de canguro o *rearing* no se observaron diferencias significativas entre los grupos (figura 14-B; Interacción: $F(15, 156) = 0.7785, P=0.6998$; Ensayos: $F(3, 156) = 0.9289, P<0.4283$; Tratamiento: $F(5, 156) = 1.285, P<0.2732$; figura 14-C; Interacción: $F(15, 140) = 1.105, P=0.3571$; Ensayos: $F(3, 140) = 0.4568, P<0.7129$; Tratamiento: $F(5, 140) = 2.486, P<0.0343$). Por otro lado, en las crisis de tipo tónico-clónico (figura 14-D), el grupo CBD+CBG+PTZ mostró una disminución significativa en la frecuencia de los eventos respecto a los grupos VEH+PTZ y CBG+PTZ ($*p < 0.05$) (figura 14-D; Interacción: $F(15, 148) = 1.145, P=0.3217$; Ensayos: $F(3, 148) = 4.026, P=0.0087$; Tratamiento: $F(5, 148) = 23.29, P<0.0001$).

Frecuencia de los diferentes estadios de crisis convulsivas respecto a la escala de Racine

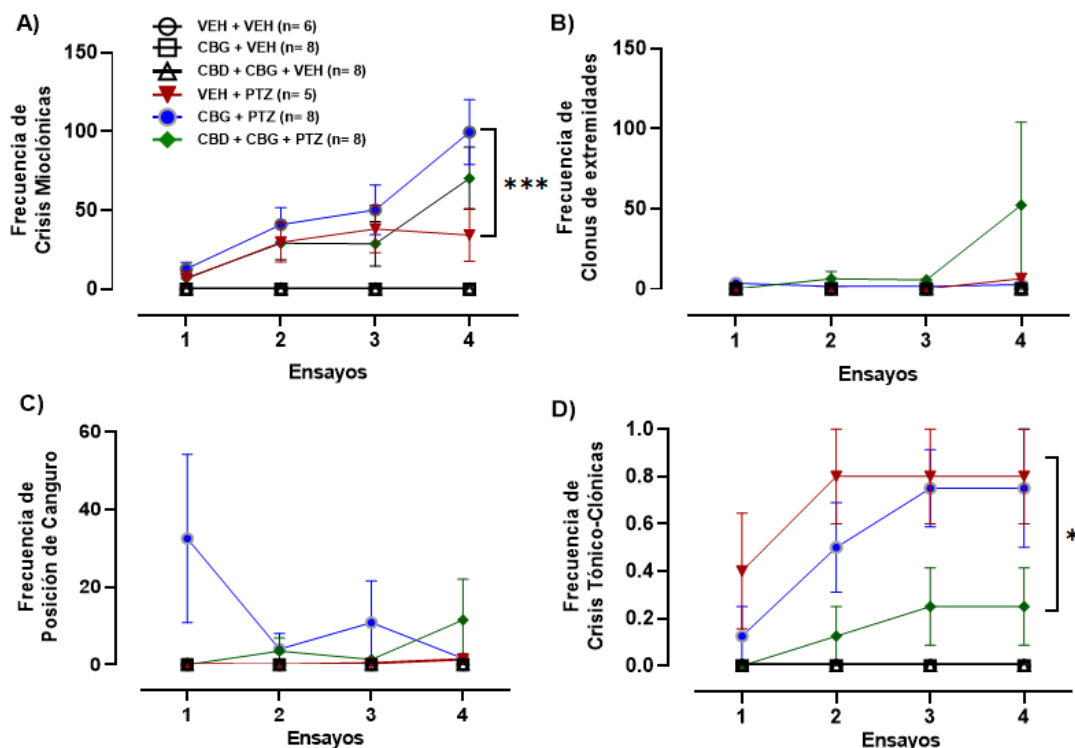


Figura 14. Frecuencia de las crisis convulsivas según la escala de Racine. Se muestra la frecuencia de crisis convulsivas durante los 4 ensayos de evaluación. **A)** las crisis mioclónicas, **B)** clonus de extremidades, **C)** posición de canguro y **D)** crisis tónico-clónicas. Se realizó una ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni. Los datos se expresan como la media \pm SEM, * $p < 0.05$ VEH+PTZ vs CBD+CBG+PTZ, *** $p < 0.001$ CBG+PTZ vs. VEH+PTZ.

La coadministración de cannabidiol y cannabigerol no modificó la latencia a la primera crisis mioclónica, pero sí redujo la duración de las crisis tónico-clónicas.

Se registró el tiempo (latencia) transcurrido en segundos, hasta la aparición de la primera crisis mioclónica de cada animal después de la administración de PTZ a lo largo de los 4 ensayos, y se compararon los 3 grupos con tratamiento de PTZ: VEH + PTZ, CBG + PTZ y CBD + CBG + PTZ. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la latencia entre los grupos evaluados (figura 15-

A; Interacción : $F(6, 72) = 1.523$, $P=0.1831$; Ensayos: $F(3, 72) = 1.140$, $P=0.3390$; Tratamiento: $F(2, 72) = 1.173$, $P=0.3152$). Por otro lado, al cuantificar la duración total de las crisis tónico-clónicas, el grupo CBD+CBG+PTZ mostró una duración significativamente menor en comparación con los grupos VEH+PTZ y CBG+PTZ (figura 15-B; Interacción: $F(6, 60) = 1.8029$, $P=0.5016$; Ensayos: $F(3, 60) = 6.945$, $P=0.0004$; Tratamiento: $F(2, 60) = 5.137$, $P=0.0087$).

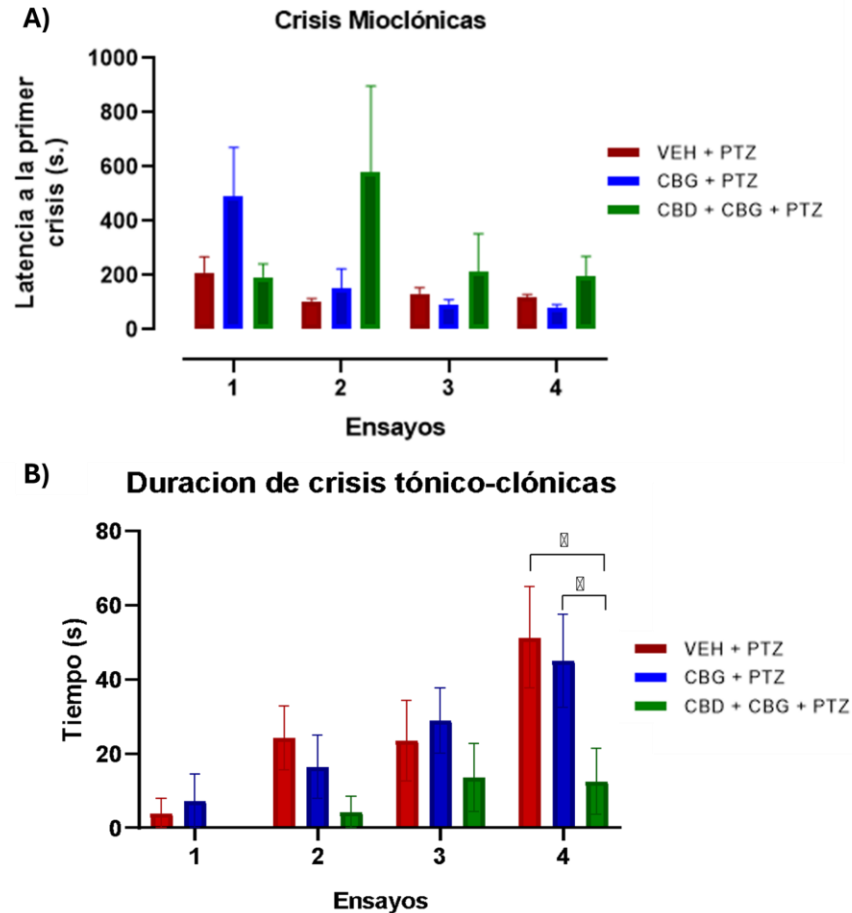


Figura 15. A) Latencia a la primera crisis mioclónica por cada ensayo. Se excluyen los datos de los grupos que no fueron administrados con PTZ. Se realizó una prueba ANOVA de dos vías. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los periodos de latencia a la primera crisis mioclónica. Los datos se expresan como la media \pm SEM. **B)** Duración de crisis convulsivas tónico-clónicas, se excluyen los datos de los grupos que no fueron administrados con PTZ. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni. Los datos se expresan como la media \pm SEM, * $p<0.05$ CBD+CBG+PTZ vs VEH+PTZ y vs. CBG+PTZ.

8. Resultados teóricos

Predicción estructural de receptores

Se identificaron los residuos que conforman el sitio de unión entre las secuencias de CB2 y PPAR γ de *H. sapiens* y *R. norvegicus*. Se identifican aquellos que coinciden en color rojo, y los que difieren, encerrados en una casilla azul (figura 16 y 17).

Con el alineamiento se determinó un 82% de identidad total entre las secuencias. El *rCB2* difiere respecto a *hCB2* en la Ser90 que cambia por Asn90 (ambos residuos son de naturaleza polar sin carga, lo que no afectaría considerablemente las características fisicoquímicas del bolsillo); y la Asn93 por una Ile93 los cuales difieren en su naturaleza, siendo el primero un aminoácido polar sin carga y el segundo un aminoácido alifático apolar, por lo que esta diferencia podría influir en el potencial farmacológico del bolsillo ortostérico (figura 16).

Human	1	MEECWTEIANGSKDGLDSNPMKDYMI LSGPQKTAVAVLCTLLGLLSALENVAVLYLILS	60
		M C E+ NGS GL+ NPMK+YMILS Q+ AVAVLCTL+GLLSALENVAVLYLILS	
Rat	1	MAGCRELELTNGSNGGLEFNPMKEYMI L SDAQQI AVAVLCTLMGLLSALENVAVLYLILS	60
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TMH1 TMH2 </div>	
Human	61	SHQLRRKPSYLFIGSLAGADFLASVVEACSEVNFHVFHGVDSKAVELLLKIGSVIMTFTAS	120
		S++LRRKPSYLFIGSLAGADFLASV+FACFV FHFHGVDS+ +FLLKIGSVIMTFTAS	
Rat	61	SQRLRRKPSYLFIGSLAGADFLASVIFACNEVIFHFHGVDSRNIFLLKIGSVIMTFTAS	120
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TMH3 TMH4 </div>	
Human	121	VGSLLLTAIDRYLCLRYPPSYKALLTRGRALVTLGIMWVLSALVSYLPLMGWTCPCRPCS	180
		VGSLLLTA+DRYLCL YPP+YKAL TRGRALV LG+MWVLSAL+SYLPLMGWTCPC PCS	
Rat	121	VGSLLLTAVDRYLCLCYPPTYKALVTRGRALVALGVMWVLSALISYLPLMGWTCPCSPCS	180
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TMH5 </div>	
Human	181	ELFPLIPNDYLLSWLLFIAFLFSGIITYGHVWKAHQHVASLSGHQDRQVPGMARMRLD	240
		ELFPLIPNDYLL WLLFIA LFSGIITYYG+VLWKAHQHVASL+ HQDRQVPG+ARMRLD	
Rat	181	ELFPLIPNDYLLGWLLFIAILFSGIITYGYVWKAHQHVASLAEHQDRQVPGIARMRLD	240
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TMH6 TMH7 </div>	
Human	241	VRLAKTLGLVLAVLLICWFFV LALMAHSLATTLSDQVKKEAFCSMLCLINSMVNPVIYA	300
		VRLAKTLGLV+AVLLICWFF LALM HSL TTLSD+VK AFAFCSMLCL+NSM+NP+IYA	
Rat	241	VRLAKTLGLVMAVLLICWFFA LALMGHSLVTTLSDKVKEAFCSMLCLVNSMINPIIYA	300
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> TMH6 TMH7 </div>	
Human	301	LRSGEIRSSAHHCLAHWKKCVRLGSEAKEEAPRSSVTETEADGKITPWPDSRDLSDC	360
		LRSGEIRS+A+HCL WKK +GLGSE KEEAP+SSVTETEA+ K T P SR S+C	
Rat	301	LRSGEIRSAHQCLTGWKYQLGLGSEGKEEAPKSSVTETEAEVKTTTGPGRTPGCSNC	360

Figura 16. Alineamiento de secuencia de aminoácidos del receptor CB2 en donde <Human> corresponde a la secuencia del receptor CB2 de *Homo sapiens* (*h*) y <Rat> a la secuencia del receptor CB2 *Rattus norvegicus* (*r*). Los residuos correspondientes a cada hélice transmembranal se señalan en corchetes de color negro. Los residuos del bolsillo ortostérico que establecen unión con el ligando se subrayan en color rojo y los residuos que difieren entre secuencias se marcan con un recuadro de color azul.

El alineamiento de secuencias presentó un 96% de identidad total entre *rPPAR γ* y *hPPAR γ* . Los principales residuos del sitio ortostérico de PPAR γ se subrayan en color rojo, los cuales están localizados principalmente entre las hélices H4, H5, H6, H12 y la lámina- β de la cadena A del receptor, se encierran en una casilla de color azul los que difieren entre las especies (figura 17), el cual, es un cambio en la Ser330 de *hPPAR γ* por Asn330 en *rPPAR γ* . No obstante, estos aminoácidos son de la misma naturaleza (polar sin carga) por lo que se considera que esta diferencia no afecta significativamente a las características fisicoquímicas del bolsillo de unión.

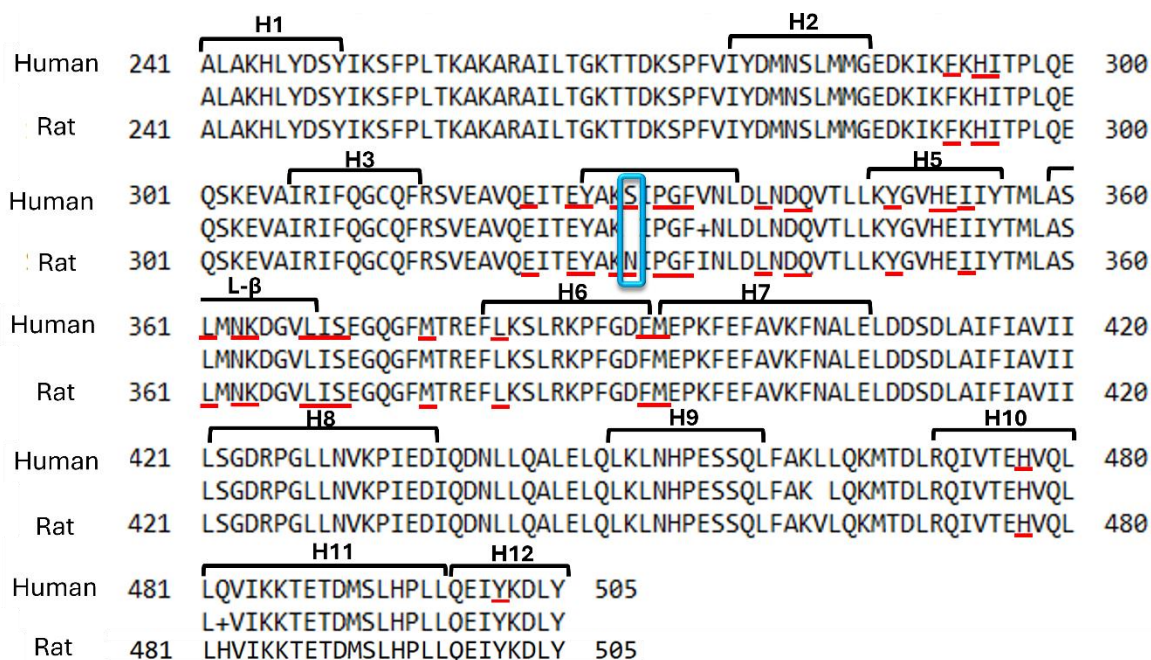


Figura 17. Alineamiento de secuencias de aminoácidos del receptor PPAR γ en donde <Human> corresponde a la secuencia del receptor PPAR γ de *Homo sapiens* (*h*) y <Rat> a la secuencia del receptor PPAR γ de *Rattus norvegicus* (*r*). Los residuos correspondientes a cada hélice y la lámina beta se señalan en corchetes de color negro. Los residuos necesarios para establecer unión con el ligando se subrayan en color rojo y los residuos que difieren entre secuencias se señalan con un recuadro de color azul.

Modelos estructurales

Las estructuras proteicas de la especie *R. norvegicus* para el acoplamiento molecular, fueron obtenidas de AlphaFold, las cuales se habían predicho con anterioridad y se encuentran disponibles en la biblioteca online de AlphaFold. El

valor de pLDDT del receptor *rCB2* con ID:AF-Q9QZN9-F1-v4 fue de 84.13, y de 76.37 para el receptor *rPPAR γ* con ID: AF-O88275-F1-v4.

Posteriormente estas estructuras de cada especie se alinearon de manera tridimensional en PDBeFold (figura 18) y se obtuvo un Q-score de 0.39 entre *hCB2* y *rCB2*, mientras que entre *hPPAR γ* y *rPPAR γ* fue de 0.48. Por lo que, la estructura del receptor *rPPAR γ* tiene mayor similitud respecto al *hPPAR γ* , que *rCB2* respecto al receptor *hCB2*.

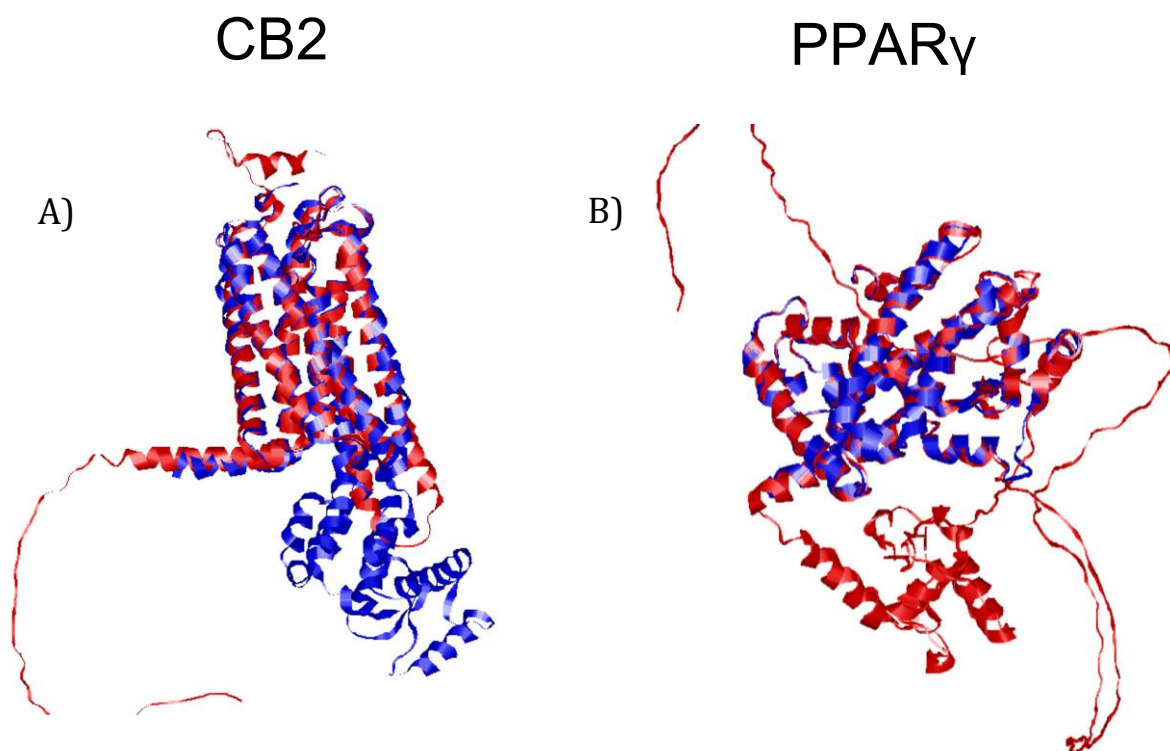


Figura 18. Alineamiento estructural en PDBeFold. A) Dominio transmembranal del receptor *hCB2* (azul) en superposición con el dominio transmembranal del *rCB2* (rojo). B) Cadena A del receptor nuclear *hPPAR γ* (azul) en superposición con la cadena A de *rPPAR γ* (rojo).

En la siguiente figura se muestran los sitios con mayor potencial farmacológico en ambos receptores, así como los bolsillos ortostéricos y alostéricos obtenidos por medio de la herramienta *online DogSiteScore* en la plataforma web de Proteins+ (figura 19A y 19B).

En cuanto al CBG, el acoplamiento molecular ciego lo posicionó en diferentes sitios del receptor, siendo el bolsillo ortostérico el lugar donde se dieron las interacciones más favorables y de mayor puntuación, por lo que el acoplamiento dirigido fue hecho hacia este sitio. En Autodock Vina, el complejo presentó una energía de afinidad de -9.3 kcal/mol estableciendo interacciones de tipo puente de hidrógeno con Ser285, π - π T-shaped con Phe94, van der Waals y π -alquilo con Val113 y Phe117 (figura 21-B). Por otro lado, en ArgusLab se obtuvo una energía -15.54 kcal/mol en el sitio ortostérico, estableciendo interacciones π - π T-shaped, van der Waals.

Para la anandamida, el acoplamiento molecular ciego en el receptor CB2 la situó en el bolsillo ortostérico. Posteriormente, al realizar el acoplamiento dirigido a este sitio en Autodock Vina, la conformación con mejor energía de puntuación obtuvo un valor de -8.7 kcal/mol, estableciendo interacciones de tipo puente de hidrógeno con Asn90, van der Waals con Phe94, Thr114 y Ser285 y π -Alquilo con Val113 (figura 21-C).

Para el 2-AG con el receptor *r*CB2, el acoplamiento molecular ciego situó al ligando en el sitio ortostérico de *r*CB2. En Autodock Vina, la conformación con mejor energía de afinidad obtuvo una energía de afinidad de -7.3 kcal/mol en el sitio ortostérico del receptor, estableciendo interacciones de tipo puente de hidrógeno con Thr114, van der Waals con Phe117 y Ser285 y π -alquilo con Val113 (figura 21-D).

El cannabinoide sintético AM102257 se situó en el bolsillo ortostérico durante el acoplamiento molecular ciego. Posteriormente al realizar el acoplamiento dirigido en Autodock Vina se obtuvo una energía de afinidad de -8.5 kcal/mol estableciendo interacciones de tipo puente de hidrógeno con Thr114, π -Sigma con Val113, π - π T-shaped con Trp194 y Phe117 y van der Waals con Ser285 y Asn90 (Figura 21-E).

Posteriormente, se muestran los complejos tridimensionales de cada ligando con el receptor *r*CB2 con mejores energías de afinidad (figura 22).

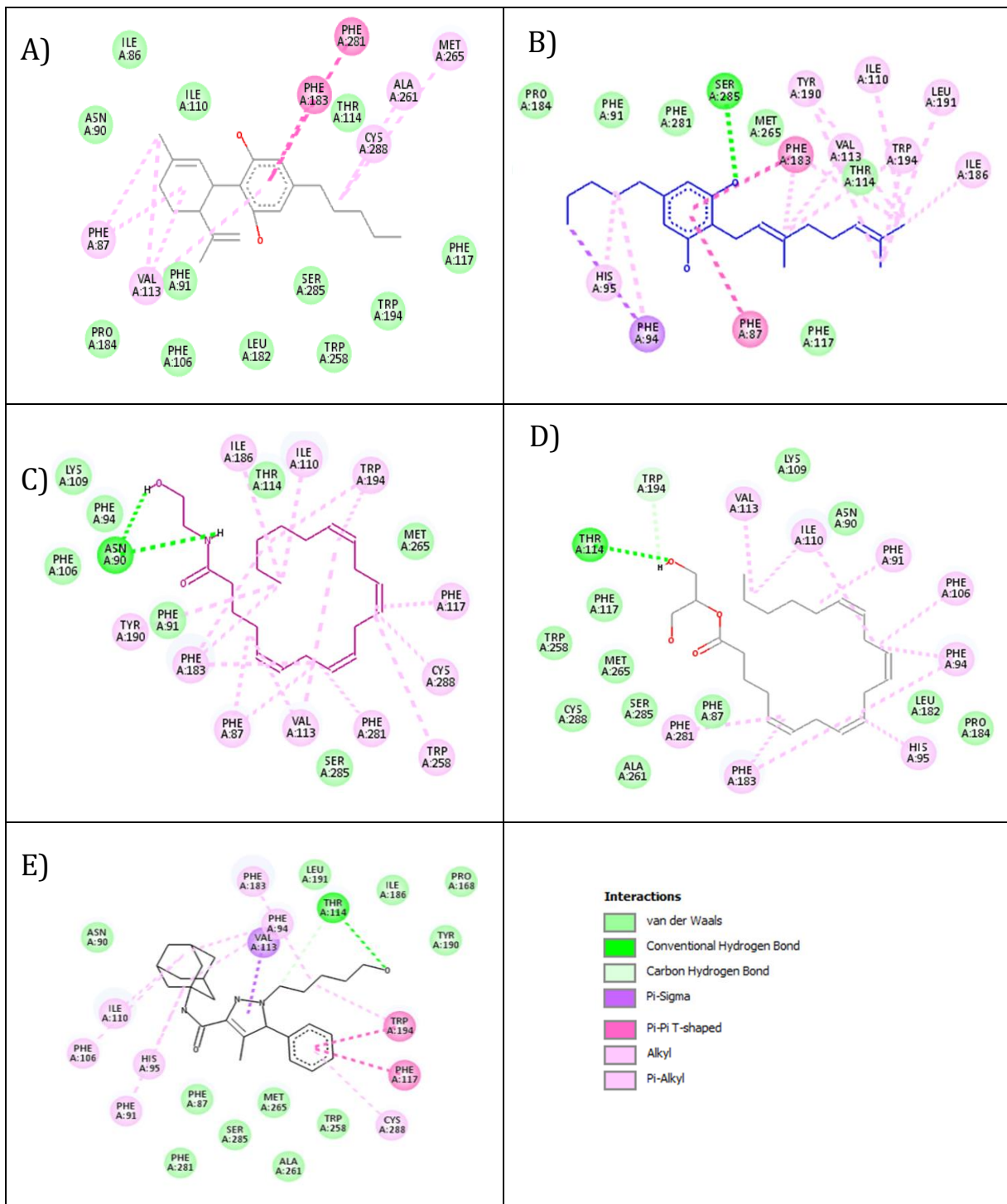


Figura 21. Diagrama 2D de las interacciones de los ligandos en el sitio ortostérico de *rCB2* con los cannabinoides **A)** CBD y **B)** CBG además de los ligandos naturales y sintéticos. **C)** AEA, **D)** 2-AG y **E)** AM10257, en donde se observa que en todos los casos hay interacción coincidentemente con los aminoácidos Val113, Phe94 y Phe117, los cuales son necesarios para la activación del receptor.

Complejos tridimensionales con menor energía de afinidad entre el receptor *rCB2* y cada ligando

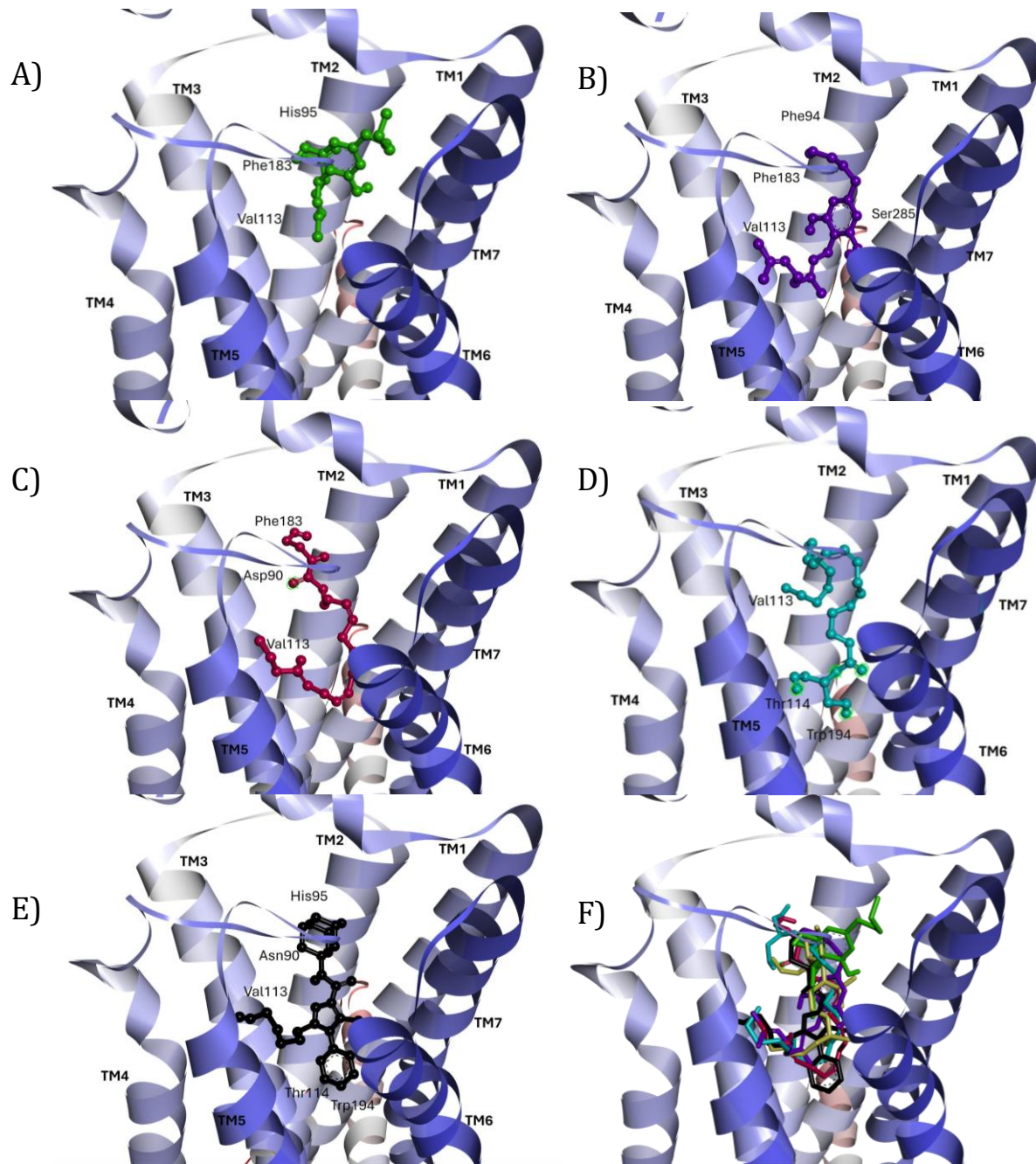


Figura 22. Visualización 3D del receptor *rCB2* en complejo con las poses de menor energía de cada ligando **A)** Cannabidiol (verde), **B)** Cannabigerol (azul rey), **C)** Anandamida (Rosa), **D)** 2-Araquidonoil glicerol (Azul celeste), **E)** Rosiglitazona (violeta). **F)** Superposición de las mejores poses de todos los ligandos en el bolsillo de unión ortostérico de *rCB2*.

Receptor rPPAR γ

En Autodock Vina, el acoplamiento molecular de tipo ciego situó al Cannabidiol (CBD) en diferentes sitios alostéricos de rPPAR γ , pero no en el sitio ortostérico. Las poses que presentaron interacciones más favorables y de mejor energía fueron en el sitio alostérico "A". Posteriormente, al dirigir los cálculos de acoplamiento molecular a esta región, la mejor pose se obtuvo con una energía de afinidad de -7.8 kcal/mol. Por su parte, el acoplamiento realizado en ArgusLab exhibió interacciones favorables y poses con energías de afinidad desde -12.9 kcal/mol. Las conformaciones resultantes en ambos programas sitúan al CBD en el mismo bolsillo de unión alostérico y coinciden en las interacciones tipo π -azufre con Cys313, π -alquil con Ile309, Ile354, Leu358 y fuerzas de van der Waals con Met392 (figura 23-A), siendo estos residuos necesarios para la unión y estabilización del complejo formado.

El acoplamiento molecular ciego en ambos programas situó al Cannabigerol (CBG) en diferentes sitios del receptor rPPAR γ . Autodock Vina situó al CBG en diferentes sitios alostéricos, principalmente en el sitio alostérico "A", mientras que ArgusLab lo posicionó en el sitio ortostérico. Posteriormente, se realizaron en Autodock Vina acoplamientos dirigidos en ambos sitios del receptor obteniéndose la misma energía de afinidad en los sitios ortostérico y alostérico "A", siendo esta de -7.9 kcal/mol, sin embargo, se obtuvieron interacciones más fuertes en el sitio ortostérico "A" con residuos de la lámina beta como Cys313, Arg316 y Ser317, necesarios para la estabilización este sitio (figura 23-B). Por otra parte, en ArgusLab se obtuvo un valor de energía de afinidad de -13.37 kcal/mol en el acoplamiento molecular de tipo ciego, situando al CBG en el sitio ortostérico, y estableciéndose interacciones con Tyr501 ubicado en la H12 del receptor exhibiendo interacciones tipo π -sigma y van der Waals con Cys313, y Ser317 e Ile354, residuos necesarios para la estabilización del bolsillo ortostérico e inducir la reclutación de coactivadores para iniciar el proceso de transcripción de genes diana.

Por otra parte, los endocannabinoides AEA y 2-AG mostraron preferencia por el sitio alostérico "A". Los acoplamientos dirigidos a este sitio mostraron interacciones y afinidades similares para ambos ligandos endógenos. AEA obtuvo una energía de afinidad de -6.4 kcal/mol y mientras que 2-AG de -6.2 kcal/mol y coincidiendo en interacciones de tipo puente de hidrógeno con Cys313 (figura 23-C). Por su parte, 2-AG exhibe otro puente de hidrógeno más con otro residuo importante para la unión de ligandos a PPAR γ (Ile 309) situado en la lámina beta, lo que le podría conferir mayor estabilidad que la AEA en este sitio (figura 23-D).

Finalmente, el compuesto sintético Rosiglitazona, agonista de PPAR γ , exhibe una mayor fuerza de unión respecto a los ligandos CBD y CBG, con una energía de -8.1 kcal/mol en Autodock Vina en el sitio ortostérico de *r*PPAR γ . Este complejo ligando-receptor se forma mediante puentes de hidrógeno con Arg316, Ser317 y Glu323, Tyr501 (figura 23-E).

Posteriormente, se muestran los complejos tridimensionales con mejor energía de afinidad entre el receptor *r*PPAR γ y cada ligando (figura 24).

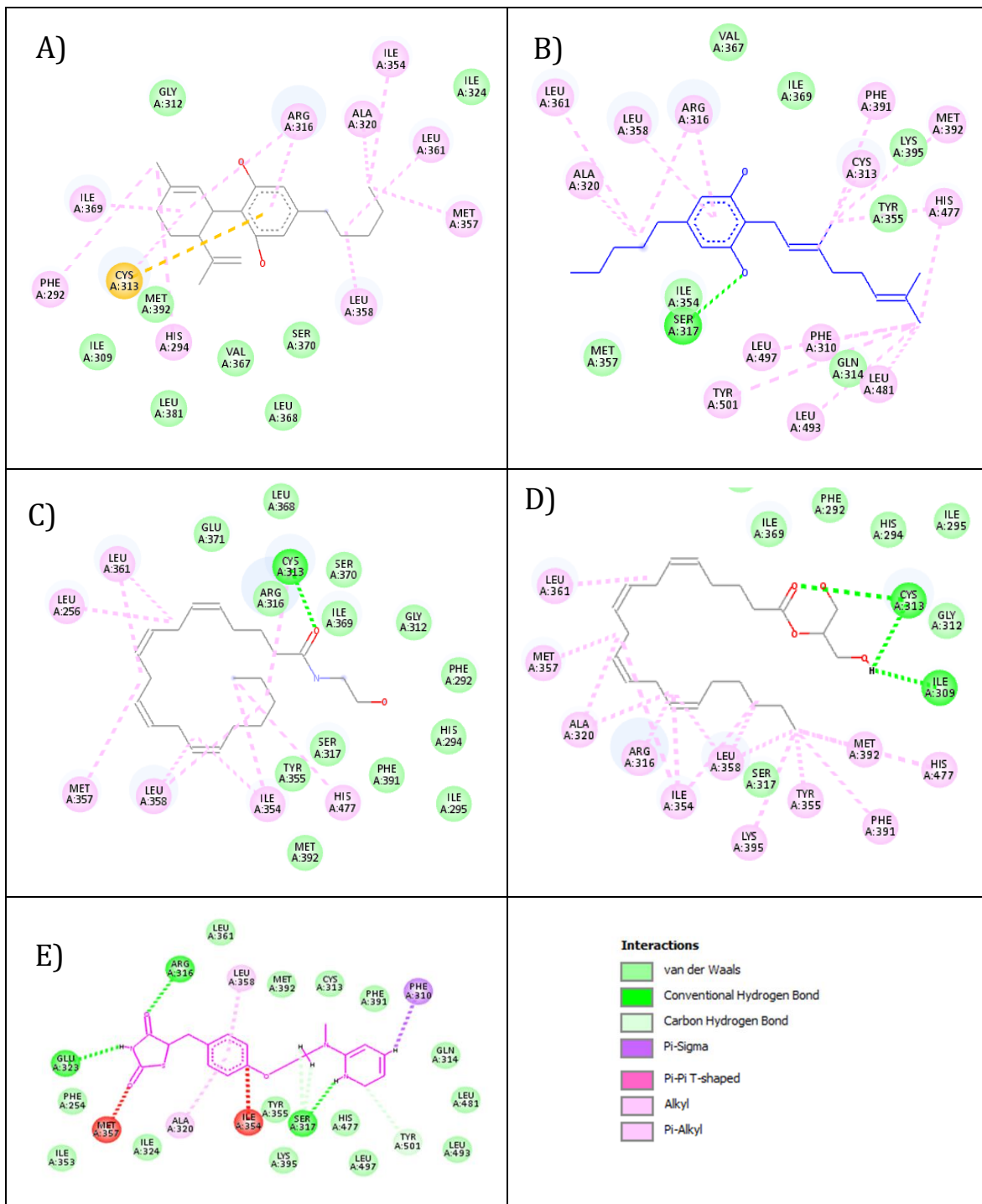


Figura 23. Diagramas 2D de las interacciones de los ligandos en *rPPAR γ* . **A)** CBD en el sitio alostérico "A", **B)** CBG en el sitio ortostérico, **C)** AEA en el sitio alostérico "A", **D)** 2-AG en el sitio alostérico "A", **E)** Rosiglitazona en el sitio ortostérico. Para la activación del sitio ortostérico es esencial la interacción con Phe 310, His 477 y Tyr501, para la unión al sitio alostérico "A" se necesita establecer interacciones con Ile309, Cys313 y Ser317.

Complejos tridimensionales con mejor energía de afinidad entre el receptor *rPPAR γ* y cada ligando.

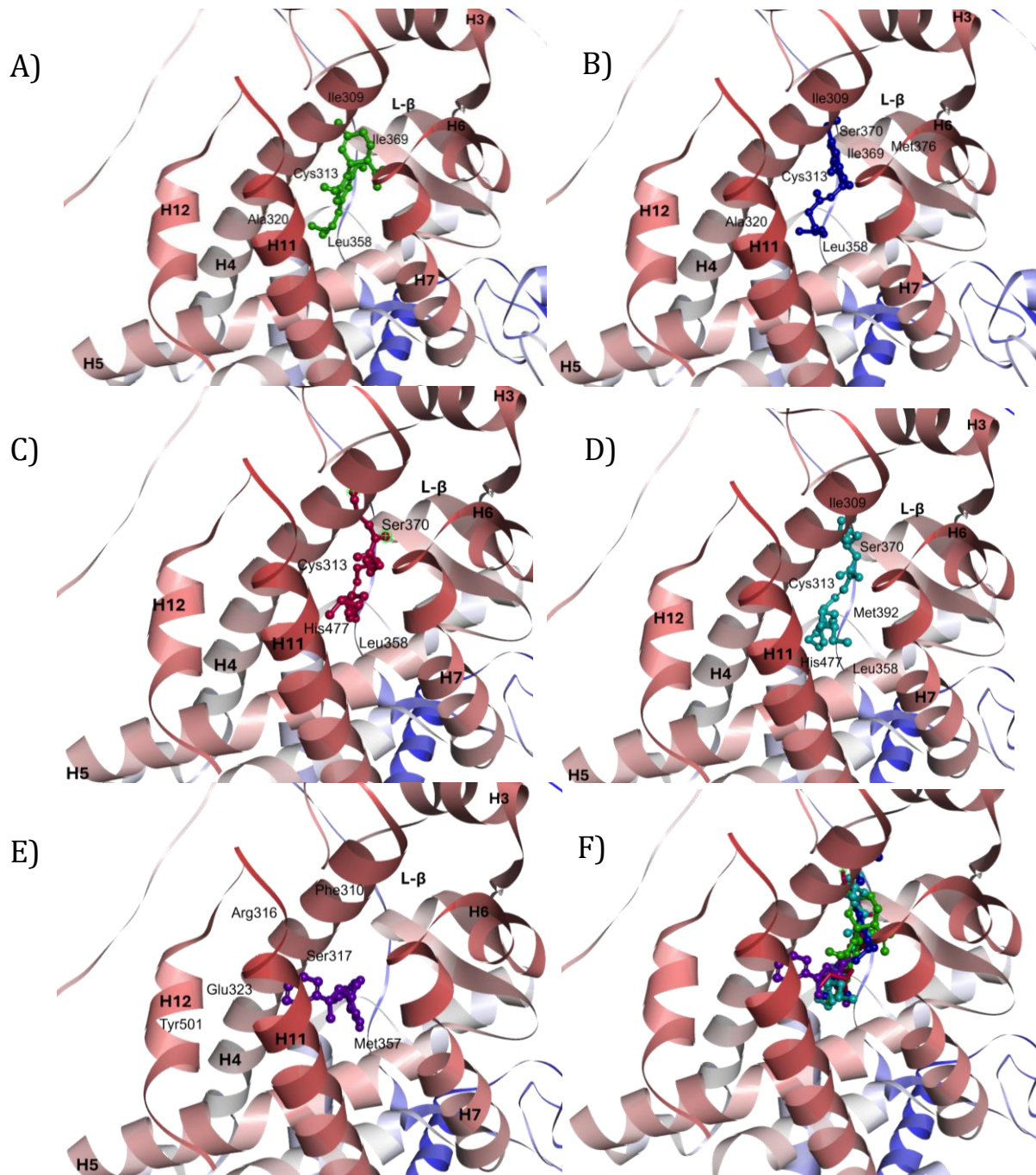


Figura 24. Visualización 3D del receptor *rPPAR γ* en complejo con las poses de menor energía de cada ligando **A)** Cannabidiol (verde), **B)** Cannabigerol (azul rey), **C)** Anandamida (Rosa), **D)** 2-Araquidonoil glicerol (Azul celeste), **E)** Rosiglitazona (violeta). **F)** Superposición de las mejores poses de todos los ligandos en el bolsillo de unión ortostérico de *rPPAR γ* .

A continuación, se presentan en lista los resultados obtenidos mediante los acoplamientos moleculares realizados en Autodock Vina, incluyendo los valores de energía de enlace, los tipos de interacciones resultantes y los residuos que establecen estas interacciones (Tabla 2).

Tabla 2. Energías de afinidad e Interacciones intermoleculares de los complejos obtenidos mediante acoplamiento molecular en los receptores *rCB2* y *rPPAR γ* con los diferentes ligandos.

Receptor	Ligando	Energía de enlace (kcal/mol)	Tipo de interacción	Residuos de interacción.		
<i>rCB2</i>	CBD	-6.2	van der Waals	Thr114, Phe117, Trp194, Trp258.		
			π - π	Phe183, Phe 281		
			π -alquilo	Phe87, Val113		
	CBG	-9.3	Puente de hidrógeno	Ser285		
			van der Waals	Asn90, Phe91, Thr114, Phe117, Met265, Phe281, Ala282		
			π - π T-shaped	Phe87, Phe183		
			π -alquilo	Phe94, His95, Ile110, Val113.		
	AEA	-8.7	Puente de hidrógeno	Asn90		
			Vvn der Waals	Phe94, Thr114, Ser285		
			π -alquilo	Val113, Phe117, Phe183, Trp258, Phe281		
			2AG	-7.3	Puente de hidrógeno	Thr114
					van der Waals	Asn90, Phe117, Pro184, Trp258, Ala261, Met265, Ser285.
	AM10257	-8.5	Alquilo/ π -alquilo	Phe94, His95, Val113, Phe183, Phe281		
			Puente de hidrógeno	Thr114		

			van der Waals	Asn90, Trp258, Ala261, Met265, Phe281, Ser285
			π - π / π -sigma	Phe117, Trp194, Val113
			π -alquilo	Phe94, His95, Phe183, Cys288
rPPAR γ	CBD	-7.8	Puente de hidrógeno/ π -sulfuro	Cys313
			van der Waals	Ile309, Val367, Ser370, Met392
			π -alquilo	Ile354, Leu358
	CBG	-7.9	Puente de hidrógeno	Cys313, Ser370
			π -sigma	Ile369
			van der Waals	Gly312, Ala320, Ile354, Met376
			π -alquilo	Ile309, Met357, Leu358, Leu361
	AEA	-6.4	Puente de hidrógeno	Cys313, Ile309
			van der Waals	Met392, Ile369, Ser370
			π -alquilo	Leu358, Ile354
	2AG	-6.2	Puente de hidrógeno	Cys313, Ile309
			van der Waals	Ile369, Ser370,
			alquilo	Met376
	Rosiglita- zona	-8.1	Puente de hidrógeno	Arg316 Ser317
			Enlace carbono- hidrógeno	Cys313
			van der Waals	His351, Met357, Leu361
		Alquilo	Phe310, Leu358, Phe391	

9. Discusión

La neuroinflamación se encuentra asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la epilepsia, en la que puede intensificar y aumentar la frecuencia de las crisis convulsivas, por lo que es un proceso al cual se puede dirigir la terapéutica (Vezzani, 2014; Meng y Yao 2020). En el presente modelo inducido por PTZ, fue observado que el grupo VEH+PTZ presenta mayor intensidad y frecuencia de las crisis convulsivas a lo largo de los ensayos en comparación con los demás grupos experimentales. Esto se explica por la potente inhibición que ejerce el PTZ sobre los receptores GABA_A, lo que impide la entrada de Cl⁻ a las neuronas para su repolarización, iniciando el foco epileptógeno, sin embargo, la repetición de administraciones provoca una serie de eventos que conllevan al aumento de la concentración de sustancias proinflamatorias y conllevan a la activación microglial y a la neuroinflamación observada en la epilepsia (Dhir, 2012; Hoeller y cols., 2017).

Diversos estudios han evaluado el uso del CBD de manera individual en modelos convulsivos y han reportado que este compuesto puede reducir la intensidad y la frecuencia de las crisis convulsivas en distintos modelos experimentales de epilepsia incluido el modelo inducido por PTZ, así como en pacientes clínicos (Klein y cols., 2017; Lattanzzy y cols., 2018; Patra y cols., 2019). Sin embargo, la reducción no es completa y la administración de CBD puede generar efectos adversos como somnolencia o diarrea (Lattanzi y cols., 2018). En estudios anteriores realizados por el grupo de trabajo del Laboratorio de Neurofarmacología FCQ-BUAP, se utilizó el modelo inducido por PTZ (35 mg/ kg) y se administró CBD a una dosis de 15 mg/kg, y se observó una disminución de la intensidad de las crisis convulsivas, pero no de la frecuencia. En contraste, un tratamiento de CBD y CBG a la vez, se propone como una estrategia que podría potenciar los efectos anticonvulsivos y antiinflamatorios de cada cannabinoide, dado que ambos compuestos actúan sobre distintos receptores, pero complementarios,

como el receptor CB2 y el PPAR γ , que podrían modular la liberación de neurotransmisores excitatorios y disminuir la inflamación neuronal (Bih y cols., 2015; Echeverry y cols., 2021).

Por su parte, la evidencia de los efectos del CBG en modelos convulsivos es escasa, y se reporta que el CBG por sí solo no tiene un efecto anticonvulsivo en modelos *in vivo* (Hill y cols., 2014). Esto coincidió con lo observado en el presente trabajo, donde el grupo CBG+PTZ no presentó cambios respecto al grupo modelo VEH+PTZ en la intensidad de las crisis convulsivas ni en la frecuencia en las diferentes categorías de crisis respecto a la escala de Racine.

Sin embargo, la coadministración en el grupo CBD + CBG + PTZ redujo la intensidad de las crisis convulsivas de manera global y la frecuencia de las crisis tónico-clónicas en comparación con los grupos VEH+PTZ y CBG+PTZ. Este hallazgo es relevante ya que la disminución de las crisis podría atenuar la respuesta proinflamatoria, lo cual podría reducir la progresión de los síntomas y de la enfermedad (Vezzani, 2014; Rana y Musto, 2018, Karan y cols., 2021).

Además, el grupo CBD+CBG+PTZ no presentó crisis tónico-clónicas (categoría 5 de la escala de Racine). Su y cols. (2015) reportaron que este tipo de crisis se asocia con una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , en comparación con las crisis de tipo ausencia (categoría 1), que no inducen dicha liberación. Por otra parte, es sabido que la presencia de estas citocinas proinflamatorias favorece el progreso de las crisis convulsivas debido a que su concentración aumentada en el tejido nervioso promueve la producción de radicales libres (estrés oxidativo) y otros mediadores proinflamatorios. Por lo que, la estimulación constante de estos procesos genera excitotoxicidad y la disrupción de la BHE, lo que permite la infiltración de células inmunes como leucocitos y neutrófilos a la zona de daño, liberando citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y proteasas citotóxicas. Esto promueve la activación de la microglía hacia un fenotipo proinflamatorio, afectando la actividad neuronal

(Stamatovic y cols., 2006). Este círculo vicioso provoca en la epilepsia el aumento de la susceptibilidad a las crisis convulsivas (Vezzani, 2014)

En particular, el CBG se ha descrito como una molécula con propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas, actuando como un agonista parcial de los receptores CB2 (Gauson y cols., 2007; Rock y cols., 2011, Granja y cols., 2012). Estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que el CBG reduce la producción de AMPc, la actividad de la enzima iNOS y la translocación nuclear de NF-kB, además de promover la supervivencia celular. Estos efectos se atribuyen a la activación del receptor CB2 en la microglía (Borrelli y cols., 2013; Giacoppo y cols., 2017; Zagzoog y cols., 2020).

En este trabajo, se complementa la evidencia experimental disponible haciendo uso de técnicas *in silico* para analizar el acoplamiento molecular de los cannabinoides CBD y CBG con los receptores CB2 y PPAR γ de *R. norvegicus*.

Las energías de afinidad obtenidas sugieren que el CBG tiene una mayor afinidad que los endocannabinoides por el sitio ortostérico del receptor rCB2. Esto puede ser debido a que su cadena alquílica de naturaleza hidrofóbica le permite acoplarse en la cavidad ortostérica estableciendo varias interacciones con Thr114 y Val113, mientras que el anillo fenólico establece interacciones π - π con Phe183, residuo que es indispensable para la estabilización del receptor (Tham y cols., 2019), mientras que los endocannabinoides establecen interacciones π -alquil y de van der Waals con estos residuos, las cuales son interacciones que favorecen la unión, pero que son más débiles que las interacciones π - π que establece el CBG. Es posible que en el modelo presente inducido por PTZ, el CBG sea capaz de activar al receptor rCB2 mediante la unión al sitio ortostérico, ya que durante las pruebas de acoplamiento molecular este fue el sitio donde se mostraron las menores energías de afinidad, además de interacciones favorables descritas anteriormente. Al activar este receptor situado en la microglía, se induce un cambio conformacional en éste que desencadena cascadas intracelulares, donde la subunidad G α

disminuye la producción de AMPc, evitando la activación de la proteína cinasa A (PKA) y la fosforilación de proteínas blanco, como factores de transcripción que promueven la transcripción de mediadores proinflamatorios, por lo que la activación de este receptor acoplado a $G\alpha_i$ disminuye la liberación de citocinas proinflamatorias (Gómez-Ruiz, y cols., 2007)

Por otra parte, el CBD establece interacciones π - π con Phe183 y Phe87 en el receptor $rCB2$, sin embargo, presenta energías de unión menos favorables que el CBG y los endocannabinoides. La evidencia bibliográfica sobre la unión del CBD al $hCB2$ ha sido controversial, ya que se apunta que el CBD tiene una baja afinidad in vivo por los receptores CB2, siendo capaz de inducir un agonismo inverso en concentraciones mayores ($4.2\mu M$), mientras que en concentraciones menores ($100nM$) tiene un papel modulador alostérico, es decir, que por medio a la unión de sitios alternativos del receptor CB2, puede modificar la afinidad del receptor por los ligandos endógenos (Patricio y cols., 2020). Sin embargo, su baja afinidad por el receptor $rCB2$ podría descartar la activación por medio del CBD.

Tanto el CBD y el CBG son capaces de interactuar con otras dianas biológicas involucradas en la fisiopatología epiléptica. Por su parte, el CBD tiene propiedades anticonvulsivas, esto mediante diferentes mecanismos, principalmente la inhibición de los canales de sodio y de calcio dependientes de voltaje, los receptores TRPV1 y el receptor GPR55. Existe evidencia que el CBD tiene afinidad por algunos canales de sodio en su estado inactivo, previniendo su activación. Entre ellos el receptor Nav.1.6 ubicado en neuronas excitadoras, donde el CBD es capaz de reducir la concentración de sodio en la neurona evitando el aumento de iones positivos dentro de las neuronas, previniendo la despolarización y consecuente liberación de neurotransmisores excitatorios (Patel, 2016). El receptor TRPV1 es un canal iónico que permite la entrada de calcio, el CBD es capaces de activarlo y desensibilizarlo rápidamente, evitando el aumento de la concentración de calcio en la neurona además de conferir propiedades antiinflamatorias dependientes de este

receptor (Bisogno, 2012). Por su parte el receptor GPR55 es un receptor acoplado a proteína Gq₁₁, y su activación induce cascadas intracelulares que promueven la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, aumentando su concentración intracelular y provocando la despolarización neuronal. Esta cascada es activada por el ligando endógeno del receptor GPR55, lisofosfatidilinositol (LPI) el cual se ha visto en aumento en sujetos con epilepsia (Rosenberg, y cols., 2022). El CBD es un antagonista de este receptor, por lo que al evitar la activación de esta vía es capaz de inhibir la despolarización neuronal en neuronas excitatorias por la liberación de calcio desde el retículo (Bih y cols., 2015, Kaplan y cols., 2017; Morano y cols., 2020 Patricio y cols., 2020). Además, el tratamiento previo con CBD plantea lograr una concentración plasmática estable antes de provocar un insulto y una microglía caracterizada hacia un fenotipo antiinflamatorio para poder mantener al margen las concentraciones de mediadores proinflamatorios y las concentraciones iónicas adecuadas para reducir los efectos convulsivos del PTZ.

El CBG por su parte, puede dirigirse a otras dianas moleculares e inducir efectos que podrían contribuir al efecto anticonvulsivo y antiinflamatorio del CBD, siendo que por sí mismo carece de efectos anticonvulsivos, pero presenta actividad antiinflamatoria. Tanto el CBD como el CBG se pueden unir y activar el receptor PPAR γ , aunque en diferente medida y a diferentes dosis. La evidencia existente reporta que la activación de este receptor por estos fitocannabinoides tiene propiedades antiinflamatorias que podrían ser benéficas en la patología de la epilepsia (O'Sullivan, 2016; Ren y cols., 2020).

Diferentes estudios han abordado la activación del receptor PPAR γ mediante compuestos sintéticos para inducir efectos neuroprotectores (Kapadia y Vemuganti, 2008), sin embargo, el uso de agonistas completos ha sido relacionado con efectos adversos como el aumento de la presión arterial y en consecuencia de paro cardíaco, fracturas óseas y anemia leve, por lo que se ha optado por el uso de compuestos que puedan inducir una respuesta parcial, entre los que se encuentran

algunos fitoquímicos como los fitocannabinoides, por lo que se realizaron acoplamiento molecular con el receptor *rPPAR γ* de *R. norvegicus* mediante el acoplamiento molecular con el CBD y el CBG.

Todos los cannabinoides se posicionaron en el dominio de unión a ligando (LBD). La activación del receptor *PPAR γ* se induce mediante la unión a esta cavidad, la cual es una superficie amplia (1440 Å³), en contraste con las superficies ortostéricas de otros receptores, como la del receptor CB2 (447 Å³) (Kroker y Bruning, 2015; Li y cols., 2021). Tanto los agonistas completos como los agonistas parciales de *PPAR γ* se unen al mismo dominio de unión al ligando (LBD); sin embargo, los agonistas completos —como la Rosiglitazona— interactúan con la hélice 12 (H12) mediante un puente de hidrógeno con la Tyr501, estabilizando la H12 y la superficie AF-2, la cual favorece el reclutamiento de coactivadores específicos que iniciarán la activación transcripcional robusta de los genes diana de *PPAR γ* . En cambio, los agonistas parciales muestran poca o ninguna estabilización de la H12, y en su lugar estabilizan otras regiones como la lámina β del LBD, lo que altera o no estabiliza la superficie AF-2 de la manera que lo hacen los agonistas completos, lo que permite una activación más débil o selectiva y permite una activación parcial del receptor, pero con menor riesgo de efectos adversos (Bruning y cols., 2007; Kroker y Bruning, 2015). Todos los cannabinoides empleados en el acoplamiento molecular fueron dirigidos hacia el sitio alternativo dentro del LBD del receptor *rPPAR γ* ya que todos ellos hacen interacción con residuos ubicados en la lámina beta, estabilizando la conformación alternativa del receptor. El CBD y el CBG obtuvieron energías más favorables que los endocannabinoides dentro de este sitio, por lo que se sugiere que el CBD y el CBG podrían unirse con mayor afinidad que los endocannabinoides al *rPPAR γ* . Sin embargo, se sugiere que la activación de este receptor podría darse de manera directa o indirecta por la coadministración de CBD+CBG, lo que de una manera u otra, daría como resultado un agonismo parcial.

Algunos estudios han abordado la administración del CBD y el CBG en modelos de inflamación, reportando un efecto aditivo de los efectos individuales de cada compuesto, los cuales están mediados principalmente por dianas como el receptor PPAR γ . Mammana y cols, (2019) llevaron a cabo un modelo *in vitro* inducido por lipopolisacárido (LPS) con un pretratamiento de CBD y CBG a diferentes dosis (de 2.5 μ M a 5 μ M cada uno), donde reportan que estos compuestos administrados de manera individual tienen efecto sobre diferentes marcadores inflamatorios como la reducción de la expresión de iNOS y de citocinas inflamatorias como IL-6 y TNF α , y por otra parte, el aumento las citocinas antiinflamatorias IL-10 e IL-37; sin embargo al ser administrados de manera conjunta (en dosis de 5 μ M-CBD/5 μ M-CBG) la concentración de marcadores inflamatorios disminuye de manera significativa, y la concentración de marcadores antiinflamatorios, aumenta significativamente. Observaron que, el CBD y el CBG fueron capaces de inducir la actividad transcripcional de PPAR γ de manera individual y conjunta, sugiriendo que es una vía implicada en los efectos observados. En otro modelo de inflamación pulmonar inducido por LPS, realizado por Cabrera y cols., (2021) se utilizó CBD y CBG a diferentes dosis y en diferentes formulaciones (MCT y Cremophor), y reportaron que la administración de estos compuestos es eficaz para reducir la infiltración de neutrófilos en los pulmones después de la exposición a LPS: Sin embargo, la formulación de los cannabinoides determinó el efecto sobre la infiltración de neutrófilos y la expresión de mediadores inflamatorios, ya que la formulación con MCT no tuvo un efecto significativo en contraste con la formulación con Cremophor, la cual si lo tuvo. Es así, que los tensioactivos, como Cremophor, mejoran la disolución de los fármacos lipofílicos en un medio acuoso formando micelas y atrapando las moléculas del fármaco dentro de ellas, aumentando así la velocidad de disolución del fármaco. En el modelo realizado en este trabajo, se utilizó Cremophor en la formulación de los cannabinoides por lo que podríamos especular que su absorción fue eficaz y la dosis administrada pudo haberse distribuido correctamente hacia el cerebro.

Finalmente, en las diferentes categorías de crisis convulsivas de la escala de Racine, hubo una disminución significativa en la frecuencia de las crisis de tipo tónico-clónico (categoría 5) al finalizar el protocolo, esto ocurrió posiblemente por la prevención de la acumulación de sustancias proinflamatorias, las cuales pueden hacer más susceptible al biomodelo a presentar crisis convulsivas (Vezzani, 2014; Rana y Musto, 2018; Meng y Yao 2020). La evidencia existente apunta que el aumento de la concentración de este tipo de sustancias, activan de manera sostenida diversas vías que promueven distintos eventos, como la producción de radicales libres, la disrupción de la BHE, la producción de citocinas proinflamatorias, lo que desemboca en estrés oxidativo, excitotoxicidad, y una disminución de la capacidad del sistema inhibitorio mediado por GABA de repolarizar las neuronas (Su y cols., 2015), por lo que el efecto del PTZ sobre las crisis convulsivas va en incremento al aumentar las administraciones. Sin embargo, la administración de CBD+CBG, podría reducir la intensidad y frecuencia de las crisis convulsivas mediante la activación de diferentes vías, entre ellas las activadas por los receptores CB2 y PPAR γ donde los efectos principales podrían ser, la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias, la diferenciación de la microglía hacia un fenotipo M2, la disminución de especies reactivas de oxígeno y la modulación de la entrada y salida de iones dentro de la neurona para su correcto funcionamiento. Estos efectos han sido estudiados y se ha reportado que, a su vez, previene eventos como la disrupción de la barrera hematoencefálica, lo cual contribuye a la persistencia de la excitotoxicidad e hiperexcitabilidad (Vezzani, 2014; Rana y Musto 2018; Mammana y cols, 2019; Cabrera y cols., 2021). Por otra parte, los fitocannabinoides pueden elevar la biodisponibilidad de endocannabinoides mediante la inhibición de las enzimas catalizadoras FAAH y MAGL, y mediante la interacción con las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), las cuales actúan como transportadores intracelulares que dirigen los eCB hacia FAAH y MAGL, evitando que estos sean dirigidos a esas enzimas para su degradación (Kaczocha y cols., 2009). Además, Elmer y cols. (2015) demostraron que los fitocannabinoides THC y CBD son

capaces de aumentar la biodisponibilidad de eCB al inhibir la captación celular de estos mediante la unión a las FABP 3, 5 y 7 con una afinidad de unión similar o mayor en comparación a la AEA y al 2-AG. De esta manera, se podría prolongar la biodisponibilidad de los eCB para su interacción con receptores del SEC, lo que podría contribuir al efecto terapéutico (figura 25).

Dado que el grupo CBD+CBG+PTZ no progresó hacia las crisis tónico-clónicas generalizadas a diferencia del grupo tratado solo con CBG+PTZ y el grupo modelo VEH+PTZ, se sugiere que, en el presente modelo los efectos del CBD y del CBG son dependientes de las vías CB2 y PPAR γ en gran medida, y podrían prevenir la excitotoxicidad en el tejido nervioso, lo que disminuye la recurrencia a las crisis convulsivas principalmente de tipo tónico-clónico. Los efectos promovidos por el CBD y el CBG podrían estar siendo complementados de manera sinérgica además de la posibilidad de contribuir a la disminución de efectos adversos (Su y cols., 2015; Rana y Musto 2018; Mammana y cols., 2019 Karan y cols., 2021; Cabrera y cols., 2021).

MECANISMO HIPOTÉTICO

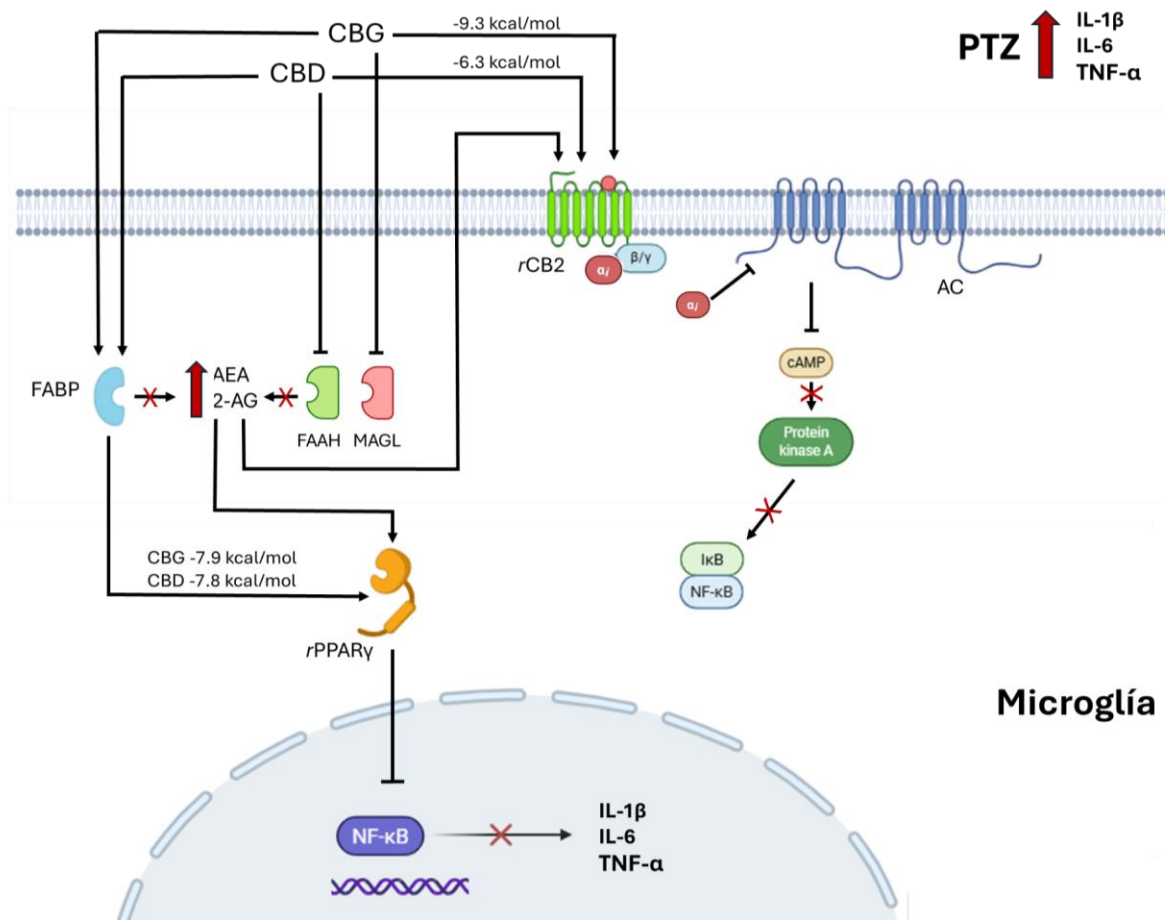


Figura 25. Mecanismo hipotético de la activación de *rCB2* y *rPPARγ* por CBD y CBG. El CBD y el CBG son capaces de activar el receptor *rPPARγ*, al cual son dirigidos por las proteínas FABP, que conducen a los cannabinoides al interior de la célula y al receptor *rPPARγ*, generando un agonismo parcial capaz de activar los mecanismos transcripcionales de *rPPARγ* e inhibir la producción de citocinas proinflamatorias. Por otra parte, la activación del receptor *rCB2* probablemente se induce por la unión del CBG, debido a que presenta mayor energía de afinidad *in silico* por el receptor *rCB2* que el CBD y los endocannabinoides. Además, ambos fitocannabinoides son capaces de elevar la biodisponibilidad de AEA y 2-AG por medio de la inhibición de las respectivas enzimas catalizadoras de eCB y por la competencia a la unión a las FABP, lo que podría permitir que tuvieran acción sobre los receptores involucrados en la red de señalización endocannabinoide, contribuyendo al efecto antiinflamatorio y disminuyendo la excitabilidad neuronal. *rCB2*: receptor cannabinoide tipo II de *Rattus norvegicus*; *rPPARγ*: receptor activado por proliferador de peroxisoma tipo gamma; CBD: cannabidiol; CBG: cannabigerol; PTZ: pentilentetrazol; FABP: proteína de unión a ácidos grasos; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; AC: adenilato ciclasa; cAMP: adenosín monofosfato cíclico; IκB: inhibidor de kappa B; NFκB: factor nuclear kappa B; FAAH: amida hidrolasa de ácidos grasos; MAGL: monoacil glicerol lipasa; IL-1β: interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa.

10. Conclusiones

- La coadministración de CBD y CBG disminuye la intensidad de las crisis convulsivas y la frecuencia de las crisis tónico-clónicas en ratas administradas con PTZ.
- La coadministración de cannabidiol y cannabigerol no disminuye la latencia a la primera crisis mioclónica, pero sí reduce la duración de las crisis tónico-clónicas en ratas administradas con PTZ.
- Las estructuras correspondientes al receptor cannabinoide tipo II (CB2) y al receptor activado por proliferador de peroxisoma tipo gamma (PPAR γ) de la especie *Rattus norvegicus* fueron obtenidos de la base de datos de AlphaFold con parámetros de calidad aceptables de la estructura, por lo que no fueron generados nuevamente.
- El CBD y el CBG tienen preferencia por el sitio ortostérico del receptor rCB2, donde el CBD tiene una interacción débil, y el CBG presenta interacciones de unión más estables y una energía de afinidad más fuerte que el CBD. Por otra parte, el CBD y el CBG tienen preferencia por el sitio alternativo del LBD de rPPAR γ con energías de afinidad muy similares e interactuando con residuos esenciales de la H3, para la activación parcial del receptor, lo que podría significar que su activación puede darse por la unión del CBD o del CBG.

11. Perspectivas

- 1) Evaluar el efecto de la coadministración de CBD+CBG sobre la liberación de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en ratas tratadas con pentilentetrazol.
- 2) Realizar la descripción molecular de la posible interacción de CBD+CBG con los receptores no descritos en este trabajo, como posibles blancos de acción de ambos fitocannabinoides, a través de cálculos de docking molecular y dinámica molecular.

Referencias

1. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096), 223-230.
2. Atkins, P. W., De Paula, J., & Keeler, J. (2023). *Atkins' physical chemistry*. Oxford university press.
3. Banati, R. B., Gehrmann, J., Schubert, P., & Kreutzberg, G. W. (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia*, 7(1), 111-118.
4. Banna, N. R., & Hazbun, J. (1969). Analysis of the convulsant action of pentylenetetrazol. *Experientia*, 25(4), 382-383.
5. Bauer, R., Woelkart, K., & Salo-Ahen, O. M. (2008). CB receptor ligands from plants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(3), 173-186.
6. Baxter, P. S., & Hardingham, G. E. (2016). Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 147-152.
7. Bender del Busto, J. E. (2018). La epilepsia, un problema de salud a escala mundial. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 17(5), 660-663.
8. Benson, M. J., Manzanero, S., & Borges, K. (2015). Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*, 56(6), 895-905.
9. Bento, A. F., Marcon, R., Dutra, R. C., Claudino, R. F., Cola, M., Leite, D. F. P., & Calixto, J. B. (2011). β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. *The American journal of pathology*, 178(3), 1153-1166.
10. Berg, A. T. (2011). Epilepsy, cognition, and behavior: the clinical picture. *Epilepsia*, 52, 7-12.
11. Bih, C. I., Chen, T., Nunn, A. V., Bazelot, M., Dallas, M., & Whalley, B. J. (2015). Moleculares targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics*, 12(4), 699-730.

12. Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D. E., Brandi, I., ... & Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134(4), 845-852.
13. Bitencourt-Ferreira, G., & de Azevedo Jr, W. F. (2019). Molecular docking simulations with ArgusLab. In *Docking screens for drug discovery* (pp. 203-220). New York, NY: Springer New York.
14. Bodor, Á. L., Katona, I., Nyíri, G., Mackie, K., Ledent, C., Hájos, N., & Freund, T. F. (2005). Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *Journal of Neuroscience*, 25(29), 6845-6856.
15. Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., ... & Zaretskaya, I. (2013). BLAS & *Therapeutics*, 69, 102047.
16. Borrelli, F., Fasolino, I., Romano, B., Capasso, R., Maiello, F., Coppola, D., ... & Izzo, A. A. (2013). Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochemical pharmacology*, 85(9), 1306-1316.
17. Bow, E. W., & Rimoldi, J. M. (2016). The structure–function relationships of classical cannabinoids: CB1/CB2 modulation. *Perspectives in medicinal chemistry*, 8, PMC-S32171.
18. Braissant, F., Fufelle, S., Scotto, D., Dauça & Wahli (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha,-beta, and-gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
19. Bruning, J. B., Chalmers, M. J., Prasad, S., Busby, S. A., Kamenecka, T. M., He, Y., ... & Griffin, P. R. (2007). Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure*, 15(10), 1258-1271.
20. Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., & Knollmann, B. C. (2018). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13*. Artmed Editora.

21. Brusco, A., Tagliaferro, P. A., Saez, T., & Onaivi, E. S. (2008a). Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1139(1), 450-457.
22. Brusco, A., Tagliaferro, P., Saez, T., & Onaivi, E. S. (2008b). Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse*, 62(12), 944-949.
23. Bundgaard, M., & Abbott, N. J. (2008). All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4–500 million years ago. *Glia*, 56(7), 699-708.
24. Burley, S. K., Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Markley, J. L., Nakamura, H., & Velankar, S. (2017). Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive. *Protein crystallography: methods and protocols*, 627-641.
25. Cabrera, C. L. R., Keir-Rudman, S., Horniman, N., Clarkson, N., & Page, C. (2021). The anti-inflammatory effects of cannabidiol and cannabigerol alone, and in combination. *Pulmonary Pharmacology* of cannabigerol: a brief overview. *Handbook of cannabis and related pathologies*, 958-967.
26. Cai, M., & Lin, W. (2022). The function of NF-kappa B during epilepsy, a potential therapeutic target. *Frontiers in neuroscience*, 16, 851394.
27. Cai, W., Yang, T., Liu, H., Han, L., Zhang, K., Hu, X., ... & Chen, J. (2018). Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A master gatekeeper in CNS injury and repair. *Progress in neurobiology*, 163, 27-58.
28. Cain, D. P. (1981). Transfer of pentylentetrazol sensitization to amygdaloid kindling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 15(4), 533-536.
29. Capelli, D., Cerchia, C., Montanari, R., Loiodice, F., Tortorella, P., Laghezza, A., ... & Lavecchia, A. (2016). Structural basis for PPAR partial or full activation revealed by a novel ligand binding mode. *Scientific reports*, 6(1), 34792.
30. Cárdenas, M., et al. (2021). *AlphaFold and the revolution in protein structure prediction*. *Nature Methods*, 18(7), 809-811.
31. Castro, M. E., Rangel-Galván, M., Dávila, E. M., Caballero, N. A., & Melendez, F. J. (2023). Theoretical NMR and IR spectroscopic analyses of the preferred

- conformers of the neurotransmitter anandamide. *International Journal of Quantum Chemistry*, 123(11), e27098.
32. Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 9-29.
33. D'Aniello, E., Fellous, T., Iannotti, F. A., Gentile, A., Allarà, M., Balestrieri, F., ... & Di Marzo, V. (2019). Identification and characterization of phytocannabinoids as novel dual PPAR α / γ agonists by a computational and in vitro experimental approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863(3), 586-597.
34. De Vries, H. E., Blom-Rosemalen, M. C., Van Oosten, M., De Boer, A. G., Van Berkel, T. J., Breimer, D. D., & Kuiper, J. (1996). The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *Journal of neuroimmunology*, 64(1), 37-43.
35. Deiana, S. (2017). Potential medical uses of cannabigerol: a brief overview. *Handbook of cannabis and related pathologies*, 958-967.
36. Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., ... & Riedel, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ 9-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology*, 219(3), 859-873.
37. Devane, W. A., Dysarz, F. 3., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, 34(5), 605-613.
38. Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., ... & Friedman, D. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791-802.

39. Dhir, A. (2012). Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Current protocols in neuroscience*, 58(1), 9-37.
40. di Giacomo, V., Chiavaroli, A., Orlando, G., Cataldi, A., Rapino, M., Di Valerio, V., ... & Ferrante, C. (2020). Neuroprotective and neuromodulatory effects induced by cannabidiol and cannabigerol in rat hypo-E22 cells and isolated hypothalamus. *Antioxidants*, 9(1), 71.
41. Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21 (12), 521–528. doi:10.1016/s0166-2236(98)01283-1.
42. Di Marzo, V., Stella, N., and Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 16 (1), 30–42. doi:10.1038/nrn3876.
43. Djinovic-Carugo, K., & Carugo, O. (2015). Missing strings of residues in protein crystal structures. *Intrinsically disordered proteins*, 3(1), e1095697.
44. Echeverry, C., Prunell, G., Narbono, C., de Medina, V. S., Nadal, X., Reyes-Parada, M., & Scorza, C. (2021). A comparative in vitro study of the neuroprotective effect induced by cannabidiol, cannabigerol, and their respective acid forms: relevance of the 5-HT_{1A} receptors. *Neurotoxicity Research*, 39(2), 335-348.
45. Elmes, M. W., Kaczocha, M., Berger, W. T., Leung, K., Ralph, B. P., Wang, L., ... & Deutsch, D. G. (2015). Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). *Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 8711-8721.
46. Farrelly, A. M., Vlachou, S., & Grintzalis, K. (2021). Efficacy of phytocannabinoids in epilepsy treatment: novel approaches and recent advances. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8), 3993.
47. Fasinu, P. S., Phillips, S., ElSohly, M. A., & Walker, L. A. (2016). Current status and prospects for cannabidiol preparations as new therapeutic

- agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 36(7), 781-796.
48. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), 13384-13421.
49. Filgueira, W. (2019). *Docking Screens for Drug Discovery*. Humana Press. New York, United States of América, 1.
50. Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel Jr, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.
51. Fisher, R.S. La nueva clasificación de convulsiones de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (2017). *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2017**, 17, 48.
52. French, J. A., Williamson, P. D., Thadani, V. M., Darcey, T. M., Mattson, R. H., Spencer, S. S., & Spencer, D. D. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 34(6), 774-780.
53. Friedman, D., French, J. A., & Maccarrone, M. (2019). Safety, efficacy, and mechanisms of action of cannabinoids in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 18(5), 504-512.
54. Frisch, M. E., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M., Cheeseman, J. R., ... & Fox, D. J. (2016). Gaussian 16.
55. Gauson, L. A., Stevenson, L. A., Thomas, A., Baillie, G. L., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007, June). Cannabigerol behaves as a partial agonist at both CB1 and CB2 receptors. In *Proceedings 17th Annual Symposium on the Cannabinoids. International Cannabinoid Research Society: Saint-Sauveur, QC* (p. 206).

56. Geppert, H., Vogt, M., & Bajorath, J. (2010). Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation. *Journal of chemical information and modeling*, 50(2), 205-216.
57. Ghovanloo, M. R., Dib-Hajj, S. D., Goodchild, S. J., Ruben, P. C., & Waxman, S. G. (2022). Non-psychotropic phytocannabinoid interactions with voltage-gated sodium channels: An update on cannabidiol and cannabigerol. *Frontiers in Physiology*, 13, 1066455.
58. Giacoppo, S., Gugliandolo, A., Trubiani, O., Pollastro, F., Grassi, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2017). Cannabinoid CB2 receptors are involved in the protection of RAW264. 7 macrophages against the oxidative stress: an in vitro study. *European journal of histochemistry: EJH*, 61(1), 2749.
59. Giaginis, C., Theocharis, S., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2007). A consideration of PPAR- γ ligands with respect to lipophilicity: current trends and perspectives. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(4), 413-417.
60. Gómez-Ruiz, M., Hernández, M., de Miguel, R., & Ramos, J. A. (2007). An overview on the biochemistry of the cannabinoid system. *Molecular Neurobiology*, 36(1), 3-14.
61. Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research*, 1071(1), 10-23.
62. Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews immunology*, 3(1), 23-35.
63. Granja, A. G., Carrillo-Salinas, F., Pagani, A., Gómez-Cañas, M., Negri, R., Navarrete, C., ... & Muñoz, E. (2012). A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7(4), 1002-1016.
64. Greenwood, R. S. (2000). Adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 41, S42-S52.

65. Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P., & Ward, S. C. (2016). The Cambridge structural database. *Structural Science*, 72(2), 171-179.
66. Guzmán-López, O., Ricaño-Rodríguez, C., Luis-Yong, D., & Ricaño-Rodríguez, J. (2023). NCBI: generalidades del repositorio y breve descripción de recursos aplicables al estudio de la fitogenética. *Revista fitotecnia mexicana*, 46(1), 63-76.
67. Hill, A. J., Jones, N. A., Smith, I., Hill, C. L., Williams, C. M., Stephens, G. J., & Whalley, B. J. (2014). Voltage-gated sodium (NaV) channel blockade by plant cannabinoids does not confer anticonvulsant effects per se. *Neuroscience Letters*, 566, 269-274.
68. Hoeller, A. A., De Carvalho, C. R., Franco, P. L. C., Formolo, D. A., Imthon, A. K., Dos Santos, H. R., ... & Walz, R. (2017). Behavioral and neurochemical consequences of pentylentetrazol-induced kindling in young and middle-aged rats. *Pharmaceuticals*, 10(3), 75.
69. Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., ... & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, 54(2), 161-202.
70. Hughes, T. S., Giri, P. K., De Vera, I. M. S., Marciano, D. P., Kuruvilla, D. S., Shin, Y., ... & Kojetin, D. J. (2014). An alternate binding site for PPAR γ ligands. *Nature communications*, 5(1), 3571.
71. Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis and cannabinoid research*, 2(1), 139-154.
72. Jankowsky, J. L., & Patterson, P. H. (2001). The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Progress in neurobiology*, 63(2), 125-149.
73. Jastrzab, A., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2022). The origin and biomedical relevance of cannabigerol. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 7929.

74. Ji, B., Liu, S., He, X., Man, V. H., Xie, X. Q., & Wang, J. (2020). Prediction of the binding affinities and selectivity for CB1 and CB2 ligands using homology modeling, molecular docking, molecular dynamics simulations, and MM-PBSA binding free energy calculations. *ACS Chemical Neuroscience*, *11*(8), 1139-1158.
75. Jiang, C., Ting, A. T., & Seed, B. (1998). PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, *391*(6662), 82-86
76. Jiang, H., Li, H., Cao, Y., Zhang, R., Zhou, L., Zhou, Y., ... & Li, P. (2021). Effects of cannabinoid (CBD) on blood brain barrier permeability after brain injury in rats. *Brain Research*, *1768*, 147586.
77. Jin, R., Liu, L., Zhang, S., Nanda, A., Li, G., 2013. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc. Transl. Res.* *6* (5), 834–851.
78. Johannessen Landmark, C., Eyal, S., Burns, M. L., Franco, V., & Johannessen, S. I. (2023). Pharmacological aspects of antiseizure medications: From basic mechanisms to clinical considerations of drug interactions and use of therapeutic drug monitoring. *Epileptic Disorders*, *25*(4), 454-471.
79. Joosten, R. P., Te Beek, T. A., Krieger, E., Hekkelman, M. L., Hooft, R. W., Schneider, R., ... & Vriend, G. (2010). A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic acids research*, *39*(suppl_1), D411-D419.
80. Ju, Z., Su, M., Hong, J., La Kim, E., & Jung, J. H. (2020). Anti-inflammatory effects of an optimized PPAR- γ agonist via NF- κ B pathway inhibition. *Bioorganic chemistry*, *96*, 103611.
81. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *nature*, *596*(7873), 583-589.
82. Kaczocha, M., Glaser, S. T., & Deutsch, D. G. (2009). Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(15), 6375-6380.

83. Kalyaanamoorthy, S., & Chen, Y. P. P. (2011). Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug discovery today*, 16(17-18), 831-839.
84. Kandravicius, L., Balista, P. A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R. N., Umeoka, E. H., Garcia-Cairasco, N., ... Leite, J. P. (2014). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1693–1705.
85. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M., & Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological reviews*.
86. Kapadia, R., Yi, J. H., & Vemuganti, R. (2008). Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 1813.
87. Kaplan, J. S., Stella, N., Catterall, W. A., & Westenbroek, R. E. (2017). Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of Dravet syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(42), 11229-11234.
88. Karan, A. A., Spivak, Y. S., Gerasimov, K. A., Suleymanova, E. M., Volobueva, M. N., Kvichansky, A. A., ... & Bolshakov, A. P. (2021). CB2 receptors modulate seizure-induced expression of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus but not neocortex. *Molecular Neurobiology*, 58(8), 4028-4037.
89. Karp, G. (2019). *Biología celular y molecular, octava edición: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill.
90. Keogh, B. P., Cordes, D., Stanberry, L., Figler, B. D., Robbins, C. A., Tempel, B. L., ... & Schwartzkroin, P. A. (2005). BOLD-fMRI of PTZ-induced seizures in rats. *Epilepsy research*, 66(1-3), 75-90.
91. Klebe, G. (2025). Protein–ligand interactions as the basis for drug action. In *Drug design: from structure and mode-of-action to rational design concepts* (pp. 39-65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
92. Klein, B. D., Jacobson, C. A., Metcalf, C. S., Smith, M. D., Wilcox, K. S., Hampson, A. J., & Kehne, J. H. (2017). Evaluation of cannabidiol in animal

- seizure models by the Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP). *Neurochemical research*, 42, 1939-1948.
93. Kroker, A. J., & Bruning, J. B. (2015). Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism. *PPAR research*, 2015(1), 816856.
94. Kühne, F., Becker, L. L., Bast, T., Bertsche, A., Borggraefe, I., Boßelmann, C. M., ... & Kaindl, A. M. (2023). Real-world data on cannabidiol treatment of various epilepsy subtypes: A retrospective, multicenter study. *Epilepsia Open*, 8(2), 360-370.
95. Kumar, B. P., Kumar, A. P., Jose, J. A., Prabitha, P., Yuvaraj, S., Chipurupalli, S., ... & Justin, A. (2020). Minutes of PPAR- γ agonism and neuroprotection. *Neurochemistry International*, 140, 104814.
96. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, Moshé SL, Perucca E, Wiebe S, French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010;51(6):1069–77.
97. Lattanzi, S., Brigo, F., Trinka, E., Zaccara, G., Cagnetti, C., Del Giovane, C., & Silvestrini, M. (2018). Efficacy and safety of cannabidiol in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Drugs*, 78(17), 1791-1804.
98. Laurindo, L. F., Santos, A. R. D. O. D., Carvalho, A. C. A. D., Bechara, M. D., Guiguer, E. L., Goulart, R. D. A., ... & Barbalho, S. M. (2023). Phytochemicals and regulation of NF-kB in inflammatory bowel diseases: an overview of in vitro and in vivo effects. *Metabolites*, 13(1), 96.
99. Leite, J. P., Garcia-Cairasco, N., & Cavalheiro, E. A. (2002). New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy research*, 50(1-2), 93-103.
100. Leweke, F. M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C. W., Hoyer, C., ... & Koethe, D. (2012). Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational psychiatry*, 2(3), e94-e94.
101. Li, Y., Zhang, C., Bell, E. W., Zheng, W., Zhou, X., Yu, D. J., & Zhang, Y. (2021). Deducing high-accuracy protein contact-maps from a triplet of coevolutionary

- matrices through deep residual convolutional networks. *PLoS computational biology*, 17(3), e1008865.
102. López-Vallejo, F., Caulfield, T., Martínez-Mayorga, K., A Giulianotti, M., Nefzi, A., A Houghten, R., & L Medina-Franco, J. (2011). Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14(6), 475-487.
103. Lorigados, L., Orozco, S., Morales, L., Estupiñán, B., García, I., & Rocha, L. (2013). Excitotoxicity and neuronal death in epilepsy. *Biotechnología Aplicada*, 30(1), 1-8.
104. Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(15), 6711-6715.
105. 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.
106. Maccarrone, M., Battista, N., and Centonze, D. (2007). The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.*81, 349–379.
107. Macêdo Santiago, L. Â., Neto, L. G. L., Borges Pereira, G., Leite, R. D., Mostarda, C. T., de Oliveira Brito Monzani, J., ... & Navarro, F. (2018). Effects of Resistance Training on Immunoinflammatory Response, TNF-Alpha Gene Expression, and Body Composition in Elderly Women. *Journal of aging research*, 2018(1), 1467025
108. Mammana, S., Cavalli, E., Gugliandolo, A., Silvestro, S., Pollastro, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). Could the combination of two non-psychotropic cannabinoids counteract neuroinflammation? Effectiveness of cannabidiol associated with cannabigerol. *Medicina*, 55(11), 747.
109. Marescaux, C., Micheletti, G., Vergnes, M., Depaulis, A., Rumbach, L., & Warter, J. M. (1984). A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in

- the rat: comparison with pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia*, 25(3), 326-331.
110. Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., ... & Lutz, B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302(5642), 84-88.
111. Marson AG, Appleton R, Baker GA, Chadwick DW, Doughty J, Eaton B et al (2007) A randomised controlled trial examining the longer-term outcomes of standard versus new antiepileptic drugs. The SANAD Trial Health Technol Assess 11:1–134.
112. 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.
113. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TT . Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561–564.
114. Mechoulam, R., & Hanuš, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and physics of lipids*, 108(1-2), 1-13.
115. Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual review of psychology*, 64(1), 21-47.
116. Meng, F., & Yao, L. (2020). The role of inflammation in epileptogenesis. *Acta Epileptologica*, 2(1), 15.
117. Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., & Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β . *Journal of neuroimmunology*, 210(1-2), 3-12.
118. Milligan, Carol J., et al. "Beyond CBD: Inhibitory effects of lesser studied phytocannabinoids on human voltage-gated sodium channels." *Frontiers in Physiology* 14 (2023): 1081186.

119. Morano, A., Fanella, M., Albini, M., Cifelli, P., Palma, E., Giallonardo, A. T., & Di Bonaventura, C. (2020). Cannabinoids in the treatment of epilepsy: current status and future prospects. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 381-396.
120. Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65.
121. Muzio, L., Viotti, A., & Martino, G. (2021). Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: from understanding to therapy. *Frontiers in neuroscience*, 15, 742065.
122. Nachnani, R., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2021). The pharmacological case for cannabigerol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 376(2), 204-212.
123. Nebane, N. M., Hurst, D. P., Carrasquer, C. A., Qiao, Z., Reggio, P. H., & Song, Z. H. (2008). Residues accessible in the binding-site crevice of transmembrane helix 6 of the CB2 cannabinoid receptor. *Biochemistry*, 47(52), 13811-13821.
124. Olarreaga, I. O., Alberdi, L. G., & Navalón, J. A. A. (2014). El sistema inmune y su función en el sistema nervioso central. *Biociencias*, 11, 21.
125. O'Sullivan, S. E. (2016). An update on PPAR activation by cannabinoids. *British journal of pharmacology*, 173(12), 1899-1910.
126. O'Sullivan, S. E., Sun, Y., Bennett, A. J., Randall, M. D., & Kendall, D. A. (2009). Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *European journal of pharmacology*, 612(1-3), 61-68.
127. Pandey, P., Roy, K. K., & Doerksen, R. J. (2020). Negative allosteric modulators of cannabinoid receptor 2: protein modeling, binding site identification and molecular dynamics simulations in the presence of an orthosteric agonist. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(1), 32-47.
128. Patel, R. R., Barbosa, C., Brustovetsky, T., Brustovetsky, N., & Cummins, T. R. (2016). Aberrant epilepsy-associated mutant Nav1.6 sodium channel activity can be targeted with cannabidiol. *Brain*, 139(8), 2164-2181.

129. Patra, P. H., Barker-Haliski, M., White, H. S., Whalley, B. J., Glyn, S., Sandhu, H., ... & McNeish, A. J. (2019). Cannabidiol reduces seizures and associated behavioral comorbidities in a range of animal seizure and epilepsy models. *Epilepsia*, *60*(2), 303-314.
130. 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*, 595635.
131. Pertwee, R. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *British journal of pharmacology*, *153*(2), 199-215.
132. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, *25*(13), 1605-1612.
133. Pitkänen, A., Schwartzkroin, P. A., & Moshé, S. L. Models of seizures and epilepsy. (*No Title*).
134. Rana & Musto (2018). The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of neuroinflammation*, *15*(1), 144.
135. Rastogi, S. C., Mendiratta, N., & Rastogi, P. (2013). *Bioinformatics: methods and applications:(Genomics, proteomics and drug discovery)*. PHI Learning Pvt. Ltd..
136. Ren, S. Y., Wang, Z. Z., Zhang, Y., & Chen, N. H. (2020). Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases—focusing on FAAH/MAGL inhibitors. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(10), 1263-1271.
137. Riney, K., Bogacz, A., Somerville, E., Hirsch, E., Nabbout, R., Scheffer, I. E., ... & Tinuper, P. Clasificación y definición de síndromes de edad de inicio variable

de la Liga Internacional contra la Epilepsia: documento de posición del Grupo de Trabajo de la ILAE sobre Nosología y Definiciones.

138. Rock, E. M., Goodwin, J. M., Limebeer, C. L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2011). Interaction between non-psychotropic cannabinoids in marihuana: effect of cannabigerol (CBG) on the anti-nausea or anti-emetic effects of cannabidiol (CBD) in rats and shrews. *Psychopharmacology*, 215(3), 505-512.
139. Rosenberg, E., Chamberland, S., Bazelot, M., Nebet, E. R., Wang, X., McKenzie, S., ... & Tsien, R. (2022). Cannabidiol targets a modulatory system for excitatory-inhibitory synaptic coordination, contributing to its anti-seizure action. *bioRxiv*, 2022-09.
140. Sarkisian, M. R. (2001). Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy & Behavior*, 2(3), 201-216.
141. Schaarschmidt, J., Monastyrskyy, B., Kryshtafovych, A., & Bonvin, A. M. (2018). Assessment of contact predictions in CASP12: co-evolution and deep learning coming of age. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86, 51-66.
142. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE commission for classification and terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512–21.
143. Secretaría de Salud. (2021). *En México, 2 millones de personas padecen epilepsia*. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/prensa/en-mexico-2-millones-de-personas-padecen-epilepsia>
144. Shahbazi, F., Grandi, V., Banerjee, A., & Trant, J. F. (2020). Cannabinoids and cannabinoid receptors: The story so far. *IScience*, 23(7).
145. Shapiro, L., Wong, J.C., & Escayg, A. (2019) Reduced cannabinoid 2 receptor activity increases susceptibility to induced seizures in mice. *Epilepsia*, 60, 2359-2369.

146. Shevyrin, V. A., & Morzherin, Y. Y. (2015). Cannabinoids: structures, effects, and classification. *Russian Chemical Bulletin*, 64, 1249-1266.
147. Sills, G. J., & Rogawski, M. A. (2020). Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*, 168, 107966.
148. Singh A, Trevick S. The epidemiology of global epilepsy. *Neurol Clin*. 2016; 34(4):837–47.
149. Snead III, O. C. (1992). Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents. *Generalized Non-Convulsive Epilepsy: Focus on GABA-B Receptors*, 7-19.
150. Srivastava, M. D., Srivastava, B. I. S., & Brouhard, B. (1998). $\Delta 9$ Tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*, 40(3), 179-185.
151. Stamatovic, S. M., Dimitrijevic, O. B., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2006). Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *ACTA NEUROCHIRURGICA-SUPPLEMENTUM THEN SUPPLEMENT-WIEN-*, 96, 444.
152. Stohs, S. J., & Ray, S. D. (2020). Is cannabidiol hepatotoxic or hepatoprotective: A review. *Toxicology Research and Application*, 4, 2397847320922944.
153. Stone, N. L., Murphy, A. J., England, T. J., & O'Sullivan, S. E. (2020). A systematic review of minor phytocannabinoids with promising neuroprotective potential. *British Journal of Pharmacology*, 177(19), 4330-4352.
154. Studer, R. A., Dessailly, B. H., & Orengo, C. A. (2013). Residue mutations and their impact on protein structure and function: detecting beneficial and pathogenic changes. *Biochemical journal*, 449(3), 581-594.
155. Su, J., Yin, J., Qin, W., Sha, S., Xu, J., & Jiang, C. (2015). Role for pro-inflammatory cytokines in regulating expression of GABA transporter type 1 and 3 in specific brain regions of kainic acid-induced status epilepticus. *Neurochemical Research*, 40, 621-627.

156. Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q., & Dheen, S. T. (2019, October). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 94, pp. 112-120). Academic Press.
157. Sumadewi, K. T., Harkitasari, S., & Tjandra, D. C. (2023). Biomolecular mechanisms of epileptic seizures and epilepsy: a review. *Acta Epileptologica*, 5(1), 28.
158. Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A., & Rusakov, D. A. (2013). Cannabinoid-and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5193-5198.
159. Tang, Z. T., & Chen, C. (2012). Monoacylglycerol lipase is a new therapeutic target for Alzheimer's disease.
160. Tham, M., Yilmaz, O., Alaverdashvili, M., Kelly, M. E., Denovan-Wright, E. M., & Laprairie, R. B. (2019). Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *British journal of pharmacology*, 176(10), 1455-1469.
161. Thompson, M. A. (2004, August). Molecular docking using arguslab: An efficient shape-based search algorithm and an enhanced xscore scoring function. In Abstract papers of the American Chemical Society (Vol. 228, pp. U360-U360). 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC.
162. Trossini, G. H., Guido, R. V., Oliva, G., Ferreira, E. I., & Andricopulo, A. D. (2009). Quantitative structure–activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: Molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28(1), 3-11.
163. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461.

164. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
165. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L., & Berkenstam, A. (1998). Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31108-31112.
166. Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., ... & Sharkey, K. A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310(5746), 329-332.
167. Van Vliet, E. A., da Costa Araujo, S., Redeker, S., Van Schaik, R., Aronica, E., & Gorter, J. A. (2007). Blood–brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*, 130(2), 521-534.
168. Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., ... & Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic acids research*, 52(D1), D368-D375.
169. Velíšková, J. A. N. A. (2006). Behavioral characterization of seizures in rats. *Models of seizures and epilepsy*. San Diego: Elsevier Inc, 601-1
170. Vezzani, A. (2014). Epilepsy and inflammation in the brain: overview and pathophysiology: epilepsy and inflammation in the brain. *Epilepsy currents*, 14(2_suppl), 3-7.
171. VMD Visual Molecular Dynamics. Available online: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd> (accessed on 9 May 2015).
172. Wei, G. W. (2019). Protein structure prediction beyond AlphaFold. *Nature Machine Intelligence*, 1(8), 336-337.
173. Weller, A., & Mostogsky, D. I. (1995). Ontogenetic development and pentylenetetrazol seizure thresholds in rats. *Physiology & behavior*, 57(4), 629-631.

174. Wenthur, C. J., Gentry, P. R., Mathews, T. P., & Lindsley, C. W. (2014). Drugs for allosteric sites on receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54(1), 165-184.
175. Xavier MM, Heck GS, de Avila MB, Levin NM, Pintro VO, Carvalho NL et al (2016) SAnDReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. *Comb Chem High Throughput Screen* 19:801–812
176. Xie, X. Q., Chen, J. Z., & Billings, E. M. (2003). 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 53(2), 307-319.
177. Xie, X. Q., Chen, J. Z., & Billings, E. M. (2003). 3D structural model of the G-protein-coupled cannabinoid CB2 receptor. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 53(2), 307-319.
178. Yuan, J., Jiang, C., Wang, J., Chen, C. J., Hao, Y., Zhao, G., ... & Xie, X. Q. (2022). In silico prediction and validation of CB2 allosteric binding sites to aid the design of allosteric modulators. *Molecules*, 27(2), 453.
179. Yue, L., Ye, F., Xu, X., Shen, J., Chen, K., Shen, X., & Jiang, H. (2005). The conserved residue Phe273 (282) of PPAR α (γ), beyond the ligand-binding site, functions in binding affinity through solvation effect. *Biochimie*, 87(6), 539-550.
180. Zagzoog, A., Mohamed, K. A., Kim, H. J. J., Kim, E. D., Frank, C. S., Black, T., ... & Laprairie, R. B. (2020). In vitro and in vivo pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Scientific Reports*, 10(1), 20405.
181. Zhao, Q., Marolewski, A., Rusche, J. R., & Holmes, G. L. (2006). Effects of uridine in models of epileptogenesis and seizures. *Epilepsy research*, 70(1), 73-82.

ANEXOS

Anexo 1

Fundamentos de los programas computacionales utilizados para los experimentos *in silico*.

Programas para acoplamiento molecular:

Autodock Vina

Es un programa de código abierto que emplea un algoritmo genético basado en un método estocástico y es de libre acceso. Por su parte, ArgusLab también utiliza un algoritmo genético, pero se enfoca en la búsqueda rápida de conformaciones, lo que lo hace menos especializado que Autodock Vina, pero al igual que este, ArgusLab es de uso gratuito (Bitencourt-Ferreira y cols., 2019).

Estos programas proveen una puntuación de energía, representada por la energía libre de Gibbs (ΔG) para cada acoplamiento ligando-receptor. La relación entre la constante de equilibrio y el cambio de energía libre estándar se expresa mediante la ecuación: $\Delta G^\circ = -R \ln K$, en la que el cambio de energía libre estándar (ΔG°) relaciona el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) con la constante de equilibrio (K) en una reacción química. Mediante esta ecuación se describe la energía libre emitida cuando los reactivos se convierten en productos en condiciones estándar, por lo que un valor negativo indica que la reacción es espontánea, mientras que un valor positivo indica la no espontaneidad de la reacción (Atkins y cols., 2018).

ArgusLab

Es un programa para realizar acoplamiento molecular, el cual también utiliza un algoritmo genético, pero se enfoca en la búsqueda rápida de conformaciones, lo que lo hace menos especializado que Autodock Vina, sin

embargo al igual que este, ArgusLab es de uso gratuito (Bitencourt-Ferreira y cols., 2019).

AlphaFold

Es un programa basado en inteligencia artificial para realizar predicciones estructurales de proteínas. Para evaluar los resultados de las estructuras generadas se utiliza los parámetros pLDDT y pTM (predicted Local Distance Difference Test y predicted Template Modelling score, por sus siglas en inglés). El pLDDT calcula la desviación entre las predicciones de distancia de los átomos y la distancia real esperada entre ellos, un pLDDT alto (cercano a cien) sugiere un modelo bien predicho, mientras que un valor bajo (cercano a cero) indica que éste es menos confiable. Por otra parte, el pTM evalúa la similitud entre el modelo predicho por AlphaFold y una estructura experimental conocida en función de las secuencias de aminoácidos y la información disponible para estructuras relacionadas. El pTM este se mide en una escala del 0 al 1, siendo 1 una coincidencia perfecta con la estructura experimental (Cárdenas y cols., 2021; Jumper y cols., 2021).

PDBeFold

El programa utiliza diferentes métricas para la validación de las comparaciones secuenciales integradas en el Q-score el cual evalúa su calidad mediante la combinación de parámetros como el RMSD, la cobertura del alineamiento y la calidad global de la alineación. El Q-score, se calcula mediante la ecuación: $Q = -10 \log_{10}(e)$, donde (e) es la probabilidad estimada de que la base sea incorrecta, es decir, mientras más bajo sea el valor de (e) el valor del Q-score es más alto, lo que indica una menor probabilidad de error y mayor fiabilidad en la estructura.

Participación en congresos



Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.

CARTA DE ACEPTACIÓN

Tlaxcala, Tlax, a 29 de julio de 2024

Valencia-Apango M, Chávez-Reséndiz ND, Caballero NA, Patricio F, Ilhuicamina Daniel L, Patricio-Martínez A.

Nos complace comunicarles la ACEPTACIÓN del resumen titulado "EFECTO SINÉRGICO DEL CANNABIDIOL Y CANNABIGEROL SOBRE LA INTENSIDAD Y FRECUENCIA DE LAS CONVULSIONES INDUCIDAS POR PTZ "

El trabajo se presentará en las SESIONES DE CARTELES del LXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C., que se celebrará del 03 al 06 de septiembre del 2024 en el campus Rectoría de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Tlax.

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

Sesión de carteles: número 1

Cartel: número 14

Fecha y hora: martes 3 de septiembre a las 16:30 hrs.

Ubicación: Sala *Ad Honorem* Rodolfo Ortíz, Complejo Cultural Universitario.

Dimensiones del cartel: 90 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

LXVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas
Septiembre 3-6, 2024
Tlaxcala, Tlax.

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



LXVII

Congreso Nacional
de la Sociedad Mexicana
de Ciencias Fisiológicas

La Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas A.C.

Otorga la siguiente

CONSTANCIA

a

Mariana Valencia Apango

Por haber obtenido el Primer lugar en el concurso "Ciencia en un minuto"

Tlaxcala, Tlaxcala, 6 de septiembre de 2024

Dra. Margarita Martínez Gómez
Presidenta



Dear Aleidy Patricio-Martínez,

Your Scientific Abstract, "**Synergistic Effect of Cannabidiol and Cannabigerol on Seizures Induced by Pentylentetrazole**" has been accepted for presentation at Neuroscience 2025 taking place November 15–19, 2025 in San Diego.

Session Name: *In Vivo* and Behavioral Analysis of Epilepsy

Session Number: PST262

Session Date & Time: Tuesday, November 18, 2025, 8:00 AM – Tuesday, November 18, 2025, 12:00 PM

H. Puebla de Zaragoza a 29 de septiembre de 2025

Estimada Dra. Dolores López Morales

Reciba un cordial saludo, mi nombre es **Mariana Valencia Apango**, soy estudiante de la Facultad de Ciencias Biológicas con matrícula: **201842805**, me dirijo a usted para iniciar mi documentación para la presentación de mi defensa de tesis de licenciatura con el título: "**Análisis Teórico-experimental de fitoquímicos en el proceso de la epilepsia**" que se realizará en una modalidad de titulación **presencial**.

Le comento que el día acordado para la realización de la misma será el día **lunes 27 de Octubre a las 11:00 a.m.** en el **Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas**, adjunto la firma de la directora y co-directora de tesis, así como de las revisoras de la misma, como confirmación de su acuerdo para que el examen se lleve a cabo en la fecha y hora previamente establecidos.



Atte. Mariana Valencia Apango



Dra. Norma Angelica Caballero Concha



Dra. Adriana Berenice Silva Gómez



Dra. Aleidy Patricio Martínez



Dra. María Eugenia Castro Sánchez



Mtra. Montserrat Vázquez Balbuena