



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización fitoquímica de un aceite destilado de *Cannabis yoda* y evaluación farmacológica en modelos de epilepsia en roedores

Andrés Ricardo Lancheros Sanabria

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2023

Caracterización fitoquímica de un aceite destilado de *Cannabis yoda* y evaluación farmacológica en modelos de epilepsia en roedores

Andrés Ricardo Lancheros Sanabria

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: **Magister en Ciencias - Farmacología**

Director:

M.D DSc Mario Francisco Guerrero Pabón

Codirector:

PhD Jorge Ariel Martínez Ramírez

Línea de Investigación:

Farmacología experimental del Sistema Nervioso Central

Grupos de Investigación:

Farmacología Molecular – FARMOL

Investigaciones Toxicológicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2023

Dedicatoria

A Mariela, Ricardo y Horus.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Andrés Ricardo Lancheros Sanabria
CC 1.014.280.837

Fecha 31/01/2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, la Facultad de Ciencias, el Departamento de Farmacia y al Bioterio por acogerme en sus instalaciones y permitirme hacer uso de ellas para el desarrollo de la presente investigación

A los profesores Mario Francisco Guerrero Pabón y Jorge Ariel Martínez Ramírez por su constante soporte y paciencia desde la dirección y codirección de la investigación.

Al Departamento de Estadística y sus estudiantes, quien a través de la Coordinación Curricular y el profesor Leonardo Trujillo Oyola me apoyaron en el análisis estadístico de los datos.

A las empresas Laboratorio Endótica S.A.S. y Cannagold S.A.S. por su contribución, confianza y logística en todo lo concerniente al aceite destilado y el cannabidiol aislado.

A Knight Therapeutics Inc, especialmente a Mỳ Dang, por su cariño, empatía, comprensión y motivación durante el desarrollo de la investigación.

A mis amigos, especialmente, Juan David Flórez y Jessica Salinas Calderón por su amistad, soporte, motivación e interés en los resultados de la investigación.

A Vanessa Romero, estudiante de pregrado, quien siempre estuvo disponible con su ayuda y soporte para los análisis cromatográficos.

A mis padres, Ricardo Lancheros Puentes y Mariela Sanabria Mejía, por su constante apoyo, amor, energía e interés en cada uno de los resultados obtenidos.

A Mónica Fernanda Silva Cañas, colega, consejera y compañera incondicional.

Resumen

Caracterización fitoquímica de un aceite destilado de *Cannabis yoda* y evaluación farmacológica en modelos de epilepsia en roedores

La presente investigación quiere reconocer si es comparable el efecto anticonvulsivante del aceite destilado de *Cannabis yoda* en las crisis convulsivas tónico-clónicas, mioclónicas, y de bajo umbral frente a patrones reconocidos para cada crisis. Y determinar si el posible efecto protector es análogo, superior o inferior que el cannabidiol aislado (CBD). Lo anterior debido que la epilepsia tiene un alto impacto sobre la salud pública del mundo, especialmente en países en vía de desarrollo, y que las líneas de tratamiento tradicional para esta patología traen consigo efectos indeseados para el paciente que conllevan a un abandono de la terapia; por lo que se hace necesario aumentar los esfuerzos en la investigación de alternativas terapéuticas que prioricen la efectividad y seguridad en el control de las crisis convulsivas, como lo pueden ser los derivados de Cannabis. La investigación se realizó a través de modelos experimentales sobre modelo murino para las crisis tónico-clónicas inducidas por electrochoque máximo (MES), mioclónicas inducidas por pentilentetrazol (PTZ) y de bajo umbral o refractarias producidas por electrochoque a baja frecuencia, observando si los individuos presentaban las crisis características de cada modelo. Adicionalmente, se incluyó el modelo del eje rodante para determinar si las sustancias evaluadas afectan el desempeño motor del individuo. Asimismo, para reconocer los protagonistas del potencial efecto protector en cada crisis, se realizó la evaluación fitoquímica preliminar a través de técnicas cromatográficas de identificación y cuantificación. Los resultados mostraron que el aceite destilado no presentó una protección estadísticamente significativa en el modelo MES a pesar de proteger algunos individuos, caso contrario al modelo de las crisis de bajo umbral, donde si se pudo evidenciar un índice de protección estadísticamente significativo, versus la molécula aislada y el patrón, a todas las dosis evaluadas. Finalmente, en el modelo PTZ, se pudo observar una protección estadísticamente significativa atribuible principalmente al

cannabidiol (CBD) en los intervalos de dosis 50 y 300 mg/Kg. Respecto al análisis cromatográfico, se pudo identificar en el aceite destilado fitocannabinoides y terpenos comunes de este género, cuantificando solamente CBD y THC con porcentajes de 15.6 y 1.3 respectivamente. Se pudo concluir que ninguna sustancia evaluada afectaba el desempeño motor de los individuos, que el aceite destilado y el CBD tienen un índice de protección para las crisis convulsivas evaluadas y que la mayor protección atribuida en el modelo de bajo umbral para el aceite destilado está correlacionada con la presencia de moléculas anexas como compuestos de tipo isoprenoide y cannabinoides adicionales que mediarían una mayor respuesta a través del efecto séquito y sus múltiples blancos bioquímicos relacionados con la epilepsia.

Palabras clave: Epilepsia, Convulsión, Cromatografía, Cannabis, Cannabidiol, Pentilentetrazol, PTZ, MES

Abstract

Phytochemical characterization of *Cannabis yoda* distilled oil and pharmacological evaluation in rodent models of epilepsy

The present investigation aims to recognize whether the anticonvulsant effect of *Cannabis yoda* distillate oil on tonic-clonic, myoclonic, and low-threshold seizures is comparable to recognized patterns for each seizure. And to determine if the possible protective effect is analogous, superior, or inferior to isolated cannabidiol (CBD). This is due to the fact that epilepsy has a high impact on public health in the world, especially in developing countries. And that the traditional lines of treatment for this pathology bring with them undesired effects for the patient that lead to the abandonment of the therapy; therefore, it is necessary to increase efforts in the research of therapeutic alternatives that prioritize effectiveness and safety in the control of convulsive crises, such as Cannabis derivatives. The research was carried out through experimental models on murine model for tonic-clonic seizures induced by maximum electroshock (MES), myoclonic seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ), and low threshold or refractory seizures produced by electroshock at low frequency, observing if the individuals presented the characteristic seizures of each model. Additionally, the rota-rod model was included to determine whether the substances evaluated affect the individual's motor performance. Likewise, in order to recognize the protagonists of the potential protective effect in each crisis, preliminary phytochemical evaluation was carried out through chromatographic techniques of identification and quantification. The results showed that the distilled oil did not present a statistically significant protection in the MES model in spite of protecting some individuals, contrary to the low-threshold crisis model, where a statistically significant protection index could be evidenced, versus the isolated molecule and the standard, at all the doses evaluated. Finally, in the PTZ model, statistically significant protection was observed, mainly attributable to cannabidiol (CBD) in the 50 and 300 mg/kg dose intervals. Regarding the chromatographic analysis, it was possible to identify in the distilled oil phytocannabinoids

and terpenes common to this genus, quantifying only CBD and THC with percentages of 15.6 and 1.3, respectively. It could be concluded that no substance evaluated affected the motor performance of individuals, that the distilled oil and CBD have a protective index for the seizures evaluated, and that the greater protection attributed in the low threshold model for the distilled oil is correlated with the presence of annexed molecules such as isoprenoid-type compounds and additional cannabinoids that mediate a greater response through the entourage effect and its multiple biochemical targets related to epilepsy.

Keywords: Epilepsy, Seizure, Chromatography, Cannabis, Cannabidiol, Pentylentetrazol, PTZ, CME

Contenido

	Pág.
Resumen.....	6
Abstract	8
Lista de figuras	12
Lista de tablas	13
Lista de abreviaturas	16
Introducción	17
Justificación.....	20
1. Problema Investigado.....	22
1.1 Definición del problema.....	22
1.2 Planteamiento del problema	22
2. Objetivos	24
2.1 General.....	24
2.2 Específicos	24
3. Estado del arte	25
3.1 Epilepsia	25
3.1.1 Clasificación de la epilepsia.....	26
3.1.2 Epidemiología de la epilepsia	27
3.1.3 Fisiopatología de la epilepsia	29
3.1.4 Farmacología de la epilepsia.....	30
3.2 Genero <i>Cannabis</i>	33
3.2.1 Descripción botánica	33
3.2.2 Química de la planta.....	33
3.2.3 Propiedades biológicas y farmacológicas del género Cannabis	35
3.2.4 Sistema endocannabinoide	37
3.2.5 <i>Cannabis yoda</i>	38
4. Materiales y métodos.....	39
4.1 Materiales y Reactivos	39
4.1.1 Sustancias.....	39
4.1.2 Equipos	39
4.1.3 Otros	40
4.2 Parte farmacológica	41
4.2.1 Animales de laboratorio.....	41
4.2.2 Procedimiento del modelo del eje rodante.....	42
4.2.3 Procedimiento de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz.....	42
4.2.4 Procedimiento de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).....	43
4.2.5 Procedimiento de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES)	44

4.2.6	Diseño experimental y análisis estadístico.....	44
4.3	Parte analítica	49
4.3.1	Procedimiento de identificación y cuantificación de componentes de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado a través de técnicas cromatográficas.....	49
4.3.1.1	Identificación de cannabinoides por GC-MS/EI.....	49
4.3.1.2	Identificación de terpenos por GC-MS/EI-HS-SPME.....	50
4.3.1.3	Cuantificación de THC, CBD y CBN por GC-FID	50
5.	Resultados.....	53
5.1	Parte farmacológica	53
5.1.1	Resultados del procedimiento del modelo del eje rodante	53
5.1.2	Resultados del procedimiento de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz.....	55
5.1.3	Resultados del procedimiento de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).....	59
5.1.4	Resultados del procedimiento de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES)	62
5.2	Parte analítica	66
5.2.1	Resultado de la identificación de cannabinoides por GC-MS/EI.....	66
5.2.2	Resultados de la identificación de terpenos por GC-MS/EI-HS-SPME.....	67
5.2.3	Resultados del procedimiento de cuantificación de THC, CBD y CBN por GC-FID.....	69
6.	Discusión.....	73
6.1	Modelo del eje rodante	73
6.2	Prueba de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz.....	74
6.3	Prueba de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).....	80
6.4	Prueba de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES).....	82
6.5	Perfil fitoquímico de <i>Cannabis yoda</i>	83
7.	Conclusiones y recomendaciones.....	86
7.1	Conclusiones.....	86
7.2	Recomendaciones.....	86
	Bibliografía	89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: Estructuras de los principales anticonvulsivantes usados en la farmacoterapia de la epilepsia	31
Figura 3-2: Estructuras de algunos compuestos mayoritarios presentes en el género <i>Cannabis</i>	35
Figura 4-1: Esquema de distribución de tratamientos por modelo en Fase I y Fase II....	47
Figura 4-2: Esquema de distribución de tratamientos por modelo en Fase III	48
Figura 5-1: Tiempo de permanencia (s) de ratones sobre el eje rodante antes y después de la exposición a los tratamientos en diferentes dosis. La figura muestra los valores promedio \pm el ems, $p > 0.05$	55
Figura 5-2: Fracción de protección de cada uno de los tratamientos (aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, levetiracetam a 80 mg/Kg y aceite de oliva como vehículo) frente a crisis umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz.	58
Figura 5-3: Fracción de protección de cada uno de los tratamientos (aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, ácido valproico a 300 mg/Kg y aceite de oliva como vehículo) frente a crisis inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).....	62
Figura 5-4: Fracción de protección de cada uno de los tratamientos (aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, carbamazepina a 20 mg/Kg y aceite de oliva como vehículo) frente a crisis tónica inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES).....	66
Figura 5-5: Cromatograma de corriente iónica total para el aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> obtenido a través de GC-MS/EI.....	67
Figura 5-6: Cromatograma de corriente iónica total para cannabidiol obtenido a través de GC-MS/EI.	67
Figura 5-7: Cromatograma de corriente iónica total para los componentes volátiles en aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> , obtenido a través de GC-MS/EI-HC/SPME.	68
Figura 5-8: Cromatograma de corriente iónica total para los componentes volátiles en CBD aislado, obtenido a través de GC-MS/EI-HC/SPME.....	69
Figura 5-9: Cromatograma de la solución estándar de THC, CBD y CBN (100 ppm), empleando como estándar interno tetracosano, obtenido a través de GC-FID.....	70
Figura 5-10: Cromatograma de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> , obtenido a través de GC-FID.	71
Figura 5-11: Cromatograma de cannabidiol aislado, obtenido a través de GC -FID.	72

Lista de tablas

Pág.

Tabla 5-1: Resultados en segundos (s) para el modelo del Eje Rodante en los dos momentos de medición, pre y post-administración correspondientes al día 1 y día 2 respectivamente, incluyendo los valores p de cada comparación.....	53
Tabla 5-2: Porcentaje de animales protegidos para cada uno de los tratamientos evaluados y su respectiva dosis, en el modelo de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia a 6 Hz.....	55
Tabla 5-3: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 50 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.	56
Tabla 5-4: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 150 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.	57
Tabla 5-5: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 300 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.	57
Tabla 5-6: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 600 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.	58
Tabla 5-7: Porcentaje de animales protegidos para cada uno de los tratamientos evaluados y su respectiva dosis, en el modelo de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).....	59
Tabla 5-8: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 50 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado,	

con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.	60
Tabla 5-9: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 150 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.	60
Tabla 5-10: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 300 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.	60
Tabla 5-11: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 600 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.	61
Tabla 5-12: Porcentaje de animales protegidos para cada uno de los tratamientos evaluados y su respectiva dosis, en el modelo de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES).....	62
Tabla 5-13: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 50 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.	63
Tabla 5-14: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 150 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.	64
Tabla 5-15: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 300 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.	64
Tabla 5-16: Valores p de la prueba de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relacionan la dosis 600 mg/Kg de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.	64
Tabla 5-17: Datos de tiempos de retención, áreas, relación de áreas y concentraciones de CBD, THC y CBN de la solución estándar, obtenidos a través de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).	70

Tabla 5-18: Datos de tiempos de retención, áreas, relación de áreas y concentraciones de CBD, THC y CBN de aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i> , obtenidos a través de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). <i>MP: Material pesado</i>	71
Tabla 5-19: Datos de tiempos de retención, áreas, relación de áreas y concentraciones de CBD, THC y CBN de cannabidiol aislado, obtenidos a través de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). <i>MP: Material pesado</i>	72

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
AVAD	Años de Vida Ajustada por Discapacidad
CBD	Cannabidiol
CBDV	Cannabivendarina
CBN	Cannabinol
CME	Convulsión por Máximo Electrochoque
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DE ₅₀	Dosis Efectiva 50
EEG	Electroencefalograma
FS	Full Scan
GABA	Ácido g-aminobutírico
GC-FID	Cromatógrafo de Gases con Detector de Ionización de Llama
GC-MS / EI	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas / Impacto Electrónico
GC-MS/EI - HS-SPME	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas / Impacto Electrónico con automuestreador de espacio de cabeza y fibra de microextracción en fase sólida
ILAE	Liga Internacional Contra la Epilepsia
IP	Intraperitoneal
LAFUN	Laboratorio de Análisis Farmacéutico de la Universidad Nacional de Colombia
MES	Maximal Electroshock Test
MP	Material Pesado
NCC	Neurocisticercosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
PTZ	Pentilentetrazol
SRE	Solución de Referencia Externa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema Nervioso Central
SPME	Sistema de Microextracción en Fase Sólida
SRI	Solución de Referencia Interna
THC	Tetrahidrocannabinol
THCV	Tetrahidrocannabivarina
u.m.a	Unidades de masa atómica
VO	Vía Oral
2-AG	2-araquidonoilglicerol
4-AP	4-Aminopiridina

Introducción

La investigación en el campo de la farmacología del Sistema Nervioso Central (SNC) ha tomado mucho valor en razón que patologías como la epilepsia han impactado de manera considerable la carga de enfermedad a nivel mundial. Revisiones sistemáticas y metaanálisis han reportado que la incidencia anual acumulada de epilepsia ha incrementado a 61,44 por 100.000 personas al año (Fiest et al., 2017). Este valor de incidencia refleja la carga de todo el mundo con más de 50 millones de personas, donde las brechas sociales no son ajenas; ya que el 80% de estos pacientes corresponden a personas que viven en países de bajos y medianos ingresos (Beghi, 2020; Feigin et al., 2019). Colombia al pertenecer a este grupo de países hace que la investigación en esta materia sea imperativa.

Indagar en la posible actividad farmacológica de nuevas sustancias que sean efectivas y seguras para el control de crisis convulsivas permite ofrecer nuevas alternativas para mejorar la calidad de vida del paciente epiléptico, debido a que el tratamiento para esta patología en los escenarios clínicos consiste mayoritariamente en la farmacoterapia con anticonvulsivantes, y en menor medida a: cirugía o neuromodulación (Thijs et al., 2019).

Desde la disyuntiva de la farmacoterapia, principal comparador frente a las nuevas y potenciales moléculas, existen alrededor de 25 medicamentos con indicación anticonvulsivante, sin embargo, solo son eficaces en aproximadamente el 66% de los individuos que viven en países de altos ingresos (Thijs et al., 2019), y los efectos adversos clásicos de este grupo terapéutico afectan considerablemente la calidad de vida del paciente (Perucca & Gilliam, 2012). Por lo tanto, proponer y encontrar una alternativa efectiva, en el control de las crisis convulsivas, y segura a través de la reducción de eventos adversos, es un escenario muy prometedor para patologías como la epilepsia.

En reconocimiento de las premisas mencionadas con anterioridad, el objetivo central de esta investigación es evaluar los efectos de tipo anticonvulsivantes de un aceite destilado de *Cannabis yoda* en un modelo *in vivo*, a través de la comparación con medicamentos usados en las guías de práctica clínica para cada tipo de crisis; levetiracetam en crisis de bajo umbral, ácido valproico, en crisis de ausencia y mioclónicas, y carbamazepina en crisis tónico-clónicas (Giardina, 2000; Gina W et al., 2014; NICE, 2022).

Para el cumplimiento de este objetivo se hará uso de la batería de ensayos preclínicos para la evaluación farmacológica de potenciales agentes anticonvulsivantes según el tipo de crisis. Para lograr las crisis de bajo umbral y tónico-clónicas se hará uso de un estimulador eléctrico programable de precisión (*Isolated Programmable Stimulator, COULBOURN INSTRUMENTS*) induciendo un choque eléctrico al individuo, a través del uso de electrodos de contacto corneal, ajustando los protocolos que correspondan a cada crisis. Por otra parte, para las crisis mioclónicas y de ausencia se hará uso de una inyección vía subcutánea de una solución de pentilentetrazol (PTZ) marca SIGMA en agua destilada a una concentración de 8 mg/mL, debido a que la dosis efectiva de PTZ más conocida para provocar este tipo de convulsiones en el 97% de ratones evaluados es 85 mg/kg (Sills & Brodie, 2009). Adicionalmente, para reconocer el perfil fitoquímico del aceite destilado de *Cannabis yoda* se utilizarán técnicas cromatográficas; cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), para la cuantificación de tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN), y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con impacto electrónico (GC-MS/EI), para la identificación de cannabinoides diferentes a los de la cuantificación y GC-MS/EI con automuestreador de espacio de cabeza y fibra de microextracción en fase sólida (GC-MS/EI - HS-SPME) para la identificación de compuestos volátiles que estén presentes en el extracto. La identificación y cuantificación de los metabolitos presentes en el aceite destilado permitirá, reconocer los posibles responsables de la protección del individuo, y ofrecer un acercamiento a la dosis real administrada respectivamente.

Considerando que la planta de *Cannabis* tiene un amplio uso de acuerdo con reportes etnobotánicos e investigaciones preclínicas, es de esperar que el aceite destilado de la variedad colombiana *Cannabis yoda*, con un perfil fitoquímico enriquecido en cannabidiol, ofrezca una protección a los individuos frente a los estímulos que apliquen según el

ensayo. Esta hipótesis se puede argumentar a través de los múltiples blancos bioquímicos que se han elucidado para los cannabinoides, y las interacciones que estos pueden tener con moléculas anexas, conocido como efecto séquito o efecto *entourage* (E. B. Russo, 2018).

Confirmando la hipótesis establecida, se podrá aportar literatura que soporte la teoría de que los derivados de Cannabis, como un aceite destilado, son útiles como alternativa frente a las crisis convulsivas mencionadas.

Justificación

Las patologías sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) especialmente la epilepsia, representan una carga elevada en la salud pública que año tras año va en ascenso (Beghi et al., 2019; Hauser, 2019). Las líneas de tratamiento tradicional para estas patologías están orientadas al control de síntomas, que en la mayoría de los escenarios traen consigo efectos indeseados para el paciente, los cuales causan el abandono de la terapia manteniendo las cifras de carga de la enfermedad altas. La necesidad de una alternativa o coadyuvante en las terapias tradicionales, con un perfil de seguridad mayor y que permita reducir el impacto de estas patologías, hace importante la investigación en la farmacología experimental.

Han surgido opciones con un margen de seguridad hipotéticamente mayor y con un control efectivo de las crisis convulsivas, desde el punto de vista de reducción de número de crisis por periodo temporal. Por ejemplo, la dieta cetogénica, la medicina ayurvédica tradicional, la terapia de neurofeedback, el entrenamiento autogénico, la meditación, el yoga, la música, la acupuntura, la medicina tradicional china y las terapias herbales o fitoterapia han sido comúnmente conocidas por ser útiles como complemento de las terapias tradicionales (Devinsky et al., 2005; Ricotti & Delanty, 2006). Sin embargo, es necesario realizar ensayos clínicos aleatorizados, con un tamaño de muestra representativo, que permitan investigar el perfil de eficacia y seguridad de estas opciones complementarias o alternativas de la terapéutica tradicional (Asadi-Pooya et al., 2021). Dentro de las terapias herbales o fitoterapia, aprovechando la transición global por parte de los pacientes, de la medicina alopática a la natural, se han investigado y explotado el uso de diferentes plantas con fines terapéuticos, entre las que se encuentran especies de los géneros *Cannabis*, *Valeriana*, *Panax*, *Ipomoea*, *Kalanchoe*, *Ficus*, *Apium*, entre otros (Devinsky et al., 2014;

Friedman & Devinsky, 2015; Gaston & Szaflarski, 2018; Jin et al., 2019; Mora-Pérez & Hernández-Medel, 2016; Patil et al., 2011; Torres-Hernández et al., 2015; Yeung et al., 2018). En el caso del género *Cannabis* genera un gran interés, debido a su versatilidad genética en el presente, sus múltiples usos etnobotánicos reportados y el potencial farmacológico de la planta (E. Russo & Grotenhermen, 2013).

En Colombia a través de la Ley 1787 del 06 de Julio del 2016 se estableció el marco regulatorio para acceder de manera segura e informada al uso médico y científico del cannabis y sus derivados en el territorio nacional colombiano (Ley No. 1787, 2016). Esto permite que investigaciones como el presente proyecto, que analiza una genética colombiana, *Cannabis yoda*, explore con mayor seguridad su uso en patologías como la epilepsia, acotando la información relacionada con la actividad de los cannabinoides en compañía de moléculas anexas de la planta, y ofreciendo una alternativa específica para las crisis mencionadas, que puede ser argumentada desde el efecto séquito o los múltiples blancos bioquímicos sobre los cuales los cannabinoides pueden tener acción.

1. Problema Investigado

1.1 Definición del problema

¿Es comparable el efecto anticonvulsivante del aceite destilado de *Cannabis yoda* en las crisis convulsivas tónico-clónicas, mioclónicas, y de bajo umbral frente a carbamazepina, ácido valproico y levetiracetam, respectivamente? y, ¿su efecto es análogo, superior o inferior que el componente aislado, cannabidiol (CBD)?

1.2 Planteamiento del problema

La información reportada que existe en materia de derivados de *Cannabis* caracterizados o cannabinoides específicos para el tratamiento de diferentes crisis epilépticas se puede dividir en 3 grupos: 1) Informes de preparaciones tradicionales de *Cannabis* para el tratamiento de casos de epilepsia refractaria, 2) Ensayos preclínicos que involucran preparados caracterizados con tetrahidrocannabinol (THC) y CBD para crisis tónico-clónicas, mioclónicas y crisis multirresistentes. Y finalmente 3) Ensayos Clínicos Aleatorizados (ECA) de fase II y III, que concluyen que el CBD es efectivo y seguro en pacientes diagnosticados con Síndrome de Lennox-Gastaut y Síndrome de Dravet (Arzimanoglou et al., 2020; Gaston & Friedman, 2017; Golub & Reddy, 2021; O'Connell et al., 2017; Rosenberg et al., 2015).

La motivación para la realización de la investigación del aceite destilado de *Cannabis yoda* surge de la necesidad de una alternativa con un perfil de seguridad mayor que los actuales anticonvulsivantes, y mejorar los valores epidemiológicos de esta patología que en el presente impactan la salud pública en Colombia (Orozco-Hernández et al., 2019). Sin embargo, la información con la que se cuenta en la actualidad deja interrogantes a resolver; por ejemplo, en los informes de preparaciones tradicionales de *Cannabis* para epilepsia refractaria, se hace referencia a extracciones vehiculizadas que contienen un espectro de

cannabinoides muy variado, que incluso contempla moléculas anexas de la planta como terpenos y flavonoides (Arzimanoglou et al., 2020), por lo que reconocer el perfil fitoquímico del aceite destilado de *Cannabis yoda*, comprender si hay coadyuvantes en la protección frente a las crisis, y si está sustentada por efecto séquito, caracterizado por representar una nueva vía de regulación molecular de la actividad cannabinoide endógena (Ben-Shabat et al., 1998; Cogan, 2020), ofrecería valor agregado a la literatura del *Cannabis* y en especial de esta genética colombiana. Adicionalmente, los ensayos preclínicos extienden la batería de ensayos agudos a Estimulación de Máximo Electrochoque (MES) y PTZ, en dosis específicas y con solo ratas o ratones macho, por lo que brindar un intervalo de dosis amplio y administrar a machos y hembras dará la posibilidad de emitir conclusiones robustas sobre dosificación en modelos preclínicos y respuestas dependientes del sexo. Finalmente, los ensayos clínicos de fase II y III que concluyen que el CBD es efectivo para los síndromes de *Lennox Gastaut* y *Dravet*, pueden marcar una posibilidad de actividad sobre otros tipos de crisis, teniendo en cuenta los múltiples blancos bioquímicos con los cuales estas moléculas pueden interactuar (Mlost et al., 2020).

En virtud de lo anterior, optar por la investigación con el aceite destilado de *Cannabis yoda* permite aumentar las alternativas de tratamientos farmacológicos para el paciente, y enriquecer la literatura preclínica de los derivados de *Cannabis*, especialmente en lo que se refiere a genéticas colombianas.

2. Objetivos

2.1 General

Evaluar los efectos de tipo anticonvulsivantes de los metabolitos presentes en un aceite destilado de *Cannabis yoda* en un modelo *in vivo*.

2.2 Específicos

- Determinar los efectos anticonvulsivantes de un aceite destilado de *Cannabis yoda* en la prueba de convulsión inducida por máximo electrochoque (MES) para crisis tónico - clónicas.
- Determinar los efectos anticonvulsivantes de un aceite destilado de *Cannabis yoda* en la prueba de convulsión inducida por pentilentetrazol (PTZ) para crisis de ausencia y mioclónicas
- Determinar los efectos anticonvulsivantes de un aceite destilado de *Cannabis yoda* en la prueba de convulsión umbral de baja frecuencia 6 Hz para crisis refractarias.
- Reconocer el perfil fitoquímico de un aceite destilado de *Cannabis yoda* a través de técnicas cromatográficas.

3. Estado del arte

A continuación, se describen los aspectos teóricos relacionados con la epilepsia; incluyendo su epidemiología, fisiopatología, clasificación de las crisis y farmacología. De igual manera, se detallan algunos aspectos botánicos, químicos y terapéuticos del género *Cannabis*, conteniendo la información de la especie en evaluación, *Cannabis yoda*; y sus derivados, aceite destilado y cannabidiol aislado.

3.1 Epilepsia

La definición de epilepsia ha sido publicada a lo largo del tiempo por diferentes autores y entidades internacionales de la salud. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la epilepsia como una enfermedad crónica que se caracteriza por convulsiones recurrentes no provocadas, haciendo énfasis en que afecta a personas de todo el mundo y de todas las edades (Megiddo et al., 2016). Otros autores adicionan a la definición que es un trastorno del cerebro caracterizado por una predisposición persistente a generar ataques epilépticos por consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales (Abramovici & Bagić, 2016); y que su diagnóstico debería realizarse si hay al menos dos ataques reflejos o no provocados en un lapso mayor a 24 horas, un ataque reflejo con un alto riesgo de recurrencia (60% o más) y si hay diagnóstico de síndrome de epilepsia (Fisher et al., 2014; McWilliam & al Khalili, 2019). No obstante, la Liga internacional contra la epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) enuncia, en la publicación sobre las modificaciones del sistema de clasificación de la epilepsia, que solamente con un episodio convulsivo no provocado es suficiente para concluir el diagnóstico (Scheffer et al., 2017).

Las definiciones previas tienen en común que las convulsiones recurrentes no provocadas son la característica principal de la epilepsia como enfermedad. Estas son un desequilibrio parcial y transitorio de la función cerebral, consecuencia de descargas eléctricas

anormales, exacerbadas e hipersincrónicas de diferentes poblaciones de neuronas corticales (Bromfield et al., 2006). En función del lugar donde se produzcan estas descargas, son manifestadas de diferentes formas; que van desde episodios breves de ausencia con apariencia subjetiva y muchas veces difíciles de descifrar, hasta crisis convulsivas bastante evidentes por las contracciones musculares fuertes, que pueden ser duraderas y de mal pronóstico (Lowenstein, 2018).

3.1.1 Clasificación de la epilepsia

La ILAE estableció un nuevo sistema operacional de clasificación para las convulsiones recurrentes y epilepsias basado en características clínicas claves, hallazgos en los electroencefalogramas (EEG), estudios de imágenes y factores genéticos. Se enfatizó en tres niveles que abarcan todas las posibles variables de un paciente con epilepsia. En el primer nivel se deben establecer los tipos de crisis, debido a que son el punto de partida para orientar el diagnóstico de epilepsia. Este nivel de clasificación está establecido de acuerdo con el origen de la crisis epiléptica; focal, generalizada o de inicio desconocido. Se debe enunciar que es posible que en algunos casos este nivel sea el máximo obtenido para la clasificación, debido a que no se encuentra con la suficiente información o no hay acceso a EEG, grabaciones de video o estudios con imágenes (Fisher et al., 2017).

El segundo nivel hace referencia al tipo de epilepsia. En función del tipo de crisis y los resultados del EEG se establecieron los tipos de epilepsia de la siguiente manera (Fisher et al., 2014):

- Epilepsia generalizada, cuando hay evidencia de descargas interictales fácilmente reconocibles en el EEG, acompañada de diferentes tipos de crisis, tales como mioclónicas, atónicas, tónicas, tónico-clónicas y de ausencia.
- Epilepsias focales, que pueden ser trastornos unifocales y multifocales, además de crisis que afectan solamente un hemisferio, acompañada de diferentes tipos de crisis, tales como, crisis focales con pérdida de la conciencia, crisis focales con afectación de la conciencia, crisis focales motoras, crisis focales no motoras y crisis bilaterales tónico-clónicas.

- Epilepsia desconocida, que se establece cuando no se tiene la información necesaria, suficiente y concluyente para establecer otro tipo de epilepsia.
- Por último, en esta clasificación se adiciona un grupo nuevo que corresponde a las epilepsias combinadas generalizadas y focales, ya que se tiene evidencia de pacientes que presentan un híbrido de estas dos. El EEG para estos pacientes muestra descargas generalizadas de punta-onda y también descargas focales epileptiformes. Ejemplos de síndromes que tienen lugar con esta descripción son el de *Dravet* y el de *Lennox-Gastaut*.

Finalmente, el tercer nivel corresponde al diagnóstico del síndrome de epilepsia, que hace referencia al conjunto de signos y síntomas que incorporan tipos de crisis, EEG y características de diagnóstico por imágenes que se presentan al mismo tiempo (Fisher et al., 2017; Pack, 2019). Teniendo los tres niveles bien definidos es posible clasificar las convulsiones y epilepsias con un fundamento científico sólido.

3.1.2 Epidemiología de la epilepsia

El estudio de esta enfermedad toma alta importancia debido a que las cifras epidemiológicas evidencian el alto impacto que tiene la enfermedad sobre la población, tanto en el territorio colombiano como en el mundo entero.

El último reporte de la OMS declara que esta patología representa el 0.5% de la carga de morbilidad mundial (Organización Mundial de la Salud, 2022). Teniendo aproximadamente, 70 millones de personas con diagnóstico de epilepsia y cerca del 90% pertenecen a países en vía de desarrollo. En adición, en el ámbito global, anualmente se diagnostican cerca de 2.4 millones de personas con epilepsia, empero, llama la atención que en países de altos ingresos económicos los nuevos casos anuales corresponden entre 30 y 50 por cada 100.000 habitantes, mientras que en países de bajos y medianos ingresos esta cifra puede ascender al doble (Ngugi et al., 2010).

Lo anterior se explica porque se aumenta el riesgo de contraer la enfermedad en condiciones endémicas, por ejemplo, malaria o neurocisticercosis (NCC) (A. Singh & Trevick, 2016) enfermedades clásicas de países tropicales en vía de desarrollo, y la existencia de predisposiciones psicológicas y sociales que favorecen la aparición de estas crisis (Abramovici & Bagić, 2016).

Este comportamiento epidemiológico también se ve reflejado a través de la tasa de años de vida ajustada por discapacidad (AVAD) de la epilepsia, donde el impacto en los países subdesarrollados y expuestos a condiciones endémicas es mayor que en aquellos con un nivel de desarrollo alto (Abramovici & Bagić, 2016) contemplando los traumas posteriores a las crisis, los eventos adversos clásicos de este grupo farmacológico y el deterioro cognitivo secuela del *status epilepticus* (Orozco-Hernández et al., 2019).

En Colombia, esta situación no es ajena, al ser un país tropical y estar en vía de desarrollo presenta cifras de prevalencia e incidencia mayores en relación con países desarrollados. El Ministerio de Salud y Protección social en cooperación con el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) realizó un estudio donde encontró que el 1.3% de la población colombiana está diagnosticada con epilepsia, siendo el 0.8% de las causas de mortalidad en el territorio, recomendando establecer políticas de salud pública para reducir la incidencia (Ministerio de Salud y Protección Social, 2017). En soporte a esto, se encontró el primer estudio documentado de prevalencia de epilepsia en Colombia realizado en 1974 por el Instituto Neurológico de Bogotá, en el cual describen una prevalencia de 19.5 por cada 1000 pacientes, con una diferenciación marcada hacia el sexo femenino en relación con el masculino, con valores de 22.9 por cada 1000 y 15.1 por cada 100, respectivamente (Carrizosa Moog, 2007; Espinosa Jovel et al., 2016; Gómez et al., 1978). Luego de 32 años se publicó otro estudio que enuncia cifras similares y establece una diferenciación de acuerdo con regiones del territorio nacional. Describe que la tasa de prevalencia general de la epilepsia en Colombia es 11.3 por cada 1000, y la prevalencia local para las diferentes regiones oscila entre 7 y 23 por cada 1000. Estos valores no representaron una diferencia significativa entre regiones a excepción del oriente del país, donde la prevalencia es mayor (Velez & Eslava-Cobos, 2006).

En lo que respecta al sexo, se cree que hay una diferencia en la incidencia de convulsiones sintomáticas agudas para hombres y mujeres en el mundo. Específicamente, los hombres presentan una tasa de incidencia mayor respecto a las mujeres relacionado a una mayor preponderancia de conductas de riesgo junto con una mayor incidencia de lesiones cerebrales traumáticas (Savic, 2014). Sin embargo, la información sobre las diferencias de género en la epileptogénesis es muy limitada e imposibilita generar una conclusión contundente.

Respecto a la edad, la mayoría de los estudios concluyen que la epilepsia tiene una distribución de incidencia de edad con dos picos característicos. El primero corresponde a los primeros años de vida, donde la incidencia de complicaciones perinatales, infecciones y epilepsia relacionada con defectos congénitos influye en la etiología de la enfermedad. Y el segundo, corresponde a la sexta década de vida, donde la incidencia de epilepsia comienza a aumentar de nuevo, debido a que hay un alza en el número de patologías que causan epilepsia secundaria, por ejemplo, enfermedades cerebrovasculares (Abramovici & Bagić, 2016; Stephen & Brodie, 2000).

3.1.3 Fisiopatología de la epilepsia

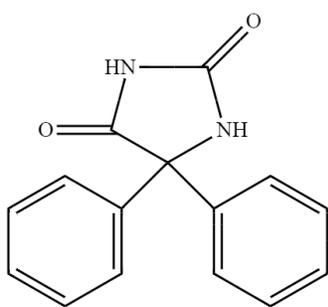
Las crisis epilépticas, caracterizadas por ser espontáneas y no provocadas son resultado de un desequilibrio eléctrico entre la actividad excitatoria e inhibitoria de células neuronales. De modo que, la actividad de la red neuronal se puede volver en algunos casos excesiva, hipersincrónica y oscilatoria, que cuando se mantiene, interrumpe el procesamiento neuronal normal y es capaz de perturbar otras redes neuronales. En el caso de las crisis generalizadas, se conoce que las redes epileptógenas están ampliamente distribuidas, implicando a las estructuras talamocorticales de forma bilateral, y en el caso de las crisis focales, las redes implican a los circuitos neuronales de un hemisferio, normalmente límbico o neocortical. El desequilibrio entre la excitación y la inhibición mencionado previamente no está relacionado exclusivamente con un aumento de la excitación o una pérdida de la inhibición, también existe una correlación con un aumento inusual de la inhibición que puede conducir a episodios pro-epileptógenos en las crisis de ausencia, o las crisis límbicas. En adición, estudios preclínicos e imágenes diagnósticas evidencian que este desequilibrio se ve reflejado principalmente en la corteza cerebral a través de la actividad de las células corticales. Sin embargo, también se ha encontrado esta alteración en células gliales y axones de la sustancia blanca, lo que permite hacer un diagnóstico más específico.

El desequilibrio eléctrico es causado máxime por alteraciones estructurales a nivel del cerebro, estados de sepsis generalizada y alteraciones metabólicas. En niños, la etiología de los episodios convulsivos está orientada a factores genéticos, malformaciones del desarrollo cortical y daños debidos a insultos perinatales. En adultos sin ningún tipo de predisposición genética a la epilepsia, se incluyen causas como encefalitis o meningitis, lesión traumática en el cerebro y tumores de localización cerebral. Y en pacientes de la

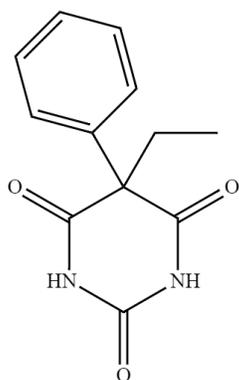
tercera edad, las crisis convulsivas son resultado principalmente de trastornos neurodegenerativos, traumas en la cabeza y tumores cerebrales. Sin embargo, estudios han concluido que, en la etiología de la enfermedad, tanto como para niños y adultos, el origen desconocido es el más frecuente en los escenarios de diagnóstico, seguido por daños estructurales, factores genéticos, agentes infecciosos y finalmente con un porcentaje muy bajo, las diferentes alteraciones metabólicas (Amin & Ali, 2019; Falco-Walter, 2020; Morai & Díazii, 2017; Rosenberg et al., 2015).

3.1.4 Farmacología de la epilepsia

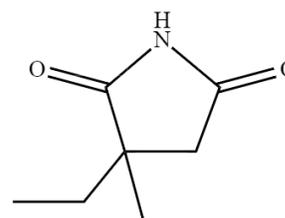
Los tratamientos para esta patología, en el escenario clínico, consisten mayoritariamente en la farmacoterapia con anticonvulsivantes, y en menor medida: cirugía o neuromodulación. La farmacoterapia está orientada principalmente al control sintomático a través de medicamentos anticonvulsivantes, ya que no hay tratamiento profiláctico ni cura efectiva disponible. Los anticonvulsivantes llegaron en 1938 con la fenitoína sódica y la seguida era de los anticonvulsivantes de síntesis (Joshi et al., 2013); estos se pueden clasificar en hidantoínas, barbitúricos, iminoestilbenos, succinimidias, ácido valproico, benzodiazepinas y otros, como aquellos que no son posibles de clasificar dentro de las otras categorías. Las estructuras químicas de los principales anticonvulsivantes se encuentran en la **Figura 3-1**.



Difenilhidantoína



Fenobarbital



Etosuximida

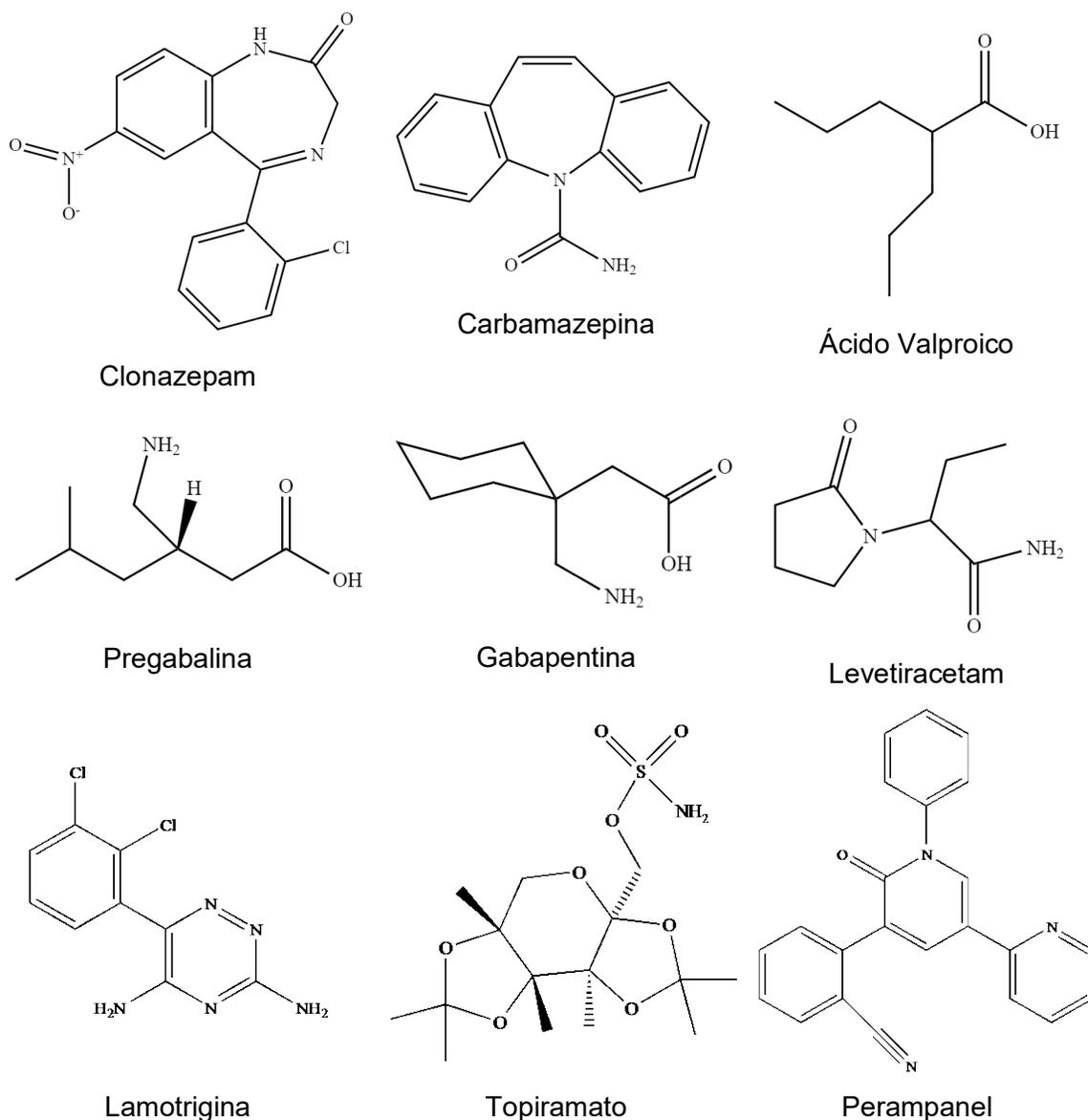


Figura 3-1: Estructuras de los principales anticonvulsivantes usados en la farmacoterapia de la epilepsia

A continuación, se da una breve descripción de los principales medicamentos empleados para el tratamiento de la epilepsia.

- Hidantoínas: El difenilhidantoínato, también llamada fenitoína, es eficaz contra todos los tipos de convulsiones a excepción de las crisis de ausencia.
- Barbitúricos: El fenobarbital es eficaz contra las convulsiones tonicoclónicas y parciales generalizadas. Es muy usado por su eficacia, baja toxicidad y costo. Sin embargo, por sus efectos secundarios como sedación y modulación del comportamiento en niños se ha considerado sustituirlo por otras alternativas.

- Iminoestilbenos: La carbamazepina es el fármaco de primera elección en contra de las convulsiones generalizadas, tonicoclónicas, y parciales simples y complejas. Adicionalmente, existe la oxcarbazepina que es un análogo ceto de la carbamazepina, tratándose del profármaco que se biotransforma inmediatamente al metabolito activo principal.
- Succinimidias: La etosuximida es eficaz principalmente para el tratamiento de las crisis de ausencia, pero no contra las convulsiones tonicoclónicas.
- Ácido valproico: El valproato es un fármaco de amplio espectro utilizado en el tratamiento de las crisis de ausencia y de convulsiones mioclónicas, principalmente.
- Benzodiacepinas: Estos fármacos se utilizan principalmente con fines sedantes o ansiolíticos. Ejemplos de algunos de ellos que poseen propiedades anticonvulsivantes son el clonazepam, el diazepam y el lorazepam. El clonazepam es útil para el tratamiento de las crisis de ausencia, y convulsiones mioclónicas principalmente en infantes. El diazepam es eficaz para el tratamiento del *status epilepticus*. Sin embargo, por su corto tiempo de acción se ha recurrido al reemplazo por lorazepam.
- Otros: La gabapentina y la pregabalina son fármacos eficaces contra las convulsiones parciales. También son usadas en adición a otros anticonvulsivantes cuando las convulsiones están acompañadas de una generalización secundaria. Adicionalmente, se ha aprobado por diferentes entidades sanitarias del mundo el uso de pregabalina para el dolor neuropático que surge en lesiones de la médula espinal (Smith et al., 2019).

Los principales mecanismos de acción por los cuales los anticonvulsivantes actúan para inhibir las convulsiones son: modulación de canales de sodio, potasio y calcio, mejora de la neurotransmisión de ácido g-aminobutírico (GABA por sus siglas en inglés) a través de efectos sobre los receptores de GABA, modulación de la liberación sináptica por medio de la proteína vesicular sináptica 5V2A, y la disminución de la excitación sináptica mediada por receptores ionotrópicos de glutamato (Porter et al., 2012).

El anticonvulsivante ideal eliminaría la posibilidad de cualquier crisis epiléptica sin causar ningún efecto adverso. Sin embargo, la mayoría de estos traen consigo efectos indeseados

para el paciente que pueden variar desde la alteración mínima del Sistema Nervioso Central (SNC) hasta la muerte (Smith et al., 2019)

3.2 Genero *Cannabis*

3.2.1 Descripción botánica

Para el género *Cannabis* se han desarrollado diferentes variedades a lo largo de tiempo, producto de la cría, la selección y las mutaciones realizadas por los cultivadores. Sin embargo, las variedades obtenidas por estos medios crean muchos debates sobre una clasificación botánica adicional. Por lo tanto, en aras de una armonización, oficialmente se reconocen tres especies dentro del género: *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* Lam. y *Cannabis ruderalis*, ya que están bien diferenciadas en sus características botánicas y su perfil fitoquímico, y comparten que son de distribución cosmopolita (Farag & Kayser, 2017).

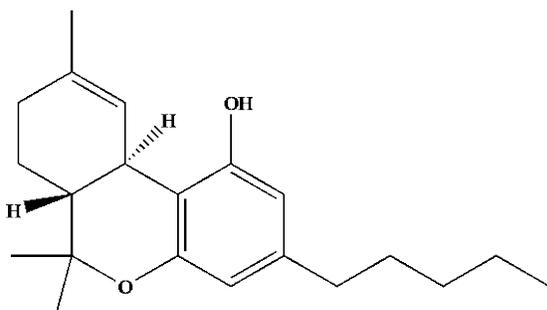
Cannabis sativa L. fue descrita en 1753 por Carl Linnaeus. Caracterizándose por tener un tallo rígido y erecto que proporciona una altura aproximada de 4 metros. Su raíz primaria es de color verde oscuro y de aspecto áspero. Sus hojas inferiores son opuestas, palmeadas que poseen un peciolo largo y tienen una estipula rectiforme. La mayoría de ellas presentan de 5 a 7 folíolos con ápice agudo y márgenes serrados. Las hojas superiores son alternas, también con bordes serrados, pero menos desarrollado que el de las hojas inferiores. Es una planta dioica y sus inflorescencias son axilares en las hojas superiores, aunque también pueden ubicarse en la terminación de la rama (Cote et al., 2015; Linnaeus, 1753).

La genética *Cannabis yoda*, denominada de esta manera por el titular de la genética, usada en la presente investigación, conserva las mismas características botánicas de la especie *Cannabis sativa* L. Por consiguiente, la descripción botánica que se precisa en el párrafo anterior aplica de igual manera para la variedad de *Cannabis yoda*, confirmada por los propietarios de su registro Investment and Ideas S.A.S.

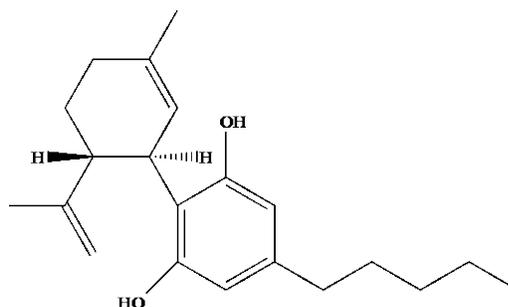
3.2.2 Química de la planta

La composición química general y la distribución de las moléculas en el género *Cannabis* se ha estudiado de manera profunda a lo largo del tiempo. Diferentes autores reportan que hay aproximadamente un total de 500 sustancias químicas en la planta de las cuales la

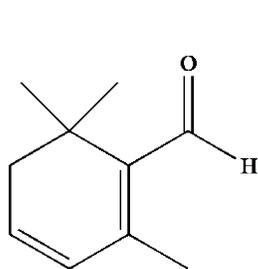
fracción mayoritaria corresponde a terpenos con un total de 120 conocidos, posteriormente los cannabinoides con un total de 104 y luego varios grupos de compuestos en menor número como flavonoides, estilbenos, alcaloides, amidas fenólicas y lignanamidas (Figura 3-2). Así como aminoácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, pigmentos, proteínas, glicoproteínas, enzimas (E. Russo & Grotenhermen, 2013). Los cannabinoides son los metabolitos que se encuentran en mayor abundancia en la planta y resultan importantes por ser estructuras propias y exclusivas de este género. De los aproximadamente 104 cannabinoides conocidos, los más estudiados son tetrahidrocannabinol (THC) y cannabidiol (CBD) ya que se encuentran en una proporción alta con relación a los demás, y presentan una elevada afinidad por el sistema cannabinoide endógeno, lo que permite pensar en su uso al momento de la búsqueda de moléculas bioactivas. Hoy en día se encuentran publicados diferentes artículos que le atribuyen a las moléculas enunciadas previamente una gran cantidad de efectos biológicos y farmacológicos (Atakan, 2012; López et al., 2014; Mechoulam, 1982; B. F. Thomas & ElSohly, 2016).



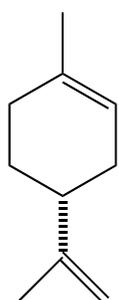
Tetrahidrocannabinol (THC)



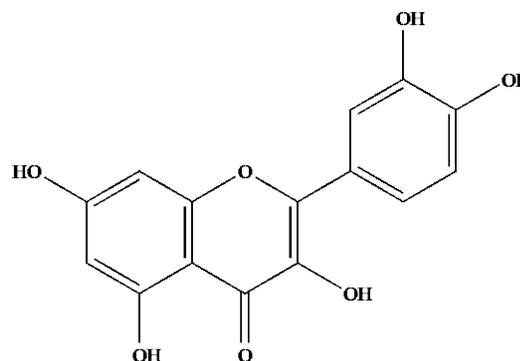
Cannabidiol (CBD)



Safranal



Limoneno



Quercetina

Figura 3-2: Estructuras de algunos compuestos mayoritarios presentes en el género *Cannabis*

3.2.3 Propiedades biológicas y farmacológicas del género *Cannabis*

Las hojas y flores del género *Cannabis* han sido utilizadas en forma de preparaciones artesanales como agente terapéutico de múltiples afecciones desde hace mucho tiempo. De hace más de 5000 años data el primer reporte del uso de *Cannabis* como agente terapéutico, donde en textos chinos del emperador Chen Nung declaran su uso para el tratamiento efectivo de malaria, estreñimiento, dolor reumático y analgesia durante el parto. Asimismo, usos terapéuticos similares se encontraron para esta planta en textos egipcios e indios de hace aproximadamente 3000 años. No obstante, solo hasta el inicio de los 90's se pudo comenzar a estudiar cada una de estas actividades reportadas, como consecuencia de la elucidación de la forma cristalina de los primeros receptores del sistema endocannabinoide, CB1 y CB2, y su cadena de segundos mensajeros.

Diversas investigaciones posteriores al reconocimiento del sistema endocannabinoide confirman las propiedades farmacológicas y biológicas de los metabolitos presentes en este género. Se ha evaluado y confirmado la actividad anticonvulsivante de los cannabinoides THC y CBD en crisis específicas, que a pesar de no ser los únicos presentes en la planta son los más estudiados por su preponderancia relativa en relación con los demás (López et al., 2014; Mechoulam et al., 2007; Mechoulam & Hanuš, 2002). Extractos complejos de *Cannabis* han sido evaluados en modelos preclínicos de *screening* durante la pasada y presente década, permitiendo confirmar diferentes actividades terapéuticas que pueden tener efecto a nivel clínico; como por ejemplo el tratamiento del dolor crónico en adultos, las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia, espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple, trastornos del sueño, fibromialgia, trastornos de ansiedad, anorexia nerviosa, estimulación del apetito, síndrome de *Tourette*, trastorno por consumo de opioides, la reversión de la resistencia a medicamentos en carcinoma de células colorrectales en modelo *in vivo* y epilepsia (Blair et al., 2015; Karler & Turkanis, 1980; Knupp et al., 2019; Mangoato et al., 2019; Wallace et al., 2001, 2002).

La mayoría de las investigaciones están acotadas a los cannabinoides por ser las fitomoléculas que generan mayor interés al ser exclusivas de la familia Cannabaceae. Sin embargo, el género *Cannabis* no es solamente valioso a nivel terapéutico por los cannabinoides enunciados, también se han reportado estudios que mencionan otro tipo de metabolitos presentes en la planta. Por ejemplo, los terpenos, moléculas mayoritarias de la planta, encargados de brindar el olor y el sabor a esta, son farmacológicamente activos y tienen efectos de potenciación junto con los cannabinoides, conocido como efecto séquito, revelando que su actividad conjunta potencia los efectos terapéuticos relacionados con el dolor, inflamación, depresión, ansiedad, cáncer, e infecciones fúngicas y bacterianas (Hartsel et al., 2016; Rosenberg et al., 2015). Por otro lado, los flavonoides, moléculas ricas en grupos hidroxilo -OH, principalmente la canflavina A y la canflavina B han mostrado actividad farmacológica a través de la inhibición de la síntesis de prostaglandina E. Sin embargo, otros autores afirman que regulan la actividad de los cannabinoides al igual que los terpenos, actuando como un sinergismo o un antagonismo (Burstein et al., 1973; Pellati et al., 2018). También se ha reportado la presencia de compuestos nitrogenados como los alcaloides, no obstante, al encontrarse en concentraciones muy bajas su evaluación farmacológica se ha dificultado. Finalmente, los estilbenoides, compuestos de suma importancia en lo que concierne a la defensa de la planta, han reportado actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antineoplásica, neuroprotectora y antioxidante (Atakan, 2012; López et al., 2014).

Hoy en día, como resultado de investigaciones preclínicas y clínicas, se ha podido concluir el uso de cannabinoides y derivados sintéticos como principios activos para el tratamiento de múltiples afecciones, aprobados por diversas agencias sanitarias del mundo. Por ejemplo, la Nabilona y el Dronabinol, análogos sintéticos del THC, están aprobados para el tratamiento de las náuseas y vomito inducidas por quimioterapia, y para el tratamiento de la anorexia en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Una combinación 1:1 de THC y CBD, está indicada para el tratamiento coadyuvante de síntomas en pacientes diagnosticados con espasticidad moderada a grave debido a esclerosis múltiple. Una solución de 100mg/mL de CBD está indicada para el tratamiento de la epilepsia refractaria, y capsulas de 100 mg de CBD están indicadas para el tratamiento coadyuvante de las convulsiones asociadas con el Síndrome de *Lennox-*

Gastaut y Síndrome de *Dravet* en pacientes infantiles (FDA, 2019; Golub & Reddy, 2021; INVIMA, 2022).

3.2.4 Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide es conocido como el conjunto de elementos compuesto por cannabinoides endógenos, (N-araquidoniletanolamina y 2-araquidonilglicerol), receptores cannabinoides (CB1R y CB2R) y las 5 enzimas responsables de la síntesis y degradación de endocannabinoides, N-acil-fosfatidil-etanolamina-fosfolipasa D selectiva, diacilglicerol lipasas α y β , ácido graso amida hidrolasa y monoacilglicerol lipasa. Este complejo sistema de señalización molecular transmembrana fue descubierto en 1988 por Allyn Howlett y W.A. Devane quienes a través del descubrimiento del receptor de membrana al cual se ligaba el THC, pudieron acuñarle su nombre (di Marzo & Piscitelli, 2015; Lowe et al., 2021; Mackie, 2008).

El sistema endocannabinoide está inmerso en múltiples procesos fisiológicos a partir de las múltiples señalizaciones moleculares en las que participa y las reacciones en cadena que genera, como lo son la homeostasis, los trastornos del ánimo y de la alimentación, la neurogénesis, la neuroprotección, la cognición, el aprendizaje, entre otros. Adicionalmente, muchos de los componentes de este sistema están ampliamente distribuidos por todo el cuerpo y son protagonistas en la fisiopatología de muchos tipos de enfermedades. Razón por la cual ha despertado un amplio interés para la terapéutica de varias enfermedades desde dos ópticas principalmente; la primera, reconociendo los fitocannabinoides como potenciales agentes terapéuticos en muchas dianas terapéuticas, y la segunda, ofreciendo oportunidades prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos basados en cannabinoides, denominados fármacos cannabimiméticos, que a través de su interacción con receptores del sistema endocannabinoide permitan mediar una respuesta terapéutica (Lowe et al., 2021; Lu & Mackie, 2021).

Por otra parte, recientemente se ha evidenciado que los endocannabinoides no solo activan los receptores propios de este sistema, también interactúan con canales iónicos y otros receptores acoplados a proteína G, quienes están involucrados en los mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades; aumentando su interés en la investigación en farmacología (Lowe et al., 2021).

En el contexto de la epilepsia, el sistema endocannabinoide toma alta relevancia, principalmente en las crisis refractarias, para los cuales es bien conocida las propiedades anticonvulsivantes de fitocannabinoides como CBD, CBG, CBDV y THC, principalmente el CBD y la CBDV quienes a partir de la activación del receptor CB1R eluden los efectos psicotrópicos característicos del THC, prometiendo ser candidatos a alternativas o complementos de los fármacos anticonvulsivantes utilizados en el presente (Lowe et al., 2021).

3.2.5 *Cannabis yoda*

Cannabis yoda es una variedad genética que corresponde a una semilla registrada frente al Instituto Colombiano Agropecuario con número de inscripción CANN-19-0123 bajo la titularidad de Investment and Ideas S.A.S. Esta genética es cultivada y procesada como flor seca en La Dorada – Caldas con zonas de adaptación en todo el valle geográfico del río Magdalena. Está registrada dentro de la categoría de “No psicoactivo”, lo que la hace candidata para una extracción enriquecida en cannabidiol. Importante, teniendo en cuenta que la patología a evaluar tiene soporte bibliográfico relacionado con esta molécula.

En la presente investigación se evalúa un derivado de esta genética que corresponde a un aceite destilado, el cual posterior a procesos continuos de separación vía destilación a alto vacío permite la concentración de metabolitos de interés, fitocannabinoides y compuestos de tipo isoprenoide. Este aceite se caracteriza por ser un líquido oleoso translucido de color dorado el cual conserva un olor herbal característico, debido a la conservación de los compuestos volátiles en el entramado graso de la matriz.

No existen investigaciones preclínicas o clínicas vinculadas con la evaluación de esta genética, y los procesos de transformación de la flor seca están protegidos por acuerdos de confidencialidad establecidos por el titular de la genética.

4. Materiales y métodos

En la presente investigación se evaluó la actividad anticonvulsivante de un aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol, caracterizados a través de técnicas cromatográficas, versus un patrón según el tipo de crisis. Para estos fines se usó un grupo de 160 ratones CD1, 80 machos y 80 hembras con un peso entre 25 y 30 g y de 9 a 10 semanas de edad, seleccionados del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

4.1 Materiales y Reactivos

4.1.1 Sustancias

Aceite destilado de *Cannabis yoda* suministrado por Cannagold S.A.S

Cannabidiol aislado 95% suministrado por Cannagold S.A.S.

Pentilentetrazol (PTZ) Marca SIGMA a una concentración de 8 mg/mL en agua destilada

Depakene® (ácido valproico) 250 mg / 5mL – Jarabe – Abbott

Keppra® (levetiracetam) 100 mg / mL – Solución oral – GSK

Tegretol® (carbamazepina) 2g / 100 mL– Suspensión – Novartis

Solución salina normal (cloruro de sodio) 0.9% – Baxter

Gel de alta conductividad (Electrolyte Gel-Microlyte®)

Aceite de oliva extra virgen – Castell de Ferro

Agua destilada

Etanol 98%

4.1.2 Equipos

Eje rodante (ROTA – ROD / RS, Panlab HARVARD APPARATUS)

Estimulador Eléctrico Programable de Precisión, (Isolated Programmable Stimulator, COULBOURN INSTRUMENTS)

Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) SHIMADZU™ GC 2010 Plus con automuestreador SHIMADZU AOC-20i

Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas con impacto electrónico (GC-MS/EI) TRACE 1300 (Thermo Scientific) y automuestreador híbrido HTA2800T con inyección líquida, de espacio de cabeza (HS) y con fibra para microextracción en fase sólida (SPME), material de adsorción PDMS (polidimetilsiloxano) con divencil benceno (DVB) tamaño de partícula 65 µm

Ultrasonido Elma LC 30 H

Agitador Vórtex V-1 plus BOECO Germany

Centrifuga Hettich - Mikro 120

4.1.3 Otros

Jeringas de 1 mL

Cánula de acceso gástrico para ratón

Jeringa Tuberculina Desechable 1 mL x 25G x 5/8 " (0.5 x 16mm) Luer Slip

Guantes de Nitrilo

Papel absorbente

Vasos de precipitados de 100, 250 y 500 mL – Schott Duran

Agitador de vidrio

Micropipetas (Brand Transferpette 20 – 200 µL y 100 – 1000 µL)

Microespátula

Software Chromeleon 7.0 para equipo GC-MS/EI y HS-SPME

Software Labsolutions version 5.92 para equipo GC-FID

Software Realtime Analysis

Software GraphPad – Prism 9

Software RStudio

4.2 Parte farmacológica

4.2.1 Animales de laboratorio

Para los modelos de crisis de bajo umbral, crisis mioclónicas, y crisis de ausencia y mioclónicas se utilizaron 160 ratones CD1, entre machos y hembras con un peso entre 25 y 30 g y de 9 a 10 semanas de edad. Estos fueron puestos a disposición, con previo aval ético, por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Previo al sometimiento de los individuos al estímulo correspondiente a cada crisis, estos fueron acondicionados a ciclos de luz – oscuridad de 12 h, temperatura de 18 a 25°C y comida y agua *ad libitum*. Solamente el día previo a la administración de las sustancias de interés y los patrones se sometió a un ayuno de 8 h.

Los procedimientos realizados contemplaron integralmente los principios éticos que reposan en la Ley N° 84 de 1989 “*Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales*”, principalmente los artículos 23, 24, 25 y 26, y lo establecido por la resolución 008430 de 1993 “*Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud*”, en el título V, artículo 87 al 94. La presente investigación no fue ejecutada sin antes recibir el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Al término de cada modelo experimental, los animales fueron sacrificados sin dolor a través de exposición prolongada a CO₂ con cámara hermética y fueron dispuestos de acuerdo con el manejo de residuos de la Universidad Nacional de Colombia del programa de gestión ambiental, en bolsas rojas rotuladas para material biológico.

4.2.2 Procedimiento del modelo del eje rodante

Este modelo se llevó a cabo sobre un instrumento de eje rodante (ROTA – ROD / RS, Panlab HARVARD APPARATUS), que consta de un cilindro de 2.5 cm de diámetro programado para girar a 10 rpm. El instrumento cuenta con 5 espacios separados con discos atravesados por la mitad con el eje. Este eje se encuentra a una distancia de 25 cm de altura de una plataforma. El fundamento de la prueba se basa en el tiempo que el ratón dura sobre el eje rodante, ya que al momento en el que cae sobre la plataforma el contador se detiene y graba los tiempos individuales. Este modelo se realiza para determinar si las sustancias en evaluación generan cambios significativos en la movilidad de los animales, ya sea por inducción de sedación o relajación muscular. Adicionalmente, estos resultados son útiles para evaluar la posible neurotoxicidad de las sustancias en evaluación (Mann & Chesselet, 2015).

El modelo se desarrolló en las siguientes tres etapas:

- Etapa I: Día de entrenamiento de los animales para mantener el equilibrio en el eje rodante por al menos un minuto a una frecuencia de giro de 10 rpm. En esta etapa no se consideran los tiempos de permanencia de los individuos como resultados, debido a que corresponde a una fase de entrenamiento.
- Etapa II: Posterior al día de entrenamiento, previo a la administración de las sustancias a evaluar, los animales fueron puestos sobre el eje y se registraron los tiempos de permanencia. Permitiendo tres oportunidades de reposición para cada animal.
- Etapa III: Posterior a la administración, exactamente una hora después de ella, los animales se colocaron sobre el eje y se registraron los tiempos de permanencia. Permitiendo tres oportunidades de reposición para cada animal.

4.2.3 Procedimiento de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz

Este modelo se ejecutó utilizando un estimulador eléctrico programable de precisión, (Isolated Programmable Stimulator, COULBOURN INSTRUMENTS) acoplado a un par de

electrodos córneos, al igual que en la prueba descrita anteriormente. Sin embargo, para el modelo de convulsión umbral se modificaron los siguientes parámetros: frecuencia de 6 Hz, corriente constante de 32 mA y retardo de pulso de 1000 μ s, número de pulsos 2, duración del primer y segundo pulso de 200 μ s.

Una hora antes del inicio del ensayo y con ayuno de 8 horas, les fue administrado a cada uno de los individuos alguno de los tratamientos según al grupo al que hayan sido asignados: aceite destilado de *Cannabis yoda* a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, cannabidiol a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, levetiracetam a 80 mg/Kg (Zagaja et al., 2022) y aceite de oliva como vehículo. Se preparó el equipo para operación con el protocolo descrito previamente. Posteriormente, se extendió sobre los electrodos córneos cantidad suficiente de gel de alta conductividad. Luego, se inmovilizó el animal garantizando que se encontrara en posición prono. Finalmente, se puso en contacto el par de electrodos con la córnea del individuo para la realización de la descarga. Se mantuvo el estímulo durante 3 segundos e inmediatamente después de culminado el tiempo se liberó al animal. Los resultados del modelo se basaron en el criterio de protección, es decir, si el ratón presentaba o no una crisis de bajo umbral o refractaria; caracterizada por erección de los bigotes, estiramiento de los miembros superiores, movimientos armónicos de la cabeza y fenómeno de *Straub*, posterior a la convulsión el ratón entra en etapa de recuperación evidenciado por actitudes exploratorias del lugar (Laura C. Ruíz & Cesar G. Girón, 2022).

4.2.4 Procedimiento de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ)

Este modelo se llevó a cabo utilizando una solución de PTZ marca SIGMA en agua destilada a una concentración de 8 mg/ml debido a que la dosis efectiva de PTZ más conocida para provocar este tipo de convulsiones en el 97% de ratones evaluados es 85 mg/kg (Sills & Brodie, 2009). Una hora antes del inicio del ensayo y con ayuno de 8 horas, les fue administrado VO a cada uno de los individuos alguno de los tratamientos según al grupo al que hayan sido asignados: aceite destilado de *Cannabis yoda* a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, cannabidiol a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, ácido valproico a 300 mg/Kg (Alachkar et al., 2020; T. Singh et al., 2021) y aceite de oliva como vehículo. Se administró la solución de PTZ vía subcutánea en la región interauricular del animal. Posteriormente se liberó el animal en un campo libre de 50 x 50 cm durante 30 minutos para observación, tiempo

suficiente para que el PTZ haga su efecto. Los resultados del modelo se basaron en el criterio de protección, es decir, si el ratón presentaba o no una crisis mioclónica; que se caracteriza por presencia de sacudidas generalizadas en la mayoría de los casos (Alachkar et al., 2020; T. Singh et al., 2021), y crisis localizadas.

4.2.5 Procedimiento de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES)

Este modelo se llevó a cabo utilizando un estimulador eléctrico programable de precisión, (Isolated Programmable Stimulator, COULBOURN INSTRUMENTS) acoplado a un par de electrodos córneos. Se establecieron los siguientes parámetros estableciendo los siguientes parámetros: frecuencia de 60 Hz, corriente constante de 50 mA, retardo de pulso de 1000 μ s, 2 pulsos rectangulares de 83 ms, primer pulso positivo, segundo pulso negativo y 2 ciclos necesarios para lograr una crisis tónica (van Vliet & Gorter, 2017).

Una hora antes del inicio del ensayo y con ayuno de 8 horas, les fue administrado a cada uno de los individuos alguno de los tratamientos según al grupo al que hayan sido asignados: aceite destilado de *Cannabis yoda* a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, cannabidiol a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, carbamazepina a 20 mg/Kg (Enna, 1998) y aceite de oliva como vehículo. Se preparó el equipo para operación con el protocolo descrito previamente. Posteriormente, se extendió sobre los electrodos córneos cantidad suficiente de gel de alta conductividad. Luego, se inmovilizó el animal garantizando que se encontrará en posición prono. Finalmente, se puso en contacto el par de electrodos con la córnea del individuo para la realización de la descarga e inmediatamente después del estímulo se liberó al animal. Los resultados del modelo se basaron en el criterio de protección, es decir, si el ratón presentaba o no una crisis tónica; que se evidencia por el estiramiento de los miembros posteriores (Castel-Branco et al., 2009).

4.2.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos fueron desarrollados secuencialmente en tres fases bien diferenciadas para las cuales los individuos se distribuyeron por tratamientos de la siguiente manera.

- **Fase I:** Se utilizaron 72 individuos aleatoriamente seleccionados para la prueba del eje rodante, realizada antes de las pruebas de la batería preclínica de epilepsia, ya que permite detectar posibles efectos neurotóxicos agudos de las sustancias a evaluar. Se dividieron en grupos de 6 animales por tratamiento, considerando machos y hembras aleatoriamente seleccionados: aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol en cada dosis 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, carbamazepina a 20 mg/Kg, ácido valproico a 300 mg/Kg, levetiracetam a 80 mg/Kg, y aceite de oliva como vehículo o control negativo (**Figura 4-1**).
- **Fase II:** Se distribuyeron aleatoriamente 120 ratones macho y hembras en grupos de 40 para cada modelo de evaluación. Se asignaron 10 individuos por sustancia a evaluar de la siguiente manera: 10 para aceite destilado de *Cannabis yoda* a 50 mg/Kg, 10 para cannabidiol 50 mg/Kg, 10 para el vehículo (aceite de oliva) y 10 para la sustancia patrón según modelo. Para el modelo de convulsión umbral de baja frecuencia a 6 Hz para crisis refractarias el patrón fue levetiracetam a 80 mg/Kg, para el modelo de máximo electrochoque (MES) para crisis tónico – clónicas fue carbamazepina a 20 mg/Kg y para el modelo de convulsión inducida por pentilentetrazol (PTZ) para crisis de ausencia y mioclónicas el patrón fue ácido valproico a 300 mg/Kg (**Figura 4-1**).
- **Fase III:** Se utilizaron 40 ratones macho y hembras para completar la evaluación de las dosis restantes del aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol: 150, 300 y 600 mg/Kg. Se empezó con el modelo menos agresivo, que corresponde al de convulsión umbral a baja frecuencia a 6 Hz, seguido del modelo de convulsión inducida por PTZ y finalmente el modelo de máximo electrochoque (MES). Para todos los ensayos se asignaron 10 individuos para la dosis de aceite destilado de *Cannabis yoda*, 10 para la dosis de cannabidiol, 10 para el patrón según modelo y 10 para el vehículo. Entre cada uno de los modelos por dosis se dejaron reponer a los individuos del estímulo y descansar durante una semana para el sometimiento a la nueva administración y estímulo (**Figura 4-2**).

Respecto al análisis estadístico se utilizaron varias pruebas estadísticas según la naturaleza de los resultados y las variables de cada modelo. Se despreció el sexo de los individuos ya que, a pesar de tener el tamaño de muestra dividido equitativamente por machos y hembras, se seleccionaron aleatoriamente para su participación en cada modelo. En el eje rodante se utilizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas,

comparando los tiempos pre y post administración, verificando los supuestos para su uso. El primero, la ausencia de valores extremos o *outliers* y el segundo, normalidad a través de la realización de la prueba de Shapiro cuyo valor p fue mayor que 0.05, indicando distribución normal de los datos. Para el modelo de convulsión inducida por máximo electrochoque (MES), por pentilentetrazol (PTZ) y de bajo umbral se utilizó la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de Kruskal Wallis de diferencia entre tratamientos, para cada una de las dosis administradas (50, 150, 300 y 600 mg/Kg) de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado versus el control negativo y el patrón que corresponde según tipo de crisis. Para cada uno de estos modelos se determinó como resultado el criterio de protección que varía según la respuesta de los animales de laboratorio al estímulo correspondiente de cada tipo de crisis, descritos en el apartado de resultados.

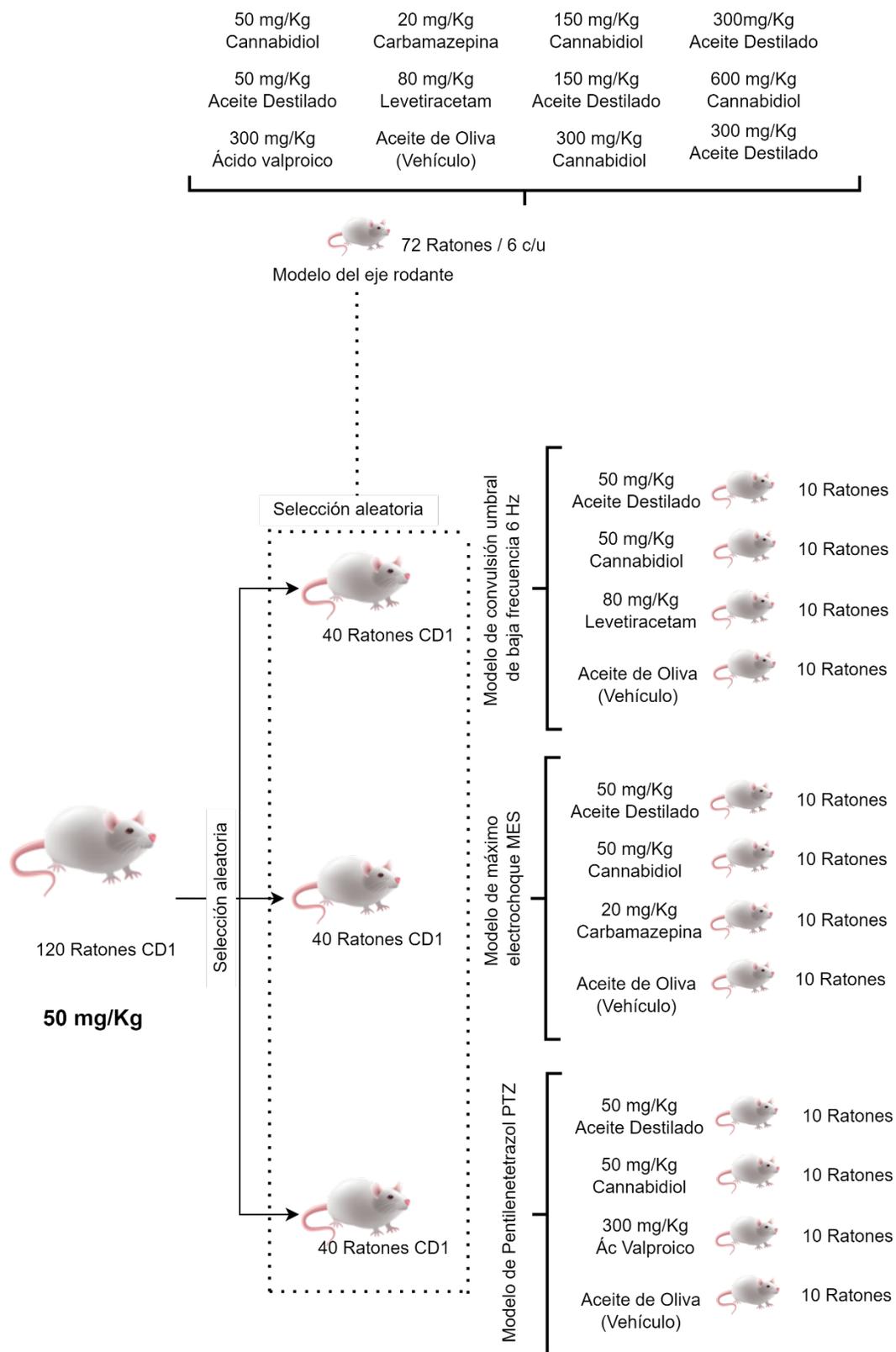


Figura 4-1: Esquema de distribución de tratamientos por modelo en Fase I y Fase II

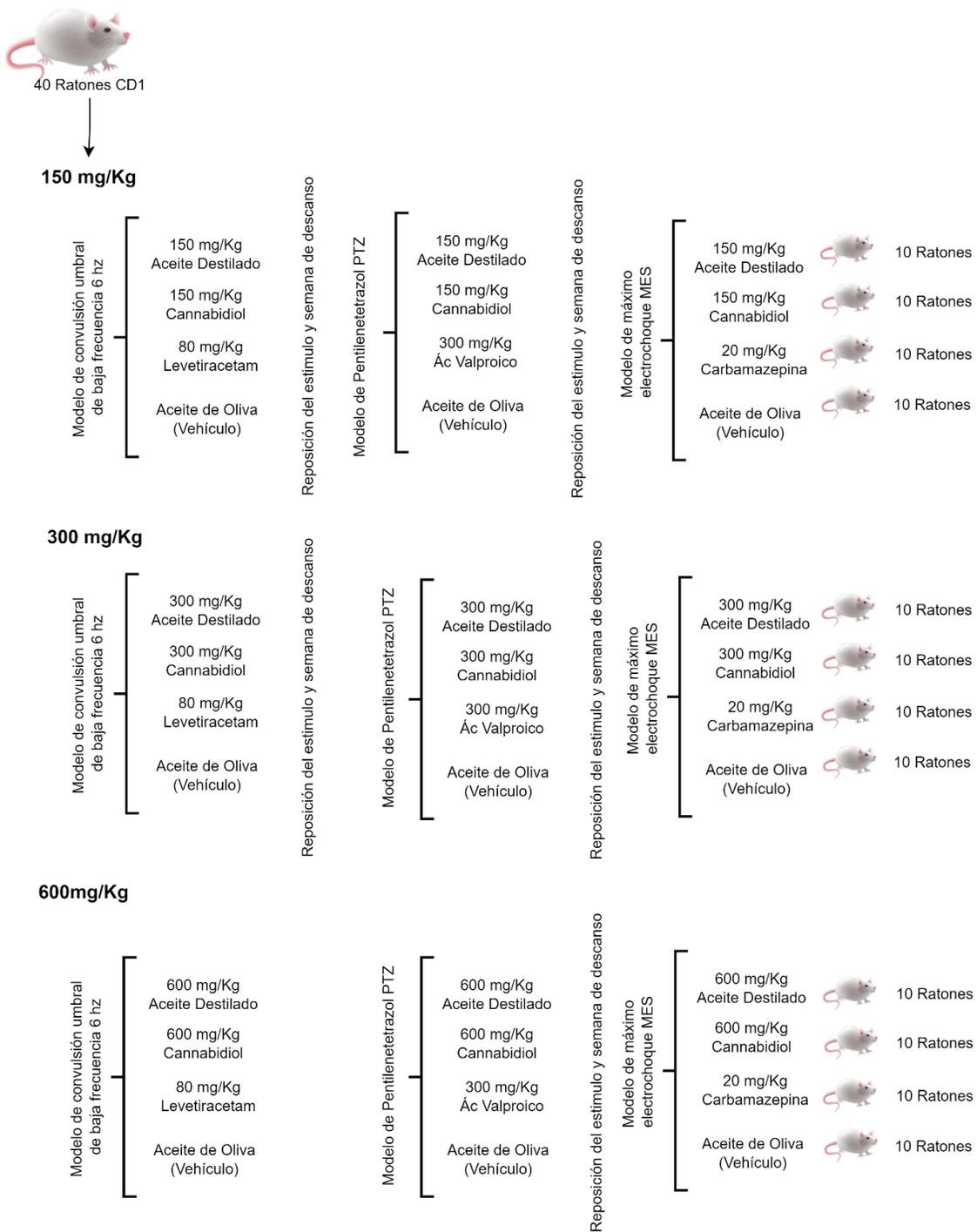


Figura 4-2: Esquema de distribución de tratamientos por modelo en Fase III

4.3 Parte analítica

4.3.1 Procedimiento de identificación y cuantificación de componentes de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado a través de técnicas cromatográficas

4.3.1.1 Identificación de cannabinoides por GC-MS/EI

Preparación de la muestra: para la identificación de cannabinoides en el aceite destilado y en el cannabidiol se realizó el siguiente proceso secuencial por duplicado, adaptado de las metodologías analíticas validadas del Laboratorio de Análisis Farmacéutico de la Universidad Nacional de Colombia (LAFUN): En vial Eppendorf® se pesaron aproximadamente 50 mg de la sustancia a evaluar (aceite destilado de *Cannabis yoda* o cannabidiol aislado). Posteriormente se agregaron 2 ml de etanol al 96 %. El vial se cerró y se sometió a agitación en vórtex durante 1 minuto con posterior ultrasonido durante 5 minutos. Finalmente, el extracto se centrifugó a 9000 rpm durante al menos 5 minutos. Del sobrenadante se tomaron 50 µL y se transfirieron a un vial de cromatografía con inserto de 200 y se completó a volumen con de etanol al 96%. De esta solución se inyectó 1 µL en el cromatógrafo.

Condiciones cromatográficas: El cromatógrafo empleado fue un GC-MS Trace 1300 de Thermo Scientific™, con detector ISQ QD de la misma marca. El automuestreador HTA2800T fue operado en el módulo para líquidos con jeringa de 10 µL. La columna cromatográfica empleada fue una TR-5MS (30 m x 0.25 mm de diámetro interior, 0.25 µm de espesor de película) marca Thermo Scientific™ a un flujo de 1 mL/min empleando como gas portador helio. Las condiciones de operación empleadas fueron: Temperatura del inyector 290 °C, operado en modo split 10:1. La temperatura del horno fue de 40°C por 1 min. Posteriormente se empleó una rampa de temperatura de 25°C/min hasta 170°C. Luego se incrementa la temperatura a una tasa de 15°C/ min 300°C por 10 minutos. La temperatura del detector y la línea de transferencia fueron 230°C y 270 °C, respectivamente. El espectrofotómetro de masas fue operado en modo full scan en un rango de masas de 50 a 500 u.m.a empleando como técnica de ionización EI a 70 eV.

4.3.1.2 Identificación de terpenos por GC-MS/EI-HS-SPME

Preparación de la muestra: En un vial de HS con capacidad de 20 mL se colocaron 200 mg del aceite destilado de *Cannabis yoda*. Inmediatamente el vial fue sellado con cepta y agrafe asegurando que no se presentaran fugas. Posteriormente el vial se sometió a calentamiento durante 10 minutos a 60°C. Luego se inyecta el vial con el dispositivo de SPME y se expone la fibra durante 3 minutos en el HS a la misma temperatura para permitir la desorción de los analitos. Culminado este tiempo se retira el dispositivo y se inyecta de manera manual en el GC-MS/EI dejando la fibra expuesta en el puerto de inyección 1 minuto para favorecer la desorción de los analitos extraídos. El mismo procedimiento fue realizado con el CBD aislado.

Condiciones cromatográficas: El equipo empleado fue el mismo del numeral 4.3.1.1 sin automuestreador con inyección manual SPME bajo las siguientes condiciones: La columna cromatográfica empleada fue una TR-5MS (30 m x 0.25 mm de diámetro interior, 0.25 µm de espesor de película) marca Thermo Scientific™ a un flujo de 1 mL/min empleando como gas portador helio. Las condiciones de operación empleadas fueron: Temperatura del inyector 270 °C, operado en modo split 20:1. La temperatura del horno fue de 40°C por 1 min. Posteriormente se empleó una rampa de temperatura de 5°C/min hasta 280°C por 3 min. La temperatura del detector y la línea de transferencia fueron 230°C y 270 °C, respectivamente. El espectrofotómetro de masas fue operado en modo full scan en un rango de masas de 50 a 500 u.m.a empleando como técnica de ionización EI a 70 eV. Las condiciones cromatográficas fueron operadas empleando el software Chromeleon™ 7 versión 7.2.10 y la identificación de los cannabinoides fueron hechas con la librería NIST versión 20 del año 2020.

4.3.1.3 Cuantificación de THC, CBD y CBN por GC-FID

Preparación de la muestra: Para la cuantificación de THC, CBD y CBN en el Aceite Destilado de *Cannabis yoda* y Cannabidiol aislado, se utilizaron dos soluciones de referencia: una externa (SRE), y otra interna (SRI) descritas en la metodología analítica validada para *Cannabis* del Laboratorio (LAFUN). Para la primera se utilizó una ampolla con una mezcla de THC al 98,1%, CBD al 99,3 % y CBN al 99,3%, de 1 mg/mL a la cual se le tomaría una alícuota de 0.5 mL y se completaría con 0.75 mL de etanol en un vial

de 2.0 mL para cromatografía. Se ha realizado dicho procedimiento con el fin de tener una solución madre de SRE a una concentración final de estándares de 400 ppm (THC, CBD y CBN).

Por otro lado, para la preparación de la SRI, se pesaron 10 mg de tetracosano al 99% en un balón aforado de 25 mL y se completó a volumen con 25 mL de Etanol. Se llevó el balón aforado a ultrasonido seguido de agitación en vórtex durante 15 minutos cada uno para garantizar la solución.

Con las dos soluciones listas, SRE y SRI, se preparó el control para la cuantificación; este consistía en una mezcla de ambas soluciones de referencia preparadas de la siguiente manera. Se tomaron 50 μ L de la solución madre de SRE y se transfirió a un vial de cromatografía con inserto, al cual se le adicionaron 30 μ L de SRI y 120 μ L de Etanol para obtener una concentración final de estándares de 100 ppm (THC, CBD y CBN).

Para la preparación de la muestra a analizar, aceite destilado de Cannabis yoda y cannabidiol aislado, se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado de identificación a través de GC-MS/EI. Sin embargo, una vez culminado el proceso de centrifugación a 9000 rpm durante al menos 5 minutos, se tomó una alícuota del sobrenadante, se depositó en un vial para cromatografía con inserto debidamente marcado, al cual se le adicionaron 30 μ L de la solución SRI y 120 μ L de Etanol.

Teniendo los viales para cromatografía listos, se dispusieron para proceder con las inyecciones. Iniciando con una inyección de 1 μ L de Etanol al 96%, seguido de 1 μ L del control y finalmente 1 μ L de la muestra a analizar por duplicado, purgando entre inyección con 1 μ L de etanol. La cuantificación se logró utilizando los estándares descritos con anterioridad a una concentración de 100 ppm.

Condiciones cromatográficas: El cromatógrafo empleado fue un GC-FID SHIMADZU GC 2010 Plus con detector de ionización de llama y un automuestreador Shimadzu AOC-20i operado en el módulo para líquidos con jeringa de 10 μ L. La columna cromatográfica empleada fue una RTX®-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) con una proporción 95/5 de dimetilpolisiloxano y difenil a un flujo de 1 mL/min empleando como gas portador helio. Las condiciones de operación empleadas fueron: Temperatura del inyector 300 °C, operado en modo split 10:1. La temperatura del horno fue de 200°C

por 2 min. Posteriormente se empleó una rampa de temperatura de 10°C/min hasta 260°C por 6 min. La temperatura del detector fue de 290. Las condiciones cromatográficas fueron operadas empleando el software LabSolutions versión 5.92.

5. Resultados

En los siguientes apartados se presentan los resultados para las pruebas farmacológicas elaboradas en ratones, y se describen los cromatogramas de cada técnica cromatográfica, identificación y cuantificación, de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo anterior.

5.1 Parte farmacológica

5.1.1 Resultados del procedimiento del modelo del eje rodante

En el modelo del eje rodante se determinó como resultado el tiempo promedio que permanece el individuo sobre el eje a 10 rpm en dos momentos diferentes, por 6 repeticiones cada uno. El primer momento se midió sin la administración de alguna sustancia, y el segundo con la administración de las sustancias una hora antes de la prueba. Se realizó con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre los dos momentos.

En la **Tabla 5-1** se presentan los resultados diferenciados por los dos momentos de medición y los errores estándar asociados a cada una de las medidas para cada momento.

Tabla 5-1: Resultados en segundos (s) para el modelo del Eje Rodante en los dos momentos de medición, pre y post-administración correspondientes al día 1 y día 2 respectivamente, incluyendo los valores p de cada comparación.

Tratamiento	Día 1 (s)	Error Estándar Día 1	Día 2 (s)	Error estándar Día 2	Valor p (ANOVA test)
Aceite destilado 50 mg/Kg	33.7	1.97	36.2	2.48	F (1, 5) = 2.953 p = 0.146
Aceite destilado 150 mg/Kg	34.3	1.21	33.5	1.05	F (1, 5) = 3.049 p = 0.141

Aceite destilado 300 mg/Kg	31.7	1.21	31	1.41	F (1, 5) = 1.429 p = 0.286
Aceite destilado 600 mg/Kg	31.5	1.05	31.8	1.17	F (1, 5) = 0.625 p = 0.465
Cannabidiol 50 mg/Kg	31.3	3.5	30	2.37	F (1, 5) = 1.600 p = 0.262
Cannabidiol 150 mg/Kg	32.3	1.21	32.5	1.87	F (1, 5) = 0.065 p = 0.809
Cannabidiol 300 mg/Kg	32	1.55	32.5	1.05	F (1, 5) = 0.556 p = 0.490
Cannabidiol 600 mg/Kg	32	1.26	31.8	0.983	F (1, 5) = 0.056 p = 0.822
Levetiracetam 80 mg/Kg	33.2	2.32	32	1.67	F (1, 5) = 3.182 p = 0.135
Carbamazepina 20 mg/Kg	29	0.894	29.8	0.983	F (1, 5) = 1.404 p = 0.289
Ácido valproico 300 mg/Kg	30.3	1.75	28.8	2.48	F (1, 5) = 0.918 p = 0.382
Aceite de oliva (Vehículo)	32	2.37	30.7	2.5	F (1, 5) = 2.500 p = 0.175

Para concluir si existen diferencias significativas entre las medidas para cada una de las sustancias administradas, se utilizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas verificando los supuestos para su uso. El primero, la ausencia de valores extremos o *outliers* y el segundo, normalidad a través de la realización de la prueba de Shapiro cuyo valor p fue mayor que 0.05.

La prueba de ANOVA de medidas repetidas arrojó valores $p > 0.05$ permitiendo no rechazar la hipótesis nula, asociada a que no existen diferencias significativas entre los tiempos tomados pre (día 1) y post-administración (día 2).

Por último, en la **Figura 5-1**, se evidencia gráficamente los promedios obtenidos para cada medición pre y post-administración por tratamiento.

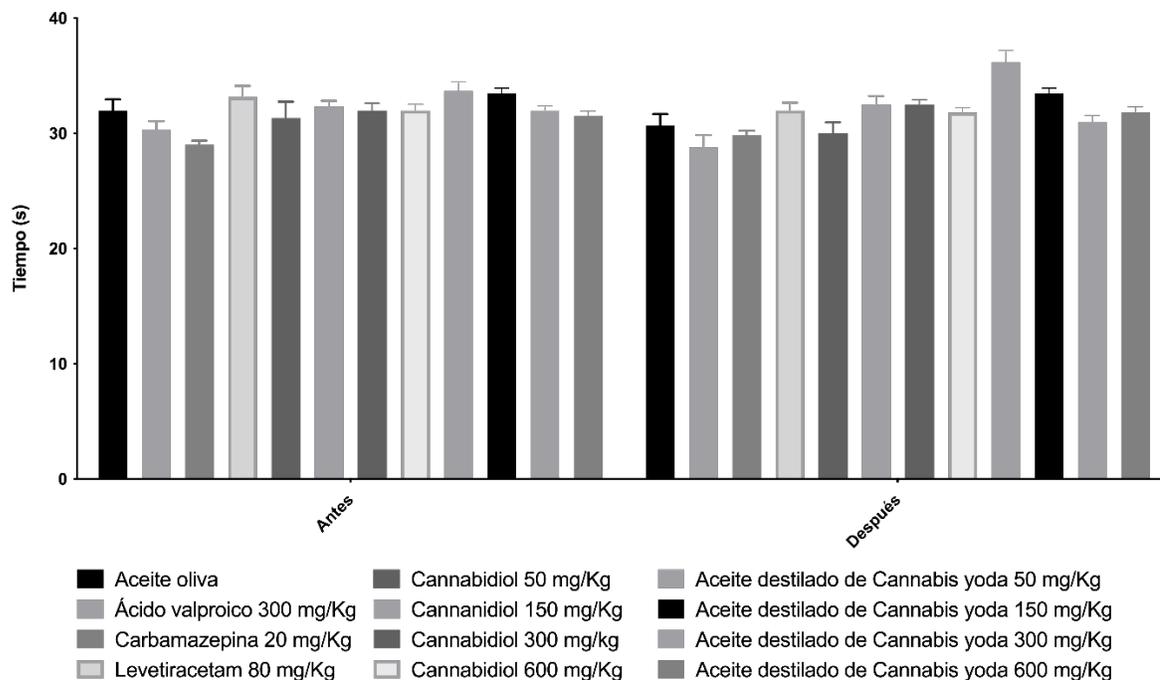


Figura 5-1: Tiempo de permanencia (s) de ratones sobre el eje rodante antes y después de la exposición a los tratamientos en diferentes dosis. La figura muestra los valores promedio \pm el ems, $p > 0.05$

5.1.2 Resultados del procedimiento de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz

En el modelo de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia a 6 Hz se determinó como resultado el criterio de protección, es decir, si el ratón presentaba o no una crisis de bajo umbral; caracterizada por erección de los bigotes, estiramiento de los miembros superiores, movimientos armónicos de la cabeza y fenómeno de *Straub*, según el protocolo descrito en el apartado de metodología. Si el individuo presentaba una o más de estas características en ese orden se podría considerar como desprotegido.

En la **Tabla 5-2** se presentan los resultados del número de individuos protegidos por cada dosis administrada de tratamiento, con el respectivo porcentaje de protección

Tabla 5-2: Porcentaje de animales protegidos para cada uno de los tratamientos evaluados y su respectiva dosis, en el modelo de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia a 6 Hz

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	No. Animales con convulsión de bajo umbral/Total de animales	% de Animales protegidos
Aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i>	50	1/10	90
	150	2/10	80
	300	1/10	90
	600	0/10	100
Cannabidiol aislado	50	4/10	60
	150	6/10	40
	300	7/10	30
	600	2/10	80
Levetiracetam	80	0/10	100
Aceite de oliva	-	10/10	0

Adicionalmente, en la **Tabla 5-3, 5-4, 5-5 y 5-6** se presentan los valores p obtenidos a partir de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de Kruskal Wallis de diferencia entre tratamientos, para cada una de las dosis administradas (50, 150, 300 y 600 mg/Kg) de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol Aislado. Para las cuales se resalta con un asterisco en rojo los tratamientos comparados para los cuales, si existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Parámetro fundamental al momento de comparar una sustancia con potencial actividad farmacológica versus un patrón, que en este caso corresponde a levetiracetam a 80 mg/Kg.

Tabla 5-3: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 50 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon * ($p < 0.05$) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 50 mg/Kg	Levetiracetam 80 mg/Kg	Cannabidiol 50 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 50 mg/Kg	-	0.36812	0.28878	*0.00048
Levetiracetam 80 mg/Kg	0.36812	-	0.10077	*0.000096
Cannabidiol 50 mg/Kg	0.28878	0.10077	-	*0.02006
Aceite de oliva (Vehículo)	*0.00048	*0.000096	*0.02006	-

p = 0.0000135; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-4: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 150 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones *post-hoc* de **Mann Whitney Wilcoxon** *(p < 0.05) diferencia significativa

Tratamientos	Aceite destilado 150 mg/Kg	Levetiracetam 80 mg/Kg	Cannabidiol 150 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 150 mg/Kg	-	0.1675	0.1655	*0.0022
Levetiracetam 80 mg/Kg	0.1675	-	*0.0201	*0.000096
Cannabidiol 150 mg/Kg	0.1655	*0.0201	-	0.1008
Aceite de oliva (Vehículo)	*0.0022	*0.000096	0.1008	-

p = 0.00003595; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-5: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 300 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones *post-hoc* de **Mann Whitney Wilcoxon** *(p < 0.05) diferencia significativa

Tratamientos	Aceite destilado 300 mg/Kg	Levetiracetam 80 mg/Kg	Cannabidiol 300 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 300 mg/Kg	-	0.36812	*0.02601	*0.00048
Levetiracetam 80 mg/Kg	0.36812	-	*0.00647	*0.000096
Cannabidiol 300 mg/Kg	*0.02601	*0.00647	-	0.15343
Aceite de oliva (Vehículo)	*0.00048	*0.000096	0.15343	-

p = 0.000005393; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-6: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 600 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón levetiracetam a 80 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon * ($p < 0.05$) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 600 mg/Kg	Levetiracetam 80 mg/Kg	Cannabidiol 600 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 600 mg/Kg	-	-	0.3350	*0.00008
Levetiracetam 80 mg/Kg	-	-	0.3350	*0.00008
Cannabidiol 600 mg/Kg	0.3350	0.3350	-	*0.0013
Aceite de oliva (Vehículo)	*0.00008	*0.00008	*0.0013	-

$p = 0.0000006443$; $p < 0.05$ SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Finalmente, se presenta la **Figura 5-2** que evidencia una comparativa entre los distintos tratamientos a diferentes dosis con su respectivo factor de protección.

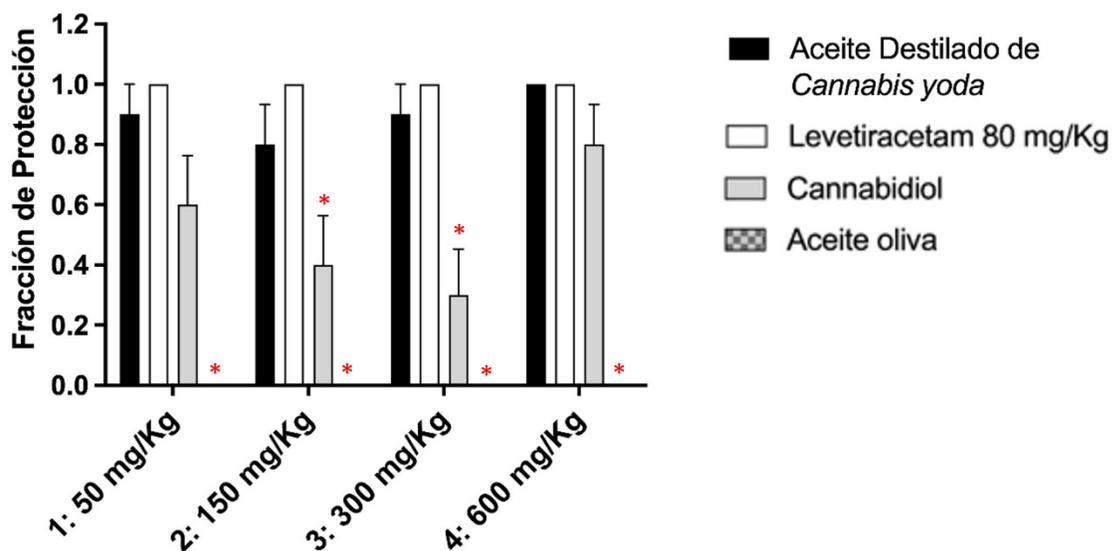


Figura 5-2: Fracción de protección de cada uno de los tratamientos (aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, levetiracetam a 80 mg/Kg y aceite de oliva como vehículo) frente a crisis umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz.

5.1.3 Resultados del procedimiento de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ)

En el modelo de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ) se determinó como resultado el criterio de protección, es decir, si el ratón presentaba o no una crisis mioclónica; caracterizada por sacudidas generalizadas, según el protocolo descrito en el apartado de metodología.

En la **Tabla 5-7** se presentan los resultados del número de individuos protegidos por cada dosis administrada de tratamiento, con el respectivo porcentaje de protección.

Tabla 5-7: Porcentaje de animales protegidos para cada uno de los tratamientos evaluados y su respectiva dosis, en el modelo de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	No. Animales con convulsión mioclónica/Total de animales	% de Animales protegidos
Aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i>	50	6/10	40
	150	3/10	70
	300	4/10	60
	600	6/10	40
Cannabidiol aislado	50	4/10	60
	150	1/10	90
	300	4/10	60
	600	4/10	60
Acido valproico	300	0/10	100
Aceite de oliva	-	10/10	0

Adicionalmente, en la **Tabla 5-8**, **5-9**, **5-10** y **5-11** se presentan los valores p obtenidos a partir de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de Kruskal Wallis de diferencia entre tratamientos, para cada una de las dosis administradas (50, 150, 300 y 600 mg/Kg) de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado. Para las cuales se resalta con un asterisco en rojo los tratamientos comparados para los cuales, si existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Parámetro fundamental al momento de comparar una sustancia con potencial actividad farmacológica versus un patrón, que en este caso corresponde a ácido valproico a 300 mg/Kg.

Tabla 5-8: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 50 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon *(p < 0.05) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 50 mg/Kg	Ácido valproico 300 mg/Kg	Cannabidiol 50 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 50 mg/Kg	-	*0.025	0.408	0.101
Ácido valproico 300 mg/Kg	*0.025	-	0.101	*0.000096
Cannabidiol 50 mg/Kg	0.408	0.101	-	*0.025
Aceite de oliva (Vehículo)	0.101	*0.000096	*0.025	-

p = 0.0001485; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-9: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 150 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon *(p < 0.05) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 150 mg/Kg	Ácido valproico 300 mg/Kg	Cannabidiol 150 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 150 mg/Kg	-	0.23015	0.60112	*0.00647
Ácido valproico 300 mg/Kg	0.23015	-	0.60112	*0.000096
Cannabidiol 150 mg/Kg	0.60112	0.60112	-	*0.00048
Aceite de oliva (Vehículo)	*0.00647	*0.000096	*0.00048	-

p = 0.000008903; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-10: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la

dosis 300 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones *post-hoc* de **Mann Whitney Wilcoxon** * ($p < 0.05$) diferencia significativa

Tratamientos	Aceite destilado 300 mg/Kg	Ácido valproico 300 mg/Kg	Cannabidiol 300 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 300 mg/Kg	-	0.101	-	*0.025
Ácido valproico 300 mg/Kg	0.101	-	0.101	*0.000096
Cannabidiol 300 mg/Kg	-	0.101	-	*0.025
Aceite de oliva (Vehículo)	*0.025	*0.000096	*0.025	-

$p = 0.0001625$; $p < 0.05$ SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-11: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 600 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón ácido valproico a 300 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones *post-hoc* de **Mann Whitney Wilcoxon** * ($p < 0.05$) diferencia significativa

Tratamientos	Aceite destilado 600 mg/Kg	Ácido valproico 300 mg/Kg	Cannabidiol 600 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 600 mg/Kg	-	*0.025	0.408	0.101
Ácido valproico 300 mg/Kg	*0.025	-	0.101	*0.000096
Cannabidiol 600 mg/Kg	0.408	0.101	-	*0.025
Aceite de oliva (Vehículo)	0.101	*0.000096	*0.025	-

$p = 0.0001485$; $p < 0.05$ SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Finalmente, se presenta la **Figura 5-3** que evidencia una comparativa entre los distintos tratamientos a diferentes dosis con su respectivo factor de protección.

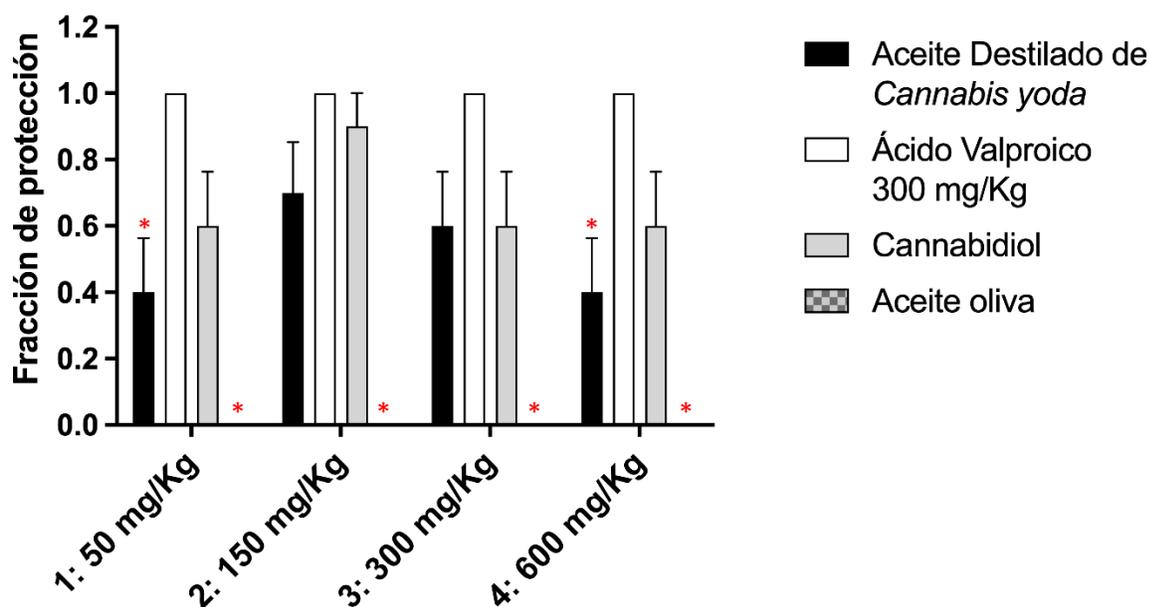


Figura 5-3: Fracción de protección de cada uno de los tratamientos (aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, ácido valproico a 300 mg/Kg y aceite de oliva como vehículo) frente a crisis inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ).

5.1.4 Resultados del procedimiento de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES)

En el modelo de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES) se determinó como resultado el criterio de protección, es decir, si el ratón presentaba o no una crisis tónica; que se evidencia por el estiramiento de los miembros posteriores, según el protocolo descrito en el apartado de metodología.

En la **Tabla 5-12** se presentan los resultados del número de individuos protegidos por cada dosis administrada de tratamiento, con el respectivo porcentaje de protección,

Tabla 5-12: Porcentaje de animales protegidos para cada uno de los tratamientos evaluados y su respectiva dosis, en el modelo de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES)

Tratamiento	Dosis (mg/Kg)	No. Animales con convulsión tónica/Total de animales	% de Animales protegidos
	50	9/10	10
	150	8/10	20

Aceite destilado de <i>Cannabis yoda</i>	300	9/10	10
	600	8/10	20
Cannabidiol aislado	50	7/10	30
	150	6/10	40
	300	6/10	40
	600	6/10	40
Carbamazepina	20	0/10	100
Aceite de oliva	-	10/10	0

Adicionalmente, en la **Tabla 5-13, 5-14, 5-15 y 5-16** se presentan los valores p obtenidos a partir de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de Kruskal Wallis de diferencia entre tratamientos, para cada una de las dosis administradas (50, 150, 300 y 600 mg/Kg) de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado. Para las cuales se resalta con un asterisco en rojo los tratamientos comparados para los cuales, si existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Parámetro fundamental al momento de comparar una sustancia con potencial actividad farmacológica versus un patrón, que en este caso corresponde a carbamazepina a 20 mg/Kg.

Tabla 5-13: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 50 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon *($p < 0.05$) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 50 mg/Kg	Carbamazepina 20 mg/Kg	Cannabidiol 50 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 50 mg/Kg	-	*0.00048	0.60112	0.60112
Carbamazepina 20 mg/Kg	*0.00048	-	*0.00647	*0.000096
Cannabidiol 50 mg/Kg	0.60112	*0.00647	-	0.23015
Aceite de oliva (Vehículo)	0.60112	*0.000096	0.23015	-

p = 0.000008903; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-14: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 150 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon *(p < 0.05) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 150 mg/Kg	Carbamazepina 20 mg/Kg	Cannabidiol 150 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 150 mg/Kg	-	*0.0022	0.28878	0.335
Carbamazepina 20 mg/Kg	*0.0022	-	*0.0201	*0.000096
Cannabidiol 150 mg/Kg	0.3662	*0.0201	-	0.1008
Aceite de oliva (Vehículo)	0.335	*0.000096	0.1008	-

p = 0.00004553; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-15: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relaciona la dosis 300 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones <i>post-hoc</i> de Mann Whitney Wilcoxon *(p < 0.05) diferencia significativa				
Tratamientos	Aceite destilado 300 mg/Kg	Carbamazepina 20 mg/Kg	Cannabidiol 300 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 300 mg/Kg	-	*0.00048	0.28878	0.36812
Carbamazepina 20 mg/Kg	*0.00048	-	*0.02006	*0.000096
Cannabidiol 300 mg/Kg	0.28878	*0.02006	-	0.10077
Aceite de oliva (Vehículo)	0.36812	*0.000096	0.10077	-

p = 0.0000135; p < 0.05 SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Tabla 5-16: Valores p de la prueba de comparaciones *post-hoc* de Mann Whitney Wilcoxon y la prueba de diferencia significativa entre tratamientos de Kruskal-Wallis que relacionan

la dosis 600 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, con el aceite de oliva como blanco, con el patrón carbamazepina a 20 mg/Kg y entre ellos.

Valores p de comparaciones *post-hoc* de **Mann Whitney Wilcoxon** * ($p < 0.05$) diferencia significativa

Tratamientos	Aceite destilado 600 mg/Kg	Carbamazepina 20 mg/Kg	Cannabidiol 600 mg/Kg	Aceite de oliva (Vehículo)
Aceite destilado 600 mg/Kg	-	*0.0022	0.3662	0.335
Carbamazepina 20 mg/Kg	*0.0022	-	*0.0201	*0.000096
Cannabidiol 600 mg/Kg	0.3662	*0.0201	-	0.1008
Aceite de oliva (Vehículo)	0.335	*0.000096	0.1008	-

$p = 0.00004553$; $p < 0.05$ SI diferencia significativa entre tratamientos **Kruskal Wallis**

Finalmente, se presenta la **Figura 5-4** que evidencia una comparativa general entre los distintos tratamientos a diferentes dosis con su respectivo factor de protección. Un valor de 1 representa la protección total de la población muestreada, es decir, 10 individuos no presentaron una crisis de tipo tónico a través del estiramiento de los miembros inferiores. Esta protección total es característica de un patrón bien seleccionado, que en este caso corresponde a carbamazepina a 20 mg/Kg.

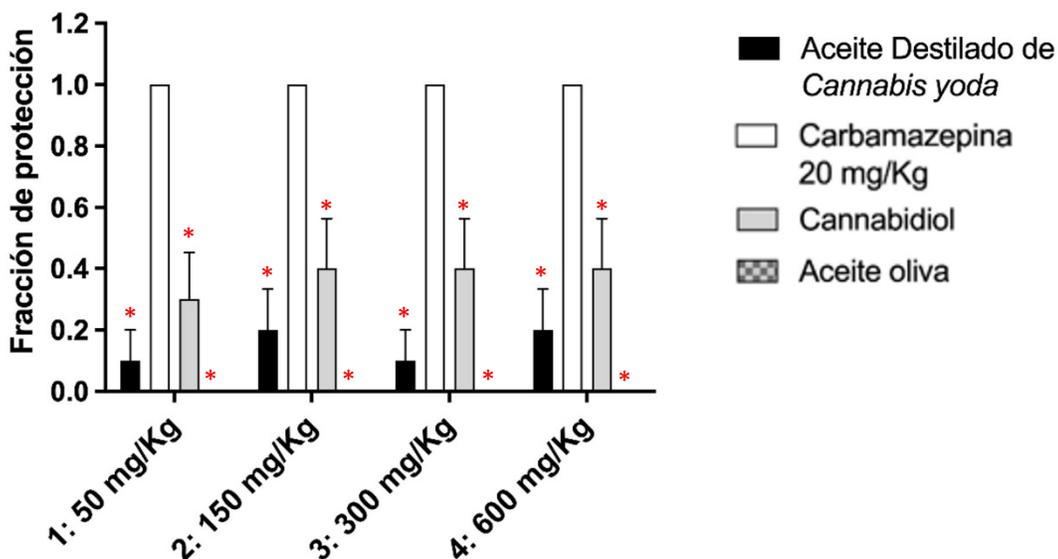
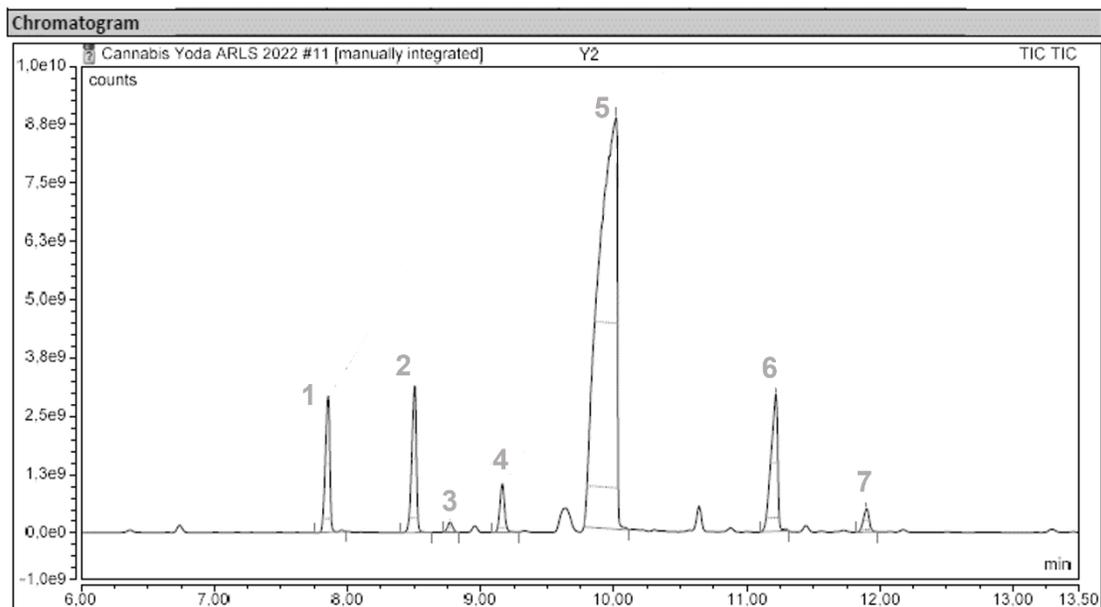


Figura 5-4: Fracción de protección de cada uno de los tratamientos (aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, carbamazepina a 20 mg/Kg y aceite de oliva como vehículo) frente a crisis tónica inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES).

5.2 Parte analítica

5.2.1 Resultado de la identificación de cannabinoides por GC-MS/EI

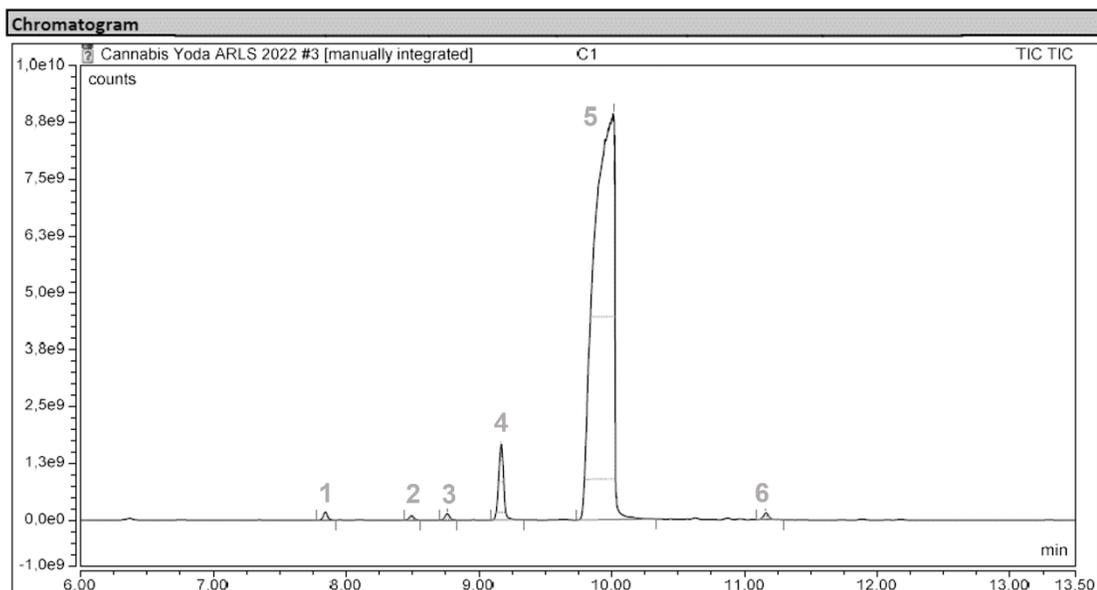
En las **Figura 5-5** y **5-6** se presentan los cromatogramas obtenidos para el aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, respectivamente. Para lograrlo se usó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con la configuración de los parámetros cromatográficos previamente validados, descritos en el apartado de metodología.



# Pico	Nombre	Tiempo de retención (min)	% Relativo
1	Cannabidivarina (CBDV)	7,857	6,00
2	Cannabicitran	8,506	6,68
3	Tetrahidrocannabivarina (THCV)	8,771	0,52
4	Tetracosano	9,166	2,25
5	Cannabidiol (CBD)	10,020	74,17

6	Tetrahydrocannabinol (THC)	11,217	9,04
7	Cannabigerol (CBG)	11,897	1,34

Figura 5-5: Cromatograma de corriente iónica total para el aceite destilado de *Cannabis yoda* obtenido a través de GC-MS/EI

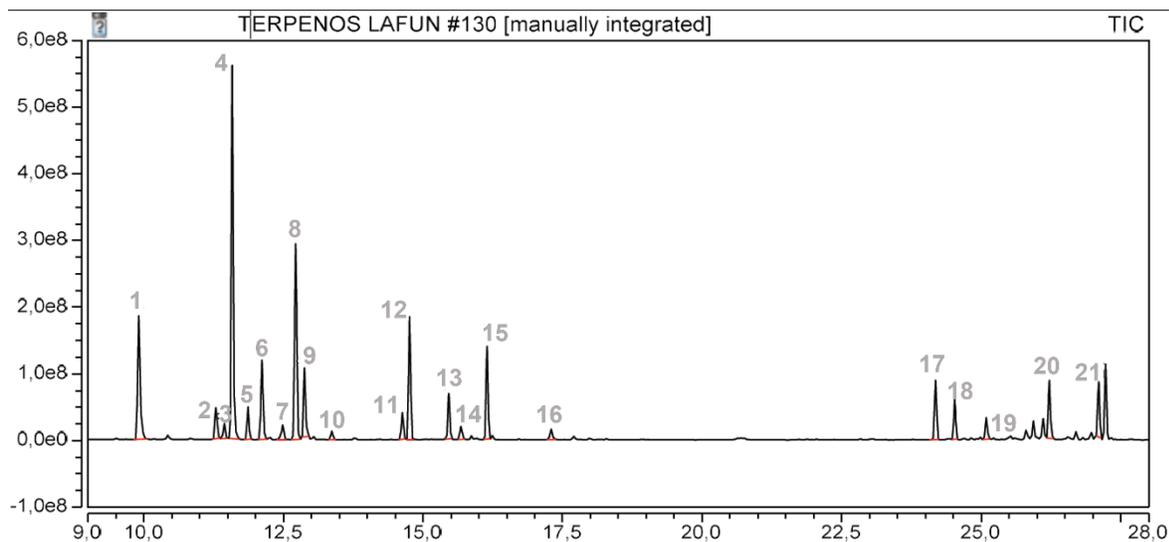


# Pico	Nombre	Tiempo de retención (min)	% Relativo
1	Cannabidivarina (CBDV)	7,843	0,39
2	Cannabicitran	8,492	0,22
3	CBD-β	8,761	0,34
4	Tetracosano	9,169	4,29
5	Cannabidiol (CBD)	10,013	94,34
6	Tetrahydrocannabinol (THC)	11,162	0,42

Figura 5-6: Cromatograma de corriente iónica total para cannabidiol obtenido a través de GC-MS/EI.

5.2.2 Resultados de la identificación de terpenos por GC-MS/EI- HS-SPME

En las **Figuras 5-7** y **5-8** se presentan los cromatogramas de las sustancias volátiles extraídas del aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, respectivamente, obtenidos a través microextracción en fase sólida (SPME). Para el cromatograma no se relacionan componentes a picos debido a que no se identificó ningún componente volátil.



# Pico	Nombre	Tiempo de retención (min)	% Relativo
1	α -Pino	9,907	9,91
2	β -Pino	11,288	2,31
3	2-(10)-Pino	11,441	0,94
4	β -Mirceno	11,584	24,31
5	Cis-2,6-dimetil-2,6-Octadieno	11,866	1,95
6	Cosmeno	12,115	5,36
7	Terpinoleno	12,489	1,18
8	p-Cimeno	12,720	13,70
9	d-Limoneno	12,877	4,69
10	β -Ocimeno	13,370	0,50
11	Isoterpenoleno	14,631	1,69
12	α -p-dimetilestireno	14,761	7,91
13	1,3,8-p-mentatrieno	15,461	2,78
14	Exo-fenhol	15,679	0,90
15	p-menta-1,5,8-trieno	16,152	5,91
16	Camfeno	17,291	0,83
17	β -Cariofileno	24,182	3,84
18	α -Guaieno	24,525	2,49
19	α -Humuleno	25,090	1,50
20	Azuleno	26,219	3,86
21	Naftaleno	27,107	3,45

Figura 5-7: Cromatograma de corriente iónica total para los componentes volátiles en aceite destilado de *Cannabis yoda*, obtenido a través de GC-MS/EI-HC/SPME.

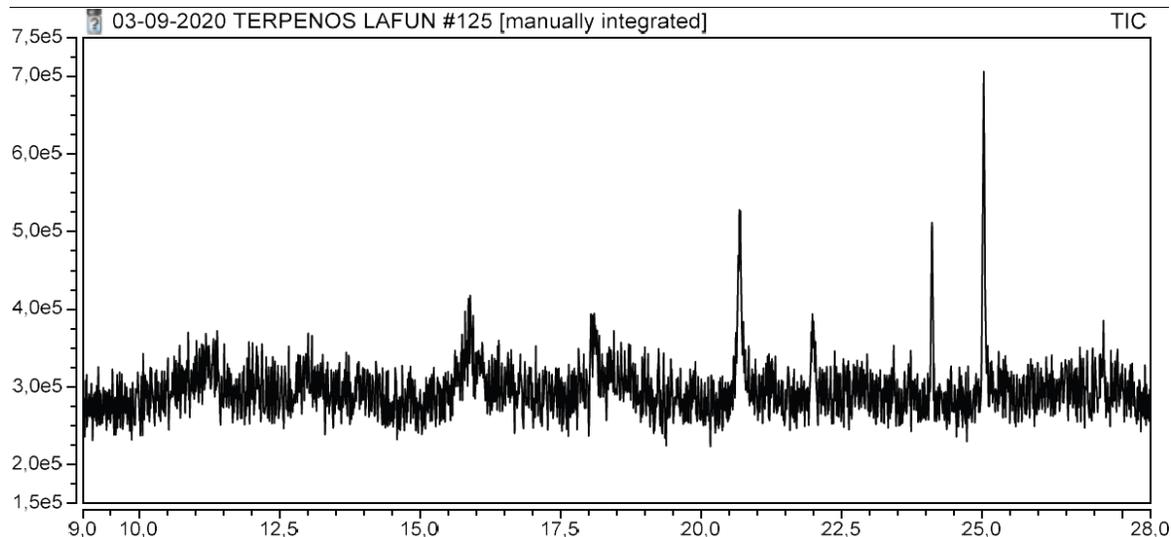


Figura 5-8: Cromatograma de corriente iónica total para los componentes volátiles en CBD aislado, obtenido a través de GC-MS/EI-HC/SPME.

5.2.3 Resultados del procedimiento de cuantificación de THC, CBD y CBN por GC-FID

En las **Figuras 5-9, 5-10 y 5-11** se presentan los cromatogramas obtenidos para la solución estándar, importante para la cuantificación, el aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado.

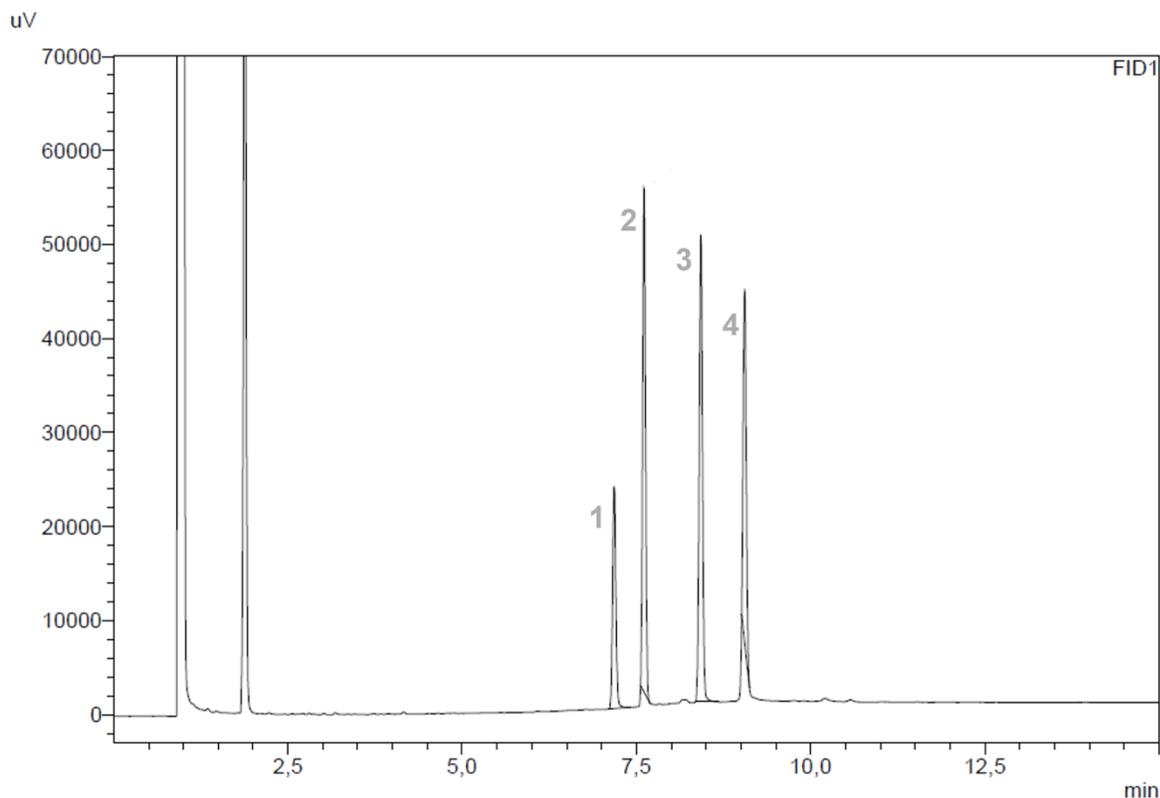


Figura 5-9: Cromatograma de la solución estándar de THC, CBD y CBN (100 ppm), empleando como estándar interno tetracosano, obtenido a través de GC-FID

Adicionalmente, se exponen las **Tablas 5-17, 5-18 y 5-19** en las cuales reposan los datos obtenidos por cada pico, según inyección reportada en la figura inmediatamente anterior, donde se incluyen la concentración en partes por millón (ppm), cantidad en microgramos (μg) y concentración en porcentaje peso a peso (%p/p) para THC, CBD y CBN en el aceite destilado de *Cannabis yoda* y el cannabidiol aislado

Tabla 5-17: Datos de tiempos de retención, áreas, relación de áreas y concentraciones de CBD, THC y CBN de la solución estándar, obtenidos a través de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

Solución Estándar (THC: 100 ppm, CBD 100 ppm, CBN 100 ppm)						
# Pico	Nombre	Tiempo de Retención	Área	Área Ratio	Concentración (ppm)	Cantidad (μg)
1	Tetracosano	7,186	75779	1,000	-	-
2	CBD	7,611	153594	2,027	100	800
3	THC	8,427	162702	2,147	100	800
4	CBN	9,053	127731	1,686	100	800

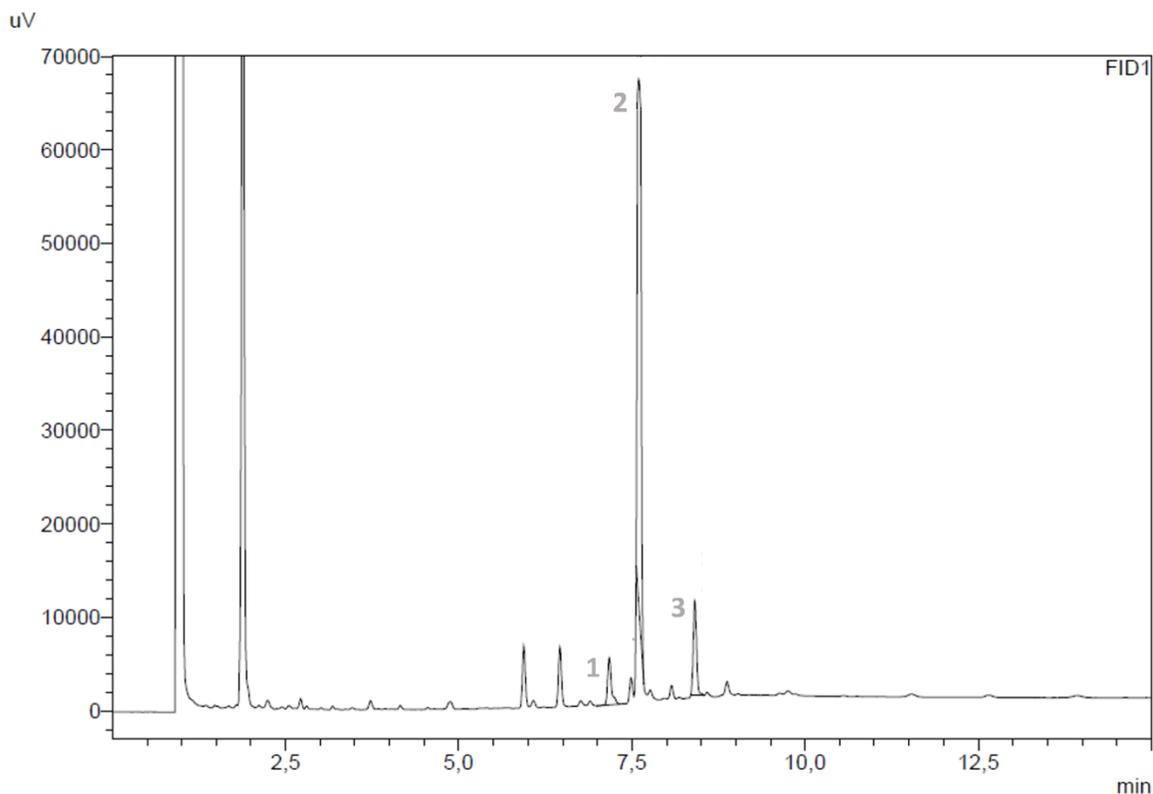


Figura 5-10: Cromatograma de aceite destilado de *Cannabis yoda*, obtenido a través de GC-FID.

Tabla 5-18: Datos de tiempos de retención, áreas, relación de áreas y concentraciones de CBD, THC y CBN de aceite destilado de *Cannabis yoda*, obtenidos a través de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). *MP: Material pesado.*

Aceite Destilado de <i>Cannabis yoda</i> (MP: 50000 µg, THC: 100 ppm, CBD 100 ppm, CBN 100 ppm)							
# Pico	Nombre	Tiempo de Retención	Área	Área Ratio	Concentración (ppm)	Cantidad (ug)	Concentración (%p/p)
1	Tetracosano	7,173	19158	1,000	-	-	-
2	CBD	7,605	378420	19,753	974,538	7796,300	15,593
3	THC	8,408	32953	1,720	80,113	640,901	1,282

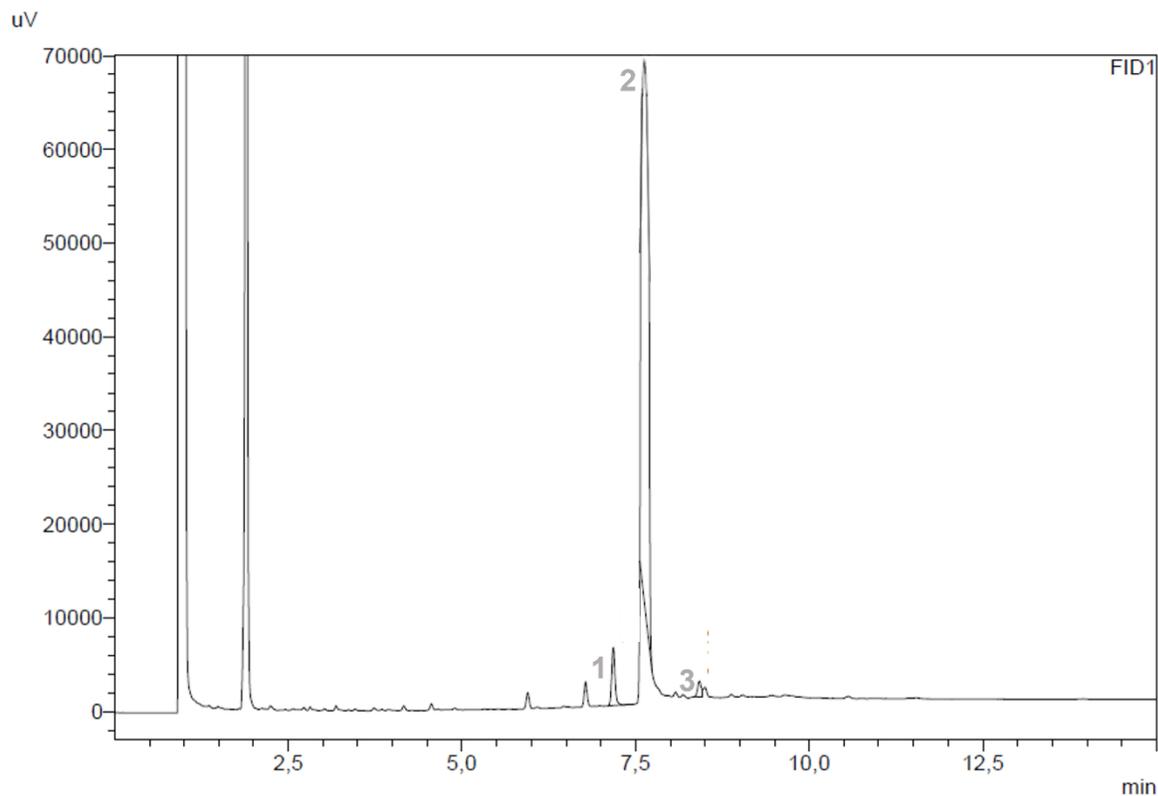


Figura 5-11: Cromatograma de cannabidiol aislado, obtenido a través de GC -FID.

Tabla 5-19: Datos de tiempos de retención, áreas, relación de áreas y concentraciones de CBD, THC y CBN de cannabidiol aislado, obtenidos a través de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). *MP: Material pesado.*

Cannabidiol aislado (MP: 50000 µg, THC: 100 ppm, CBD 100 ppm, CBN 100 ppm)							
# Pico	Nombre	Tiempo de Retención	Área	Área Ratio	Concentración (ppm)	Cantidad (ug)	Concentración (%p/p)
1	Tetracosano	7,179	20425	1,000	-	-	-
2	CBD	7,659	1669986	81,762	4033,902	32271,219	64,542
3	THC	8,418	6339	0,310	14,455	115,639	0,231

6. Discusión

El uso de modelos preclínicos de epilepsia ha sido indispensable para la identificación de potenciales agentes anticonvulsivantes que se usan hoy en día en la práctica clínica. Desde 1993, más de 20 nuevas moléculas con actividad anticonvulsivante han sido bien identificadas desde los modelos animales, incluyendo los anticonvulsivantes de tercera generación, que posteriormente a través de ensayos clínicos doble ciego y control vs placebo, demostraron su perfil de efectividad y seguridad clínico. Solo a excepción de los tratamientos iniciales que incluyen, bromuros y fenobarbital, se puede mencionar que la mayor parte de los tratamientos existentes fueron definidos a partir de modelos agudos estandarizados de convulsión, por ejemplo, máximo electrochoque (MES) y la inyección subcutánea de pentilentetrazol (PTZ) (Barker-Haliski & Steve White, 2020; Löscher, 2017a, 2017b), modelos usados en el desarrollo del presente trabajo. Por lo tanto, continuar evaluando desde una óptica preclínica, extractos y moléculas aisladas con un potencial perfil anticonvulsivante sigue siendo prometedor para patologías como la epilepsia.

6.1 Modelo del eje rodante

Para la presente investigación, se evaluó la actividad anticonvulsivante de un aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado en diferentes dosis; 50, 150, 300 y 600 mg/Kg, a través de la batería preclínica de epilepsia que contempla: la prueba de máximo electrochoque para crisis tónico-clónicas, la prueba de convulsión inducida por pentilentetrazol (PTZ) para crisis de ausencia y mioclónicas, y la prueba de convulsión umbral de baja frecuencia 6 Hz, para crisis refractarias. No sin antes verificar que todas las sustancias a evaluar, incluyendo los patrones según el tipo de crisis, no son neurotóxicas y no afectan la coordinación motora de los individuos. Esto se realizó con la ayuda de la prueba del eje rodante, caracterizado por ser útil en el descarte de anticonvulsivantes neurotóxicos, predecir una posible interferencia del desempeño motor en fármacos de

acción central, y más recientemente, como una prueba de rutina en ensayos preclínicos para fármacos psicotrópicos (Kuribara et al., 1977; Neves et al., 2010; Souza et al., 2021).

Los tiempos en segundos, obtenidos para las sustancias administradas reposan en la **Tabla 5-1**, la cual representa los momentos pre y post administración sobre el eje rodante. Los resultados fueron tratados con una prueba ANOVA de medidas repetidas verificando los supuestos para su uso, ausencia de valores extremos y distribución normal; tal como se realiza en investigaciones del mismo tipo para evaluaciones farmacológicas (Gomes et al., 2010; Souza et al., 2021).

La **Tabla 5-1** evidencia que para todos los tratamientos el valor $p > 0.05$, lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula, es decir, no existen diferencias significativas entre los tiempos medidos pre y post administración para todos los tratamientos, reflejado gráficamente en la **Figura 5-1**. Por lo tanto, se puede inferir que las sustancias evaluadas, administradas por VO y en las dosis establecidas no afectan el desempeño motor del individuo, y en consecuencia no representan riesgo neurotóxico agudo que genere ruido en las pruebas posteriores.

6.2 Prueba de convulsión umbral inducida por electrochoque de baja frecuencia 6 Hz

En la **Tabla 5-2** se describen los porcentajes de animales protegidos frente a las crisis de bajo umbral o refractarias para cada una de las dosis de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado evaluadas, incluyendo el patrón de protección seleccionado. Observando en primer lugar que el control positivo, levetiracetam a 80 mg/Kg, fue bien elegido ya que se protegieron el 100% de los individuos frente a una crisis de bajo umbral o refractaria, caracterizada por presentar al menos dos de los siguientes signos: erección de bigotes, estiramiento de los miembros superiores, movimientos armónicos de la cabeza y fenómeno de *Straub* (Laura C. Ruíz & Cesar G. Girón, 2022), determinado por una dorsiflexión de la cola que a menudo es casi vertical a la orientación del cuerpo, mediado principalmente por la activación del sistema de receptores opioides, y con el síndrome noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico (Kitanaka et al., 2012), que son interesantes en el contexto de una evaluación farmacológica preclínica de epilepsia.

En adición, estos resultados también permiten confirmar que el vehículo usado, aceite de oliva, no presenta ningún tipo de protección frente a crisis de bajo umbral o refractarias, y de acuerdo con la **Tabla 5-1** tampoco interfiere con el desempeño motor de los individuos, cumpliendo con las características de vehículo ideal para la administración de las dosis preestablecidas.

Respecto a la protección de los individuos frente a estos tipos de crisis, las **Tablas 5-3, 5-4, 5-5 y 5-6** comparan las dosis de aceite destilado de *Cannabis yoda* con las dosis de cannabidiol aislado, el vehículo y el control positivo, permitiendo encontrar que no existen diferencias significativas del aceite destilado de *Cannabis yoda* a 50, 150, 300 y 600 mg/Kg y cannabidiol aislado a 50 y 600 mg/Kg con valores $p > 0.05$ frente al control positivo. Lo que posibilita confirmar que, sí existe protección para las crisis de bajo umbral o refractarias por parte del aceite destilado de *Cannabis yoda* y el cannabidiol aislado a las dosis mencionadas, tomando como referencia levetiracetam a 80 mg/Kg. Mientras que para las dosis de cannabidiol aislado de 150 y 300 mg/Kg si existen diferencias significativas versus el comparador y el aceite destilado de *Cannabis yoda* a las mismas dosis, con valores $p < 0.05$. Por lo tanto, para estas dosis no existe una protección relevante de los individuos.

Empero, las **Tablas 5-4 y 5-5** describen que a pesar de que estadísticamente no existen diferencias significativas, el porcentaje de animales protegidos por cannabidiol aislado a las dosis de 50 y 600 mg/Kg es inferior versus el aceite destilado a las mismas dosis. En consecuencia, se puede pensar que hay componentes del aceite destilado de *Cannabis yoda* que no están en el cannabidiol aislado mediando una mayor protección de los individuos frente a este tipo de crisis.

Según lo anterior, las **Figuras 5-5 y 5-6** representan los cromatogramas del aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado obtenidos a través de Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), para los cuales se identifica en ambos la presencia de cannabidivarina (CBDV), cannabicitran, CBD y THC. Mientras que, solamente cannabigerol (CBG) y tetrahidrocannabivarina (THCV) se encuentran en el aceite destilado de *Cannabis yoda*. De modo que, la presencia de CBG y THCV en el aceite destilado podría brindar un primer acercamiento a la mayor protección versus el cannabidiol aislado.

Investigaciones realizadas alrededor de la eficacia del CBG para crisis convulsivas no son concluyentes en definir si el CBG es un agente anticonvulsivante efectivo debido a la falta

de información. Sin embargo, a nivel preclínico se demostró que el CBG tiene efecto sobre los canales de Na⁺ en un grado similar al CBD, bloqueándolos en concentraciones micromolares. Adicionalmente, el CBG puede actuar sobre receptores 5-HT_{2A}, implicados en el control de la excitabilidad neuronal (Farrelly et al., 2021); mecanismos relacionados con la fisiopatología de las crisis convulsivas. Por lo tanto, el CBG presente solamente en el aceite destilado podría explicar la mayor protección frente al cannabidiol aislado desde la teoría.

Por otro lado, la THCV ha demostrado que posee propiedades antiepileptiformes en un EGG a nivel *in vitro* y además tiene un efecto significativo sobre la reducción de las crisis generalizadas en modelo murino a través de PTZ. Por lo que se puede estimar que este fitocannabinoide es un agente potencial en el control de las crisis generalizadas a través de su efecto antagónico sobre receptores CB1 y CB2, y la modulación de la neurotransmisión inhibitoria a través de un aumento de la liberación de GABA (Farrelly et al., 2021; A. Thomas et al., 2005), quienes también se encuentran involucrados en el control de las crisis refractarias.

Por consiguiente, reconocer un potencial efecto anticonvulsivante, en términos de coadyuvancia de estas moléculas identificadas solamente en el aceite destilado, permite atribuir la mayor protección del aceite destilado de *Cannabis yoda* a su participación.

Asimismo, es importante resaltar la importancia en términos de la protección de los individuos por las moléculas identificadas en ambas matrices, aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado. Una de ellas la CBDV, molécula análoga al CBD, quien a nivel preclínico ha demostrado su potencial actividad anticonvulsivante a través de la reducción de la severidad de las crisis convulsivas, principalmente en el modelo MES y PTZ, donde permitió proteger a los individuos de la extensión de los miembros posteriores y de una convulsión generalizada de tipo mioclónico, respectivamente. Lo anterior a una dosis oral de 200 mg/Kg, para la cual, el 33.3% de los ratones no mostraron ninguna señal convulsiva, mientras que para el vehículo solo el 6.7% no respondieron al estímulo (A. J. Hill, Williams, et al., 2012). Por otro lado, desde el escenario clínico se ha descrito que la CBDV tiene un perfil farmacocinético y de seguridad favorable, siendo bien tolerado y rápidamente metabolizado por vía hepática (Morano et al., 2020). Sin embargo, en un estudio de fase II donde se evaluó un derivado purificado de CBDV para el tratamiento de

epilepsia refractaria, administrando 400 mg de CBDV durante 14 días, se pudo observar que no reduce significativamente las crisis convulsivas recurrentes. No obstante, los autores reconocen que el diseño del estudio tiene muchas oportunidades de mejora, escrutando que la utilización de una formulación purificada de CBDV no es suficiente para arrojar la eficacia general del CBDV en epilepsia, particularmente las crisis refractarias. Por lo que se deben evaluar más dosis, vías de administración, derivados enriquecidos en el fitocannabinoide, y sobre todo grupos etarios específicos, ya que las crisis refractarias se ven reflejadas en población joven (Farrelly et al., 2021; Morano et al., 2020; Pamplona et al., 2018; Stone et al., 2020). Quizás este puede ser el escenario en el cual la CBDV en compañía de otros cannabinoides y metabolitos de la planta tenga mayor efectividad respecto a la molécula aislada, como ocurre con los resultados publicados para el aceite destilado de *Cannabis yoda*.

Merece la pena subrayar que el CBD componente mayoritario en las dos matrices investigadas, de acuerdo con los cromatogramas de las **Figuras 5-5 y 5-6**, también está involucrado de forma directa y principal en la protección de los individuos frente a las crisis de bajo umbral o refractarias. Este es el metabolito que más se investiga debido a ser una de las fitomoléculas preponderantes en la planta, tener potencial actividad sobre el SNC, por efecto de su acción sobre múltiples blancos moleculares centrales, y su perfil de seguridad promisorio al no tener efectos psicoactivos en comparación con el THC. Investigaciones soportan la hipótesis de que el CBD es uno de los protagonistas en la protección de los individuos frente a las crisis umbrales y refractarias. Se ha encontrado que, en ensayos muy similares al ejecutado en esta investigación, usando frecuencias de 6 Hz a intensidad de corriente de 32 mA y 44 mA en ratones; el CBD tiene índices de protección de 1.9, y 1.6 respectivamente; definidos como la relación de la dosis media tóxica y la dosis media efectiva (TD_{50}/ED_{50}); estos índices de protección están comparados frente a fenobarbital, ácido valproico y felbamato. Para los cuales fue posible concluir un perfil de actividad comparable con fenobarbital para el control de crisis agudas. Y que a pesar de ser inferiores en ácido valproico y felbamato, con la administración crónica se pudieron controlar las crisis convulsivas características de estos modelos de bajo umbral, sin afectar la coordinación motora ni la función cognitiva de los individuos, por lo que se estimaría un perfil de seguridad positivo (Patra et al., 2019). Lo anterior es coherente con los resultados obtenidos en la presente investigación, porque aun cuando la protección no es análoga para el cannabidiol aislado en las dosis de 50 y 600 mg/Kg, referido a

porcentaje de individuos protegidos, frente al levetiracetam a 80 mg/Kg no existen diferencias significativas (ver **Tablas 5-5** y **5-6**). Adicionalmente, se debe tener en cuenta que, las dosis de cannabidiol aislado fueron administradas por VO y los ensayos preclínicos de la misma naturaleza cuyos resultados reportan el perfil anticonvulsivante para crisis refractarias utilizan la vía intraperitoneal como ruta de administración, cuya cinética es diferente. Por lo que nuevamente, se hace la recomendación de analizar en futuras investigaciones la farmacocinética a nivel oral de estos metabolitos, para la cual sigue existiendo protección de los individuos.

Por otra parte, estudios clínicos que evalúan el CBD como extracto y aceite enriquecido han mostrado el CBD como una alternativa eficaz para la reducción del número de convulsiones y mejorar la calidad de vida del paciente pediátrico epiléptico (Huntsman et al., 2020; Uliel-Sibony et al., 2021). Uno de estos estudios, corresponde a la evaluación de un extracto 20:1 CBD: THC a dosis entre 1 y 20 mg/Kg, el cual resultó en una reducción de la frecuencia de las convulsiones en el 89% de los niños con epilepsia farmacorresistente, declarando también que hubo mejorías en el estado de alerta, la calidad de sueño, estado de ánimo y habilidades comunicativas y motoras (Tzadok et al., 2016). Otro estudio, también pudo concluir que la adición de preparados artesanales enriquecidos con CBD fueron eficaces en niños con epilepsia refractaria, teniendo que más del 50% de los pacientes reportó reducción del número de convulsiones y el 10% eliminación total de las crisis convulsivas (Porcari et al., 2018). Por lo que, en definitiva, el CBD identificado y cuantificado en la presente investigación, representa un papel crucial en el aceite destilado de *Cannabis yoda* y el cannabidiol aislado para la protección de los individuos frente a las crisis umbrales o refractarias.

Por otro lado, no solamente los cannabinoides están involucrados en la protección de los individuos. La **Figura 5-7** representa el cromatograma de los componentes volátiles, de tipo isoprenoide en el aceite destilado de *Cannabis yoda*, obtenido a través de Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Estos componentes son conocidos por proporcionar el olor y sabor en la planta, sin embargo, recientemente se ha encontrado que estos metabolitos también juegan un papel importante en el potencial terapéutico de los extractos enriquecidos de Cannabis, actuando en un sinergismo con los cannabinoides para producir diferentes efectos benéficos, conocido como efecto séquito (*entourage effect*) (Farrelly et al., 2021).

Dentro del perfil fitoquímico del género cannabis se conoce que hay alrededor 200 terpenos identificados y solo unos pocos contienen evaluaciones farmacológicas robustas. Los principales que resaltan en muchas genéticas son: α -Pineno, β -Pineno, β -Mirceno y β -Cariofileno (Huntsman et al., 2020; Rock & Parker, 2021). Quienes también se encuentran reportados en el cromatograma para la genética en evaluación, *Cannabis yoda* (ver **Figura 5-7**).

En primer lugar, el α y β -Pineno han sido ampliamente investigados en la batería preclínica de depresión y ansiedad sobre modelo murino, encontrando que, comparado con un inhibidor de la recaptación de serotonina, producían un efecto similar al de la inmovilidad; permitiendo concluir su potencial actividad antidepresiva. Resultados que, para el escenario de epilepsia refractaria, generan expectativa debido a que es una de las comorbilidades más comunes en el paciente con este diagnóstico, y en la mayoría de los casos la mejoría sobre los estados depresivos conlleva directamente a reducción de las crisis convulsivas en escenarios de multiresistencia (Ferber et al., 2020).

Por otro lado, el β -Mirceno es bien conocido en terapéutica por inducir la relajación y reducir los episodios de ansiedad mayor. Adicionalmente, respecto a su presencia en extractos de Cannabis se ha establecido la hipótesis de que potencia los efectos terapéuticos mostrados por la integralidad de la planta como agente antiinflamatorio por vía de las prostaglandinas E2, analgésico, inductor del sueño y relajante muscular (Ferber et al., 2020; Rock & Parker, 2021). Por lo tanto, al tener potencial efectividad como agente ansiolítico, permite pensar que a nivel central tendrá actividad sobre redes que involucran noradrenalina, serotonina y GABA; quienes están inmersos en la fisiopatología de diversas crisis epilépticas. Además, es bien conocida su actividad sobre la ruta de las prostaglandinas, las cuales están correlacionadas con los procesos de neuroinflamación cuya consecuencia son algunas crisis convulsivas generalizadas (Vezzani et al., 2019).

Finalmente, el β -Cariofileno es uno de los sesquiterpenos más interesantes en el contexto de epilepsia debido a que se ha confirmado su actividad sobre los receptores CB2 y 5-HT1A, quienes desempeñan un papel importante en la terapéutica de diversas patologías que incluyen además de las crisis convulsivas, la colitis ulcerosa, el dolor neuropático, la ansiedad y la endometriosis (Bahi et al., 2014). Por otra parte, investigaciones también compararon el papel del β -Cariofileno en un extracto enriquecido de CBD vs CBD puro demostrando que el perfil de seguridad y efectividad era mucho mejor en el extracto donde

coexistían fitocannabinoides y moléculas anexas como los terpenos (E. B. Russo, 2011, 2018). Permitiendo confirmar la hipótesis que justifica el mayor índice de protección del aceite destilado de *Cannabis yoda* versus el cannabidiol aislado, a quién se confirmó que no contiene estos compuestos volátiles (ver **Figura 5-8**).

En definitiva, los resultados conllevan a resaltar la importancia de las moléculas anexas al CBD, que incluyen fitocannabinoides y terpenos, para mejorar los índices de efectividad y seguridad en la terapéutica de las crisis convulsivas, particularmente las de bajo umbral evaluadas en este acápite. Sería interesante abordar en la investigación de las demás moléculas identificadas ya que no se encuentra información robusta, las cuales incluyen el cannabicitran como cannabinoide y demás terpenos no abordados que se encuentran en la **Figura 5-7**.

6.3 Prueba de convulsión inducida por agente químico pentilentetrazol (PTZ)

En la **Tabla 5-7** se describen los porcentajes de animales protegidos frente a una crisis mioclónica para cada una de las dosis de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado evaluadas, incluyendo el patrón de protección seleccionado. Observando en primer lugar que el control positivo, ácido valproico a 300 mg/Kg, fue bien elegido ya que se protegieron el 100% de los individuos frente a una crisis mioclónica, caracterizada por presentar sacudidas generalizadas en un campo abierto (Alachkar et al., 2020; T. Singh et al., 2021)

En adición, estos resultados también permiten confirmar que el vehículo usado, aceite de oliva, no presenta ningún tipo de protección frente a crisis mioclónicas, y de acuerdo con la **Tabla 5-1** tampoco interfiere con el desempeño motor de los individuos, cumpliendo con las características de vehículo ideal para la administración de las dosis preestablecidas.

Respecto a la protección de los individuos frente a estos tipos de crisis, la **Tabla 5-8** compara la dosis de 50 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* con la misma dosis de cannabidiol aislado, el vehículo y el control positivo. Permitiendo encontrar que, para la dosis de 50 mg/Kg de aceite destilado si existen diferencias significativas versus el patrón con un valor p de 0.025, lo que nos permite deducir que no hay protección relevante por

parte del aceite destilado a esta dosis, independiente de los 4 individuos protegidos. En contraparte, el cannabidiol aislado a la misma dosis no tuvo diferencia significativa con el patrón, protegiendo un total de 6 individuos y un valor p de 0.101, indicando que si existe protección relevante por parte del cannabidiol a esta dosis.

La **Tabla 5-9** realiza las mismas comparaciones múltiples, pero considerando el aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado a dosis de 150 mg/Kg cada uno. Encontrando que no existen diferencias significativas para ninguno de los dos frente a ácido valproico a 300 mg/Kg, por lo que se considera que existe protección relevante tanto del aceite destilado como el cannabidiol aislado a estas dosis.

Finalmente, las **Tablas 5-10** y **5-11** comparan las dosis 300 y 600 mg/Kg de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado versus el vehículo y el patrón. Encontrando principalmente que el factor de protección disminuye en ambas considerablemente, a pesar de que para 300 mg/Kg ambas matrices no presentaron diferencias significativas versus el ácido valproico a la misma dosis con valores p de 0.101 protegiendo a 6 individuos cada una. Mientras que para la dosis de 600 mg/Kg el aceite destilado de *Cannabis yoda* presentaba diferencias significativas con el patrón con un valor p de 0.025, infiriendo la no protección relevante de los individuos.

Lo descrito anteriormente para cada una de las dosis evaluadas, se ve reflejado integralmente en la **Figura 5-3**, quien muestra la tendencia de mayor protección sobre la dosis de 150 mg/Kg para ambas matrices, permitiendo estimar que sobre el intervalo de 50 y 300 mg/Kg estará el mayor índice de protección.

Apoyando los resultados obtenidos, investigaciones remarcan el papel del CBD y coadyuvantes en el control de las crisis inducidas por PTZ. Aunque a diferencia de la presente investigación, se contemplan variables adicionales a la aparición o ausencia de una crisis de tipo mioclónico, como lo son; cambios en el comportamiento del individuo, sacudidas mioclónicas aisladas, crisis mínimas atípicas o incompletas, convulsiones generalizadas sin fase tónica y mortalidad (Uttl et al., 2021). Esto podría explicar la razón de por qué solo desde la óptica de la presencia o ausencia de una crisis mioclónica los resultados sobre las dosis de 300 y 600 mg/Kg indican una reducción de la protección. Quizás si se contemplan más variables en este modelo, estas dosis para ambas matrices serían más representativas y la respuesta sería dosis dependiente como lo enuncian investigaciones análogas (Witherspoon et al., 2022).

En armonía con lo anterior, se conoce que el CBD en el modelo PTZ para crisis mioclónicas retrasa el inicio de las convulsiones en ratas adolescentes y conserva un comportamiento dosis dependiente; para el cual a medida que se aumenta la dosis incrementa el índice de protección, incluso para modelos como MES. Permitiendo concluir que, a pesar de lo modesto de los resultados, y no contemplar ratones; estos son consistentes en definir el CBD como agente con actividad anticonvulsivante, principalmente en el modelo MES y PTZ (Witherspoon et al., 2022); en coherencia con los resultados obtenidos en la **Tabla 5-7**.

En otro orden, conservando lo discutido en el modelo de bajo umbral se podría estimar que los componentes de tipo isoprenoide no serían protagonistas a través del efecto séquito en la protección de las crisis mioclónicas. En cambio, moléculas anexas al CBD según el cromatograma de la **Figura 5-7** sí pueden estar inmersas en la actividad sobre este tipo de crisis. Este es el caso de CBDV, para la cual investigaciones han concluido su actividad como agente anticonvulsivante atenuando el *status epilepticus* a través del modelo inducido por 4-aminopiridina (4-AP) sin Mg⁺², y en el modelo MES y PTZ con dosis mayores a 100 mg/Kg, sin afectar la capacidad motora del individuo (A. J. Hill, Mercier, et al., 2012; T. D. M. Hill et al., 2013). Por lo cual en términos de las dosis y los resultados se soportan los hallazgos obtenidos en la presente investigación.

6.4 Prueba de convulsión inducida por electrochoque a máxima frecuencia 60 Hz (MES)

En la **Tabla 5-12** se describen los porcentajes de animales protegidos frente a las crisis tónico-clónicas para cada una de las dosis de aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado evaluadas, incluyendo el patrón de protección seleccionado. Observando en primer lugar que el control positivo, carbamazepina a 20 mg/Kg, fue bien elegido para estas crisis ya que se protegieron el 100% de los individuos frente a la crisis de tipo tónico-clónica, caracterizada por extensión de los miembros inferiores, lo que es coherente con lo reportado en la literatura para el mismo tipo de prueba (Enna, 1998). En adición, se confirmó que el vehículo usado, aceite de oliva, no presentaba ningún tipo de protección frente a crisis tónico-clónicas y de acuerdo con la **Tabla 5-1** tampoco interfería

en el desempeño motor de los individuos. Lo que permite cumplir las características de vehículo ideal para la administración de las dosis preestablecidas.

Por otra parte, a pesar de que las **Tablas 5-13, 5-14, 5-15 y 5-16** evidencian que no hay diferencia significativa entre las dosis administradas de aceite destilado de *Cannabis yoda*, cannabidiol aislado y el vehículo, aceite de oliva; existe una fracción de protección interesante para cannabidiol aislado que es dependiente de la dosis, con 3 individuos protegidos a 50 mg/Kg y 4 en 150, 300 y 600 mg/Kg, versus el aceite destilado de *Cannabis yoda* que solo protegió 1 individuo en 50 y 300 mg/Kg, y 2 en 150 y 600 mg/Kg (**Figura 5-2**). Lo que permite establecer la hipótesis de que el CBD puede ser responsable de la protección frente a las crisis tónico-clónicas, ya que según las **Tablas 5-18 y 5-19** que evidencian los porcentajes en %p/p de CBD, THC y CBN en aceite destilado de *Cannabis yoda* y cannabidiol aislado, respectivamente, se tienen porcentajes de 15,6% de CBD en aceite destilado de *Cannabis yoda* y 64,5% de CBD en cannabidiol aislado como componentes mayoritarios.

Realizando la debida correspondencia con las dosis administradas, esta hipótesis toma relevancia, ya que, en investigaciones de la Universidad de Reading, la Universidad de Washington y la Universidad de Utah, se concluye que en los modelos electroconvulsivos agudos en ratón a máximo electrochoque (MES), el CBD bloqueó de forma dosis dependiente las convulsiones de tipo tónico-clónicas, consiguiendo una protección completa sin producir alteraciones motoras. Sin embargo, se pueden encontrar diferencias puntuales en la vía de administración y su correspondiente biodisponibilidad, dado que en estas investigaciones se administró CBD por vía intraperitoneal (IP) declarando una dosis efectiva 50 (ED_{50}) de 80 mg/Kg con niveles plasmáticos máximos a 120 minutos (Klein et al., 2017; Patra et al., 2019). Y de acuerdo con el protocolo desarrollado en la presente investigación los individuos se sometieron al estímulo eléctrico 60 minutos después de la administración por VO. Por lo tanto, vendría oportuno analizar la cinética del CBD por VO para determinar realmente si su protección es estadísticamente significativa versus carbamazepina a 20 mg/Kg, quien protegió al 100% de los individuos.

6.5 Perfil fitoquímico de *Cannabis yoda*

El perfil fitoquímico identificado para la genética colombiana *Cannabis yoda*, en una matriz de aceite destilado, estuvo orientado a la identificación de dos grupos principales de

fitomoléculas que llaman la atención en la investigación de este género; los fitocannabinoides y los compuestos de tipo isoprenoide, como los terpenos, por su posible interacción benéfica a través del efecto séquito.

Particularmente, para esta genética se logró identificar 6 tipos de cannabinoides con sus respectivos porcentajes relativos en la matriz. De mayor a menor se tienen CBD con 74,17%, THC con 9,04%, Cannabicitran con 6,68%, CBDV con 6,00%, CBG con 1,34% y THCV con 0,25% (ver **Figura 5-5**). Permitiendo confirmar lo declarado por el titular de la genética, afirmando que *Cannabis yoda* es una variedad enriquecida en CBD, considerándose no psicoactiva. Adicionalmente, el mismo análisis realizado para el CBD aislado también logró confirmar esto, obteniendo un porcentaje relativo de CBD de 94,34 y de CBDV, Cannabicitran, CBD- β y THC inferiores al 0,5 % (ver **Figura 5-6**).

Los valores de composición relativa permiten pensar que la ausencia de THCV en el cannabidiol aislado y la razón de composiciones de CBDV en ambas matrices explicarían la diferencia estadística encontrada en el modelo de bajo umbral versus el aceite destilado. Investigaciones a nivel *in vivo* e *in vitro* han permitido demostrar la potencial actividad de estos metabolitos en las crisis convulsivas, mediados principalmente por canales TRP, quienes pueden afectar la excitabilidad en áreas epileptogénicas. En especial, la CBDV inhibe la diacilglicerol lipasa α , quien es la enzima responsable de la producción del endocannabinoide 2-AG, haciendo más disponible los receptores CB1 localizados en sitios del SNC para efectos excitatorios o inhibitorios relacionados con actividad epileptogénica (A. J. Hill, Mercier, et al., 2012).

Por otro lado, la composición relativa de las dos matrices llama la atención por el THC, quien en el aceite destilado puede estar involucrado en su índice de protección mayor, particularmente en el modelo de las crisis refractarias, ya que su proporción corresponde a aproximadamente 21 veces más sobre el cannabidiol aislado. Sin embargo, su perfil de seguridad impide su investigación extensiva a nivel clínico donde se debe evaluar su balance riesgo-beneficio. Considerando lo anterior y reconociendo las limitaciones regulatorias, sería interesante evaluar la efectividad del CBD en monoterapia versus el CBD en conjunto con THC a diferentes dosis para las crisis refractarias. Estas evaluaciones tal vez permitan elucidar una ruta desde la óptica preclínica para el rol de del THC en la terapéutica clínica de epilepsia multirresistente.

En adición, existen investigaciones que relacionan algunas especies ácidas de los fitocannabinoides con la protección de los individuos a dosis superiores a 30mg/Kg, evaluando ácido cannabidivarínico y cannabidiólico en el modelo de crisis clónicas a través de episodios de hipertermia (Anderson et al., 2019). Para la presente investigación, no fueron identificadas ni cuantificadas estas especies, por lo que se debería descartar completamente su presencia para de esta manera reconocer si su participación está relacionada con los índices de protección evidenciados.

Respecto a los compuestos de tipo isoprenoide; se extrajeron los componentes volátiles presentes en el aceite destilado de *Cannabis yoda* a través de un sistema de microextracción en fase sólida (SPME), y con ayuda de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas / impacto electrónico con automuestreador de espacio de cabeza GC-MS/EI - HS-SPME, se identificaron con porcentajes de coincidencia en los fragmentos de $m/z > 38\%$, los siguientes 21 compuestos volátiles mayoritarios: α -Pineno, β -Pineno, 2-(10)-Pineno, β -Mirceno, Cis-2,6-dimetil-2,6-Octadieno, Cosmeno, Terpinoleno, p-Cimeno, d-Limoneno, β -Ocimeno, Isoterpenoleno, α -p-dimetilestireno, 1,3,8-p-mentatrieno, Exo-fenchol, p-menta-1,5,8-trieno, Camfeno, β -Cariofileno, α -Guaieno, α -Humuleno, Azuleno y Naftaleno.

El perfil de terpenos mayoritarios identificado para la variedad *Cannabis yoda* coincide con reportes de la literatura en los cuales publican como terpenos mayoritarios en 108 quimiotipos comparados: β -Cariofileno, β -Mirceno, α -Pineno, α -Humuleno, d-Limoneno y β -Pineno. Quienes como se mencionó en la discusión de cada uno de los modelos evaluados, tienen una actividad como potenciadores del efecto de los cannabinoides en sí mismo, denominado efecto séquito; confirmado en modelos antitumorales y anticonvulsivantes para los cuales la actividad de las moléculas individuales no es superior que la de las moléculas en conjunto (Hanuš & Hod, 2020).

Finalmente, sería interesante establecer en que concentración tanto del fitocanabinoide como del terpeno, se evidencian los mejores índices de protección para las crisis convulsivas evaluadas.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Se pudo encontrar que el aceite destilado de *Cannabis yoda* y el cannabidiol aislado no interfieren en la actividad motora de los individuos en ninguna de las dosis administradas, por lo que se descartan posibles efectos neurotóxicos agudos. Esta información es valiosa para futuras investigaciones donde se quiera reconocer un perfil de seguridad de estos tipos de metabolitos.

Por otro lado, el aceite destilado de *Cannabis yoda* evidencia potencial actividad como agente anticonvulsivante, particularmente en las crisis de bajo umbral o refractarias a 6 Hz. Donde para todas las dosis se encontró una protección relevante. Adicionalmente, los resultados permitieron observar que el aceite destilado en conjunto de moléculas anexas al CBD, como otros fitocannabinoides y terpenos, aumenta su índice de protección versus el cannabidiol aislado.

Pese a que, estadísticamente en el modelo MES y PTZ algunas dosis no fueron significativamente protectoras de los individuos frente a las crisis tónicas, se debe resaltar que si hubo individuos protegidos. Considerando la naturaleza agresiva de esos ensayos, no se puede descartar su potencial actividad que si ha sido confirmada en otras investigaciones. Por esta razón, debe analizarse el protocolo utilizado y realizar los debidos ajustes que correspondan en materia de número de individuos, sexo, parámetros asignados, variables a medir y respuestas de los individuos.

Finalmente, se logró establecer un perfil fitoquímico preliminar del aceite destilado de *Cannabis yoda*, reconociendo principalmente los fitocannabinoides y compuestos de tipo isoprenoide mayoritarios. Lo que permitió atribuir y explicar las diferencias en los índices de protección para cada uno de los modelos evaluados, reconociendo la importancia del efecto séquito en la terapéutica de estos extractos.

7.2 Recomendaciones

En términos de los modelos evaluados, correspondientes a la batería preclínica de epilepsia, sería interesante evaluar un mayor número de individuos y más sustancias

aisladas como CBG, THCV, CBDV para poder acotar con mayor detalle la eficacia del aceite destilado de *Cannabis yoda*, superior a las moléculas en monoterapia. Asimismo, se sugiere agregar criterios de exclusión, ya que para la presente investigación solo se consideró edad y peso; seleccionando aleatoriamente machos y hembras que cumplieran esta característica, y para patologías como la epilepsia, se ha visto que las respuestas son dependientes de sexo, debido a que se conoce que en hembras con fluctuaciones hormonales dependientes de estrógeno y progesterona muestran una predisposición mayor a las crisis con un aumento de la severidad y frecuencia de los episodios convulsivos (Janisset et al., 2022). Razón que pudo sesgar los resultados obtenidos en los modelos MES y PTZ.

Por otro lado, se recomienda realizar estudios farmacocinéticos a nivel preclínico que permitan distinguir los procesos que sufren este tipo de moléculas por las diferentes vías de administración, debido a que para la presente investigación se realizó la administración por VO y usualmente se usa la vía intraperitoneal en estos modelos animales, no descartando su actividad anticonvulsivante.

Reconociendo las similitudes en la fisiopatología de la epilepsia, la Ansiedad y la Depresión, se aconseja realizar los ensayos preclínicos que correspondan para estas patologías utilizando las mismas dosis, con el objetivo de descartar su potencial actividad en estos blancos terapéuticos.

Finalmente, se propone que realizar una identificación del perfil fitoquímico de amplio espectro que contemple otro tipo de moléculas reconocidas en el género como lo son las formas ácidas de los cannabinoides, flavonoides, estilbenos, alcaloides, amidas fenólicas y lignanamidas, que a pesar de estar en una proporción baja respecto a cannabinoides y terpenos, pueden intervenir en la respuesta frente a crisis convulsivas.

Bibliografía

- Abramovici, S., & Bagić, A. (2016). Epidemiology of epilepsy. En *Handbook of Clinical Neurology* (1a ed., Vol. 138). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802973-2.00010-0>
- Alachkar, A., Ojha, S. K., Sadeq, A., Adem, A., Frank, A., Stark, H., & Sadek, B. (2020). Experimental Models for the Discovery of Novel Anticonvulsant Drugs: Focus on Pentylentetrazole-Induced Seizures and Associated Memory Deficits. *Current Pharmaceutical Design*, 26(15), 1693–1711. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200131105324>
- Amin, M. R., & Ali, D. W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1162, 151–165. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8
- Anderson, L. L., Low, I. K., Banister, S. D., McGregor, I. S., & Arnold, J. C. (2019). Pharmacokinetics of Phytocannabinoid Acids and Anticonvulsant Effect of Cannabidiolic Acid in a Mouse Model of Dravet Syndrome. *Journal of Natural Products*, 82(11), 3047–3055. <https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B00600>
- Arzimanoglou, A., Brandl, U., Cross, J. H., Gil-Nagel, A., Lagae, L., Landmark, C. J., Specchio, N., Nabbout, R., Thiele, E. A., & Gubbay, O. (2020). Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic Disorders : International Epilepsy Journal with Videotape*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1684/EPD.2020.1141>
- Asadi-Pooya, A. A., Brigo, F., Lattanzi, S., Karakis, I., Asadollahi, M., Trinkka, E., Talaat El Ghoneimy, L., Pretorius, C., Contreras, G., Daza-Restrepo, A., Valente, K., D'Alessio, L., Turuspekova, S. T., Aljandeel, G., Khachatryan, S., Ashkanani, A., Tomson, T., Kutlubaev, M., Guekht, A., ... Jusupova, A. (2021). Complementary and alternative medicine in epilepsy: A global survey of physicians' opinions. *Epilepsy & Behavior*, 117, 107835. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2021.107835>
- Atakan, Z. (2012). Cannabis, a complex plant: Different compounds and different effects on individuals. En *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* (Vol. 2, Issue 6, pp. 241–254). <https://doi.org/10.1177/2045125312457586>

- Bahi, A., al Mansouri, S., al Memari, E., al Ameri, M., Nurulain, S. M., & Ojha, S. (2014). β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiology & Behavior*, *135*, 119–124. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2014.06.003>
- Barker-Haliski, M., & Steve White, H. (2020). Validated animal models for antiseizure drug (ASD) discovery: Advantages and potential pitfalls in ASD screening. *Neuropharmacology*, *167*. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.107750>
- Beghi, E. (2020). The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*, *54*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1159/000503831>
- Ben-Shabat, S., Fride, E., Sheskin, T., Tamiri, T., Rhee, M. H., Vogel, Z., Bisogno, T., de Petrocellis, L., di Marzo, V., & Mechoulam, R. (1998). An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *European Journal of Pharmacology*, *353*(1), 23–31. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00392-6)
- Blair, R. E., Deshpande, L. S., & DeLorenzo, R. J. (2015). Cannabinoids: is there a potential treatment role in epilepsy? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *16*(13), 1911.
- Bromfield, E., Cavazos, J., & Sirven, J. (2006). An Introduction to Epilepsy. *West Hartford (CT): American Epilepsy Society, Chapter 1*, 1–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2510/>
- Burstein, S., Levin, E., & Varanelli, C. (1973). Prostaglandins and cannabis-II inhibition of biosynthesis by the naturally occurring cannabinoids. *Biochemical Pharmacology*, *22*(22), 2905–2910. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90158-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90158-5)
- Carrizosa Moog, J. (2007). Prevalencia, Incidencia y Brecha terapéutica en la Epilepsia. *Iatreia*, *20*(3), 282–296.
- Castel-Branco, M. M., Alves, G. L., Figueiredo, I. v., Falcão, A. C., & Caramona, M. M. (2009). The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, *31*(2), 101–106. <https://doi.org/10.1358/MF.2009.31.2.1338414>
- Cogan, P. S. (2020). The “entourage effect” or “hodge-podge hashish”: the questionable rebranding, marketing, and expectations of cannabis polypharmacy. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *13*(8), 835–845. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1721281>
- Ley No. 1787, (2016).
- Cote, M., Quevedo, W., Sabogal, JS., Martinez, E., Cruz, U., Lastra, S., Riaño, M., Peña, A., & Reyes, Y. (2015). *Marihuana Cannabis, Aspectos toxicológicos, clínicos*,

- sociales y potenciales usos terapéuticos.* (Jairo. Tellez, Ed.).
<https://docplayer.es/38004528-Marihuana-cannabis-aspectos-toxicologicos-clinicos-sociales-y-potenciales-usos-terapeuticos-jairo-tellez-mosquera-editor.html>
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W. G., Martinez-Orgado, J., Robson, P. J., Rohrback, B. G., Thiele, E., Whalley, B., & Friedman, D. (2014). Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, *55*(6), 791–802. <https://doi.org/10.1111/epi.12631>
- Devinsky, Orrin., Schachter, S. C., & Pacia, S. (2005). *Complementary and alternative therapies for epilepsy*. Demos.
- di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *12*(4), 692–698. <https://doi.org/10.1007/S13311-015-0374-6>
- Enna, S. J. (1998). *Current protocols in pharmacology*.
https://books.google.com/books/about/Current_Protocols_in_Pharmacology.html?hl=es&id=IYnOjwEACAAJ
- Espinosa Jovel, C. A., Pardo, C. M., Moreno, C. M., Vergara, J., Hedmont, D., & Sobrino Mejía, F. E. (2016). Perfil demográfico y social de la epilepsia en una población vulnerable y de bajos recursos económicos en Bogotá, Colombia. *Neurología*, *31*(8), 528–534. <https://doi.org/10.1016/J.NRL.2014.10.016>
- Falco-Walter, J. (2020). Epilepsy-Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. *Seminars in Neurology*, *40*(6), 617–623. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1718719>
- Farag, S., & Kayser, O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. En *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment* (pp. 3–12). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
- 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).
<https://doi.org/10.3390/IJERPH18083993>
- FDA. (2019). *FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD)*. U.S Food & Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd>

- Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W. J., Dorsey, E. R., Elbaz, A., Ellenbogen, R. G., Fisher, J. L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S. L., Johnson, C. O., Kassebaum, N. J., Logroscino, G., Marin, B., ... Vos, T. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, *18*(5), 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X/ATTACHMENT/2830E1E6-5A7C-42F2-AC83-0BD8437532C0/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X/ATTACHMENT/2830E1E6-5A7C-42F2-AC83-0BD8437532C0/MMC1.PDF)
- Ferber, S. G., Namdar, D., Hen-Shoval, D., Eger, G., Koltai, H., Shoval, G., Shbiro, L., & Weller, A. (2020). The “Entourage Effect”: Terpenes Coupled with Cannabinoids for the Treatment of Mood Disorders and Anxiety Disorders. *Current Neuroparmacology*, *18*(2), 87–96. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190903103923>
- Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C. S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D. L., & Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, *88*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, *55*(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Helen Cross, J., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshe, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Clasificación operacional de los tipos de crisis por la Liga Internacional contra la Epilepsia: Documento-Posición de la Comisión para Clasificación y Terminología de la ILAE. *Epilepsia*, *58*(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- Friedman, D., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, *373*(11), 1048–1058. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1407304>
- Gaston, T. E., & Friedman, D. (2017). Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy & Behavior: E&B*, *70*(Pt B), 313–318. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2016.11.016>
- Gaston, T. E., & Szaflarski, J. P. (2018). Cannabis for the Treatment of Epilepsy: an Update. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *18*(11). <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0882-y>

- Giardina, W. J. (2000). Models of Epilepsy: Electroshock and Chemical Induced Convulsions in the Mouse. *Current Protocols in Pharmacology*, 10(1), 5.22.1-5.22.22. <https://doi.org/10.1002/0471141755.PH0522S10>
- Gina W, Alejandro G, Luis R, Elkin O, & Luis C. (2014). *Guía de Práctica Clínica (GPC) sobre diagnóstico y tratamiento de epilepsia*.
- Golub, V., & Reddy, D. S. (2021). Cannabidiol Therapy for Refractory Epilepsy and Seizure Disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1264, 93–110. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_7
- Gomes, P. B., Feitosa, M. L., Silva, M. I. G., Noronha, E. C., Moura, B. A., Venâncio, E. T., Rios, E. R. V., de Sousa, D. P., de Vasconcelos, S. M. M., Fonteles, M. M. de F., & de Sousa, F. C. F. (2010). Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 96(3), 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2010.05.019>
- Gómez, JG., Arciniegas, E., & Torres, J. (1978). Prevalence of epilepsy in Bogotá, Colombia. *Neurology*, 28, 90–94.
- Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 25–60. <https://doi.org/10.1159/000509733>
- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). Cannabis sativa and Hemp. En *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* (pp. 735–754). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>
- Hill, A. J., Mercier, M. S., Hill, T. D. M., Glyn, S. E., Jones, N. A., Yamasaki, Y., Futamura, T., Duncan, M., Stott, C. G., Stephens, G. J., Williams, C. M., & Whalley, B. J. (2012). Cannabidiol is anticonvulsant in mouse and rat. *British Journal of Pharmacology*, 167(8), 1629–1642. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.02207.X>
- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 133(1), 79–97. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2011.09.002>
- Hill, T. D. M., Cascio, M. G., Romano, B., Duncan, M., Pertwee, R. G., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Hill, A. J. (2013). Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 170(3), 679–692. <https://doi.org/10.1111/bph.12321>
- Huntsman, R. J., Tang-Wai, R., & Shackelford, A. E. (2020). Cannabis for Pediatric Epilepsy. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American*

Electroencephalographic Society, 37(1), 2–8.
<https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000641>

INVIMA. (2022). *Sistema de Tramites en Linea - Consultas Publicas*.

https://consultaregistro.invima.gov.co/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp

Janisset, N. R. L. L., Romariz, S. A. A., Hashiguchi, D., Quintella, M. L., Gimenes, C., Yokoyama, T., Filev, R., Carlini, E., Barbosa da Silva, R., Faber, J., & Longo, B. M. (2022). Partial protective effects of cannabidiol against PTZ-induced acute seizures in female rats during the proestrus-estrus transition. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 129. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2022.108615>

Jin, Y., Cui, R., Zhao, L., Fan, J., & Li, B. (2019). Mechanisms of Panax ginseng action as an antidepressant. *Cell Proliferation*, 52(6). <https://doi.org/10.1111/CPR.12696>

Joshi, S. M., Singh, R. K., & Shellhaas, R. A. (2013). Advanced treatments for childhood epilepsy: Beyond antiseizure medications. En *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* (Vol. 167, Issue 1, pp. 76–89). <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.424>

Karler, R., & Turkanis, S. A. (1980). Subacute cannabinoid treatment: anticonvulsant activity and withdrawal excitability in mice. *British Journal of Pharmacology*, 68(3), 479–484. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1980.tb14562.x>

Kitanaka, J., Kitanaka, N., Scott Hall, F., Uhl, G. R., Tanaka, K. I., Nishiyama, N., & Takemura, M. (2012). Straub tail reaction in mice treated with σ_1 receptor antagonist in combination with methamphetamine. *Brain Research*, 1482, 40–46. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2012.09.001>

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(7), 1939–1948. <https://doi.org/10.1007/S11064-017-2287-8>

Knupp, K. G., Rice, J. D., Helmkamp, L. J., Galinkin, J., Sempio, C., Jost, K., & Chapman, K. E. (2019). Prospective evaluation of oral cannabis extracts in children with epilepsy. *Seizure*, 72, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.09.007>

Kuribara, H., Higuchi, Y., & Tadokoro, S. (1977). Effects of Central Depressants on Rota-Rod and Traction Performances in Mice. *Japanese Journal of Pharmacology*, 27(1), 117–126. <https://doi.org/10.1254/JJP.27.117>

Laura C. Ruíz, & Cesar G. Girón. (2022). *Implementación del modelo de convulsión con descargas eléctricas de baja frecuencia*. Universidad Nacional de Colombia.

Linnaeus, C. (1753). *Tropicos | Name - Cannabis sativa L.*
<http://www.tropicos.org/Name/21302042>

- López, Á., Esther, G., Niizawa, C., & Martínez, R. (2014). Cannabis sativa L., una planta singular. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4).
- Löscher, W. (2017a). Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochemical Research*, 42(7), 1873–1888. <https://doi.org/10.1007/S11064-017-2222-Z>
- Löscher, W. (2017b). The Search for New Screening Models of Pharmacoresistant Epilepsy: Is Induction of Acute Seizures in Epileptic Rodents a Suitable Approach? *Neurochemical Research*, 42(7), 1926–1938. <https://doi.org/10.1007/S11064-016-2025-7>
- Lowe, H., Toyang, N., Steele, B., Bryant, J., & Ngwa, W. (2021). The Endocannabinoid System: A Potential Target for the Treatment of Various Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/IJMS22179472>
- Lowenstein, D. H. (2018). Convulsiones y epilepsia. En J. L. Jameson, A. S. Fauci, D. L. Kasper, S. L. Hauser, D. L. Longo, & J. Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e*. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162004996>
- Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry. Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607–615. <https://doi.org/10.1016/J.BPSC.2020.07.016>
- Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of Neuroendocrinology*, 20 Suppl 1(SUPPL. 1), 10–14. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2008.01671.X>
- Mangoato, I. M., Mahadevappa, C. P., & Matsabisa, M. G. (2019). Cannabis sativa L. Extracts can reverse drug resistance in colorectal carcinoma cells in vitro. *Synergy*, 9. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2019.100056>
- Mann, A., & Chesselet, M. F. (2015). Techniques for Motor Assessment in Rodents. En *Movement Disorders: Genetics and Models: Second Edition* (pp. 139–157). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00008-1>
- McWilliam, M., & al Khalili, Y. (2019). *Idiopathic Generalized Epilepsy*.
- Mechoulam, R. (1982). Chemistry of Cannabis. En *Psychotropic Agents* (pp. 119–134). https://doi.org/10.1007/978-3-642-67770-0_7
- Mechoulam, R., & Hanuš, L. (2002). Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 121(1–2), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00144-5](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00144-5)

- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., & Hanuš, L. O. (2007). Cannabidiol – Recent Advances. *Chemistry & Biodiversity*, 4(8), 1678–1692. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790147>
- Megiddo, I., Colson, A., Chisholm, D., Dua, T., Nandi, A., & Laxminarayan, R. (2016). Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Epilepsia*, 57(3), 464–474. <https://doi.org/10.1111/epi.13294>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2017). *Epilepsia: mucho más que convulsiones*. 13/02/2017 Boletín de Prensa No 016 de 2017. <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Epilepsia-mucho-mas-que-convulsiones.aspx>
- Mlost, J., Bryk, M., & Starowicz, K. (2020). Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–22. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228870>
- Morai, R. M., & Díazii, C. P. (2017). Evolución de niños con insulto perinatal estimulados mediante un programa de atención comunitaria temprana. *Revista Cubana de Medicina Física y Rehabilitación*, 2(2), 3–14. <https://revrehabilitacion.sld.cu/index.php/reh/article/view/53>
- Morano, A., Fanella, M., Albin, 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*, 16, 381–396. <https://doi.org/10.2147/NDT.S203782>
- Mora-Pérez, A., & Hernández-Medel, M. del R. (2016). Actividad anticonvulsivante del extracto metanólico de tallo y raíz de *Kalanchoe pinnata* Lam. en ratones: Comparación con diazepam. *Neurología*, 31(3), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.008>
- Neves, G., Menegatti, R., Antonio, C. B., Graziottin, L. R., Vieira, R. O., Rates, S. M. K., Noël, F., Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. M. (2010). Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(5), 1925–1935. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2010.01.040>
- Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Sander, J. W., & Newton, C. R. (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia*, 51(5), 883–890. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>
- NICE. (2022). *Epilepsies in children, young people and adults NICE guideline*. www.nice.org.uk/guidance/ng217

- O'Connell, B. K., Gloss, D., & Devinsky, O. (2017). Cannabinoids in treatment-resistant epilepsy: A review. *Epilepsy & Behavior: E&B*, *70*(Pt B), 341–348. <https://doi.org/10.1016/J.YEBEH.2016.11.012>
- Organización Mundial de la Salud. (2022, febrero 9). *Epilepsia*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
- Orozco-Hernández, J. P., Quintero-Moreno, J. F., Marín-Medina, D. S., Castaño-Montoya, J. P., Hernández-Coral, P., Pineda, M., Vélez, J. D., Villada, H. C., Martínez, J. W., & Lizcano, A. (2019). Perfil clínico y sociodemográfico de la epilepsia en adultos de un centro de referencia de Colombia. *Neurología*, *34*(7), 437–444. <https://doi.org/10.1016/J.NRL.2017.02.013>
- Pack, A. M. (2019). Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, *25*(2), 306–321. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000707>
- Pamplona, F. A., da Silva, L. R., & Coan, A. C. (2018). Potential Clinical Benefits of CBD-Rich Cannabis Extracts Over Purified CBD in Treatment-Resistant Epilepsy: Observational Data Meta-analysis. *Frontiers in Neurology*, *9*(SEP). <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2018.00759>
- Patil, M. S., Patil, C. R., Patil, S. W., & Jadhav, R. B. (2011). Anticonvulsant activity of aqueous root extract of *Ficus religiosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(1), 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.004>
- Patra, P. H., Barker-Haliski, M., White, H. S., Whalley, B. J., Glyn, S., Sandhu, H., Jones, N., Bazelot, M., Williams, C. M., & 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. <https://doi.org/10.1111/EPI.14629>
- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Perucca, P., & Gilliam, F. G. (2012). Adverse effects of antiepileptic drugs. *The Lancet. Neurology*, *11*(9), 792–802. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70153-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70153-9)
- Porcari, G. S., Fu, C., Doll, E. D., Carter, E. G., & Carson, R. P. (2018). Efficacy of artisanal preparations of cannabidiol for the treatment of epilepsy: Practical experiences in a tertiary medical center. *Epilepsy and Behavior*, *80*, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.01.026>

- Porter, R. J., Dhir, A., Macdonald, R. L., & Rogawski, M. A. (2012). Mechanisms of action of antiseizure drugs. *Handbook of Clinical Neurology*, 108, 663–681. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52899-5.00021-6>
- Ricotti, V., & Delanty, N. (2006). Use of complementary and alternative medicine in epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 6(4), 347–353. <https://doi.org/10.1007/S11910-006-0029-4>
- Rock, E. M., & Parker, L. A. (2021). Constituents of Cannabis Sativa. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1264, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_1
- Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12(4), 747–768. <https://doi.org/10.1007/S13311-015-0375-5>
- Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01238.X>
- Russo, E. B. (2018). The Case for the Entourage Effect and Conventional Breeding of Clinical Cannabis: No “Strain,” No Gain. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01969>
- Russo, E., & Grotenhermen, F. (2013). *Cannabis and Cannabinoids Pharmacology , Toxicology , .*
- Savic, I. (2014). Sex differences in human epilepsy. En *Experimental Neurology* (Vol. 259, pp. 38–43). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.009>
- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Nordli, D. R., & Dra Ingrid Scheffer, L. E. (2017). DOCUMENTO DE POSICIÓN DE LA ILAE Clasificación de las epilepsias de la ILAE: Documento de posición de la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE. 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Sills, G. J., & Brodie, M. J. (2009). Antiepileptic Drugs: Preclinical Drug Development in Epilepsy. En *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* (pp. 97–103). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012373961-2.00032-1>
- Singh, A., & Trevick, S. (2016). The Epidemiology of Global Epilepsy. En *Neurologic Clinics* (Vol. 34, Issue 4, pp. 837–847). <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.015>
- Singh, T., Mishra, A., & Goel, R. K. (2021). PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1573–1590. <https://doi.org/10.1007/S11011-021-00823-3>

- Smith, M. D., Metcalf, C. S., & Wilcox, K. S. (2019). Farmacoterapia de la epilepsia. En *Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica* (13a ed., pp. 1–38).
- Souza, M. A., Scapinello, J., Guzatti, J. G. G., Scatolin, M., Martello, R., Schindler, M. S. Z., Calisto, J. F. F., Alves, B., Morgan, L. v., Oliveira, J. V., Magro, J. D., & Müller, L. G. (2021). Antinociceptive effect and mechanism of supercritical carbon dioxide extract of *Aloysia gratissima* leaves in mice. *Biomedical Journal*, *44*(6), S63–S72. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2020.06.009>
- Stephen, L. J., & Brodie, M. J. (2000). Epilepsy in elderly people. En *Lancet* (Vol. 355, Issue 9213, pp. 1441–1446). Elsevier Limited. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02149-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02149-8)
- 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. <https://doi.org/10.1111/BPH.15185>
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet (London, England)*, *393*(10172), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
- Thomas, A., Stevenson, L. A., Wease, K. N., Price, M. R., Baillie, G., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2005). Evidence that the plant cannabinoid Δ 9-tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB 1 and CB 2 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, *146*(7), 917–926. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706414>
- Thomas, B. F., & ElSohly, M. A. (2016). The Botany of *Cannabis sativa* L. En *The Analytical Chemistry of Cannabis* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804646-3.00001-1>
- Torres-Hernández, B. A., del Valle-Mojica, L. M., & Ortiz, J. G. (2015). Valerenic acid and *Valeriana officinalis* extracts delay onset of Pentylentetrazole (PTZ)-Induced seizures in adult *Danio rerio* (Zebrafish). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0731-3>
- Tzadok, M., Uliel-Siboni, S., Linder, I., Kramer, U., Epstein, O., Menascu, S., Nissenkorn, A., Yosef, O. B., Hyman, E., Granot, D., Dor, M., Lerman-Sagie, T., & Ben-Zeev, B. (2016). CBD-enriched medical cannabis for intractable pediatric epilepsy: The current Israeli experience. *Seizure*, *35*, 41–44. <https://doi.org/10.1016/J.SEIZURE.2016.01.004>
- Uliel-Sibony, S., Hausman-Kedem, M., Fattal-Valevski, A., & Kramer, U. (2021). Cannabidiol-enriched oil in children and adults with treatment-resistant epilepsy-does tolerance exist? *Brain and Development*, *43*(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2020.06.018>

- Uttl, L., Hložek, T., Mareš, P., Páleníček, T., & Kubová, H. (2021). Anticonvulsive Effects and Pharmacokinetic Profile of Cannabidiol (CBD) in the Pentylentetrazol (PTZ) or N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Models of Seizures in Infantile Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010094>
- van Vliet, E. A., & Gorter, J. A. (2017). Electrical Stimulation Seizure Models. En *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition* (pp. 474–488). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804066-9.00034-1>
- Velez, A., & Eslava-Cobos, J. (2006). Epilepsy in Colombia: Epidemiologic profile and classification of epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, 47(1), 193–201. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00387.x>
- Vezzani, A., Balosso, S., & Ravizza, T. (2019). Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews. Neurology*, 15(8), 459–472. <https://doi.org/10.1038/S41582-019-0217-X>
- Wallace, M. J., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2002). Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *European Journal of Pharmacology*, 452(3), 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)02331-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)02331-2)
- Wallace, M. J., Wiley, J. L., Martin, B. R., & DeLorenzo, R. J. (2001). Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid anticonvulsant effects. *European Journal of Pharmacology*, 428(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01243-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01243-2)
- Witherspoon, E., Quinlan, S., & Forcelli, P. A. (2022). Preclinical efficacy of cannabidiol for the treatment of early-life seizures. *Pharmacological Reports : PR*, 74(5), 1092–1098. <https://doi.org/10.1007/S43440-022-00413-9>
- Yeung, K. S., Hernandez, M., Mao, J. J., Haviland, I., & Gubili, J. (2018). Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. *Phytotherapy Research : PTR*, 32(5), 865–891. <https://doi.org/10.1002/PTR.6033>
- Zagaja, M., Bryda, J., Szewczyk, A., Szala-Rycaj, J., Łuszczki, J. J., Walczak, M., Kuś, K., & Andres-Mach, M. (2022). Xanthotoxin enhances the anticonvulsant potency of levetiracetam and valproate in the 6-Hz corneal stimulation model in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 36(1), 133–142. <https://doi.org/10.1111/FCP.12713>