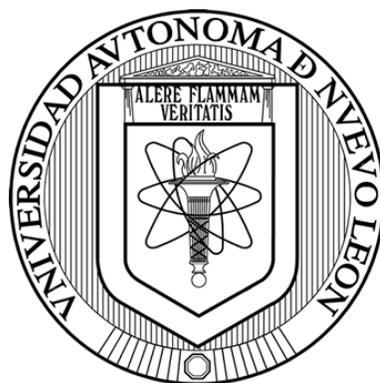


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE  
CANNABIDIOL Y SU METABOLITO ACTIVO EN COMBINACIÓN CON  
MOLÉCULAS Y FÁRMACOS PRESUNTAMENTE NEUROPROTECTORES**

**Por:**

**M.C. Jesús Vélez Huerta**

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS  
con Orientación en Farmacia**

**Agosto 2024**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE CANNABIDIOL Y SU  
METABOLITO ACTIVO EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS Y FÁRMACOS  
PRESUNTAMENTE NEUROPROTECTORES

Aprobación de la Tesis

---

DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA  
**Presidente**

---

DR. EDER U. ARREDONDO ESPINOZA  
**Secretario**

---

DRA MARIA DOLORES RONQUILLO SANCHEZ  
**Vocal**

---

DR. CHRISTIAN TADEO BADILLO CASTAÑEDA  
**Vocal**

---

DRA. JESSICA ARGENTINA GONZALEZ CARDENAS  
**Vocal**

---

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS  
**Sub-Directora de Posgrado**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE CANNABIDIOL Y SU  
METABOLITO ACTIVO EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS Y FÁRMACOS  
PRESUNTAMENTE NEUROPROTECTORES

Revisión de la Tesis

---

DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

**Director**

---

DR. OMAR GONZALEZ SANTIAGO

**Co-Director**

---

DRA MARIA DOLORES RONQUILLO SANCHEZ

**Comité tutorial**

---

DRA. SONIA MONTERO MOLINA

**Comité tutorial**

---

DR. EDER U. ARREDONDO ESPINOZA

**Comité tutorial**

---

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

**Sub-Directora de Posgrado**

## RESUMEN

M.C. Jesús Vélez Huerta

Fecha de Graduación: Diciembre 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio:** Evaluación *in vitro* del efecto neuroprotector de cannabidiol y su metabolito activo en combinación con moléculas y fármacos presuntamente neuroprotectores

**Número de páginas:** Candidato al grado de Doctor en  
Ciencias con Orientación en Farmacia

**Propósito y Método del Estudio:** Se ha reportado que la actividad neuroprotectora del CBD se debe a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores, en modelos *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, existen otros fármacos que se utilizan con un fin terapéutico específico, pero con el tiempo y mediante el análisis de historias clínicas se ha reportado que tienen efectos presumiblemente neuroprotectores, tal es el caso del valproato, furosemida, bilobalida y metformina. Estas moléculas han tenido efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos. Sin embargo, no hay evidencia sobre la posible sinergia que existe al combinarse con el CBD, ya que es una molécula cada vez más utilizada para tratar diferentes tipos de padecimientos. Los resultados obtenidos en el presente proyecto demuestran la actividad neuroprotectora del CBD 5  $\mu\text{M}$ , 7-OH-CBD 5  $\mu\text{M}$  y bilobalida 15.3  $\mu\text{M}$  por inhibición de ROS, disminución de la actividad de caspasa-3 en la línea celular PC12 al inducir daño por glutamato 25 mM. Sin embargo, no se observó ningún efecto sinérgico de las combinaciones con CBD. En el caso del valproato 433,4  $\mu\text{M}$  y la furosemida 604,7  $\mu\text{M}$ , no tuvieron actividad neuroprotectora, ya que fueron los fármacos que más disminuyeron la viabilidad celular a las dosis utilizadas, así como aumentaron la producción de ROS. La metformina 1548,4  $\mu\text{M}$  no proporcionó una neuroprotección significativa, pero disminuyó la generación de ROS.

**Contribuciones y Conclusiones:** El CBD y el 7-OH-CBD presentan actividad neuroprotectora en células PC12 previamente expuestas a glutamato 25 mM. La actividad neuroprotectora de CBD y 7-OH-CBD no mejora cuando cada uno se combina con furosemida, valproato y metformina. Bilobalida mostró actividad neuroprotectora, sin embargo, no mejora cuando se mezcla con CBD. CBD, bilobalida y metformina disminuyen la producción de ROS, pero solo el CBD disminuye la actividad de la caspasa-3. Ninguna combinación muestra efectos sinérgicos.

### Firma de los directores de tesis

---

Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera

Director de Tesis

---

Dr. Omar González Santiago

Codirector de Tesis

## AGRADECIMIENTOS



A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el financiamiento del proyecto.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada.



A la Facultad de Ciencias Químicas por la infraestructura y las facilidades otorgadas para el presente trabajo de investigación.

A la Dra. Mónica A. Ramírez Cabrera, por siempre estar presente en el desarrollo del trabajo, por su entusiasmo y la confianza otorgada. Además, por todo el aprecio y apoyo durante todo el proceso del posgrado. No hay palabras para agradecer todo el apoyo recibido.

Agradezco al Dr. Omar González Santiago, por todo el apoyo, los comentarios y aportes en la realización del presente trabajo, así como el apoyo recibido durante el transcurso del posgrado.

A la Dra. Sonia Montero Molina, por sus aportes al desarrollo del proyecto, por cada una de sus observaciones y acertados comentarios para la mejora del presente trabajo.

A la Dra. María Dolores Ronquillo Sánchez, por todo el interés mostrado en el desarrollo del presente trabajo, así como por sus comentarios y observaciones que enriquecieron el contenido del mismo.

Al Dr. Eder U. Arredondo Espinoza, por permitirme realizar el proyecto en Laboratorio de farmacología molecular y modelos biológicos. Además, por las observaciones realizadas en las revisiones, por compartir su conocimiento en el área de cultivo celular; así como por su disposición y comentarios realizados.

## DEDICATORIA

*A la memoria de Marcos Vélez Huerta.*

A mi madre, Ventura Huerta por todo el cariño, apoyo y respaldo en cada una de mis decisiones, por siempre estar presente para mi y por ser mi inspiración y fortaleza para siempre seguir adelante.

A Rosario Vélez, por el apoyo y respaldo recibido en todas las etapas de mi vida, por siempre motivarme a esforzarme más para cumplir mis metas.

A Santiago Ramírez, por ser parte de la motivación para ser siempre alguien mejor.

A Marina Vélez por estar presente en mi vida y darme el regalo de vivir. Por desear y buscar siempre un mejor futuro para mí.

A Gerardo Camacho por siempre apoyarme y motivarme a ser una mejor versión de mí, por su confianza y palabras de aliento que me empujan a seguir esforzándome.

A mis amigos del posgrado, Reyna Gallegos y Jorge Zacatecas por las palabras de apoyo mutuas para motivarnos a seguir y esforzarnos en cada uno de nuestros proyectos. Así mismo, a Yuridia Torres por la compañía, pláticas y apoyo durante el posgrado y ahora en el ámbito profesional llevando por buen camino el trabajo en equipo.

A Jacob Guajardo por alentarme para dar el último empujoncito. Por el interés mostrado en mis proyectos, su apoyo cariñoso y palabras de aliento.

A mis amigos de toda la vida, Ofir y Carmen por siempre estar presentes y compartir vida conmigo.

A Carlos Ramírez por su apoyo y comprensión durante el transcurso del posgrado.

A Irma Ramírez por sus llamadas de atención y motivación para terminar con bien esta etapa.

A David López por sus palabras de apoyo y motivación durante el posgrado y la pandemia.

A cada una de las personas que durante mi paso por el posgrado siempre tuvieron palabras de aliento y me apoyaron para seguir adelante en cada una de las etapas, esto es para ustedes.

**“La disciplina, tarde o temprano, vencerá a la inteligencia” -Yokoi Kenji**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Generalidades .....	1
1.2 Cannabidiol.....	3
1.3 Valproato .....	5
1.4 Furosemida.....	6
1.5 Bilobalida .....	8
1.6 Metformina.....	10
1.7 Reposicionamiento farmacológico .....	11
1.8 Enfermedades neurodegenerativas .....	12
1.8.1 Enfermedad de Alzheimer.....	13
1.8.1.1 Tratamiento farmacológico para la enfermedad de Alzheimer .....	14
1.8.2 Enfermedad de Parkinson .....	15
1.8.3 Esclerosis lateral amiotrófica.....	17
1.8.4 Enfermedad de Huntington .....	20
1.8.5 Accidente cerebrovascular isquémico agudo .....	23
1.9 Neuroprotección .....	24
1.9.1 Generalidades de efecto neuroprotector .....	25
1.9.2 Tratamientos potencialmente neuroprotectores .....	26
1.9.3 Principales procesos fisiológicos relacionados con neurodegeneración .....	29
1.10 Excitotoxicidad y neurodegeneración .....	30
1.10.1 Excitotoxicidad y ELA.....	31
1.10.2 Excitotoxicidad y enfermedad de Alzheimer.....	32
1.10.3 Excitotoxicidad y epilepsia .....	34
1.11 Tipos de neuroprotección .....	35

1.12	Antecedentes.....	37
1.12.1	Actividad neuroprotectora de CBD .....	37
1.12.2	Actividad neuroprotectora de valproato.....	40
1.12.3	Actividad neuroprotectora de furosemida.....	42
1.12.4	Actividad neuroprotectora de bilobalida .....	43
1.12.5	Actividad neuroprotectora de metformina.....	45
1.13	Hipótesis.....	47
1.14	Justificación .....	47
1.15	Objetivo general.....	48
1.15.1	Objetivos específicos .....	48
CAPÍTULO 2.....		50
MATERIALES Y MÉTODOS.....		50
2.1	Material y reactivos.....	50
2.1.2	Equipos e instrumentos .....	51
2.1.3	Reactivos.....	51
2.2	Métodos.....	52
2.2.1	Evaluación de la actividad neurotóxica mediante el ensayo de MTT 54	
2.2.2	Ensayo de neuroprotección mediante el ensayo de MTT .....	55
2.2.3	Ensayo de capacidad antioxidante mediante inhibición de DPPH	57
2.2.4	Actividad de inhibición de especies reactivas de oxígeno.....	57
2.2.5	Evaluación de la actividad de caspasa-3 .....	58
2.3	Manejo de los residuos .....	61
CAPÍTULO 3.....		62
RESULTADOS.....		62
3.1	Actividad neurotóxica .....	62
3.2	Actividad neuroprotectora.....	66
3.3	Capacidad antioxidante .....	69
3.4	Actividad inhibidora de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	73

3.5 Actividad de caspasa-3.....	77
CAPÍTULO 4 .....	79
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	79
4.1 Actividad neurotóxica.....	79
4.2 Actividad neuroprotectora .....	83
4.3 Capacidad antioxidante .....	86
4.4 Actividad inhibidora de producción de especies reactivas de oxígeno	89
CAPÍTULO 5 .....	92
CONCLUSIONES .....	92
PERSPECTIVAS .....	93
CAPÍTULO 6.....	93
6.1 REFERENCIA.....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructura del cannabidiol.....	3
2. Mecanismos de neuroprotección de CBD.....	4
3. Estructura de valproato.....	5
4. Mecanismos de neuroprotección de valproato.....	6
5. Estructura de furosemida.....	6
6. Mecanismos de neuroprotección de furosemida.....	8
7. Estructura de bilobalida.....	8
8. Mecanismos de neuroprotección de bilobalida.....	9
9. Estructura de metformina.....	10
10. Mecanismos de neuroprotección de metformina.....	11
11. Actividad neurotóxica de CBD, solo y combinado con fármacos.....	63
12. Actividad neurotóxica de 7-OH-CBD, solo y combinado con fármacos.....	64
13. Actividad neurotóxica de RHOil, solo y combinado con fármacos.....	65
14. Actividad neuroprotectora de CBD, solo y combinado con fármacos.....	67
15. Actividad neuroprotectora de 7-OH-CBD, solo y combinado con fármacos.....	68
16. Actividad neuroprotectora de RHOil, solo y combinado con fármacos.....	69
17. Capacidad antioxidante de CBD, solo y combinado con fármacos.....	70
18. Capacidad antioxidante de 7-OH-CBD, solo y combinado con fármacos.....	71
19. Capacidad antioxidante de RHOil, solo y combinado con fármacos.....	72
20. Actividad inhibidora de producción de ROS de CBD solo y en combinación con fármacos.....	74
21. Actividad inhibidora de producción de ROS de 7-OH-CBD solo y en combinación con fármacos.....	75
22. Actividad inhibidora de producción de ROS de RHOil solo y en combinación con fármacos.....	76
23. Evaluación de la actividad de caspasa-3.....	78

## Nomenclatura

°C	Grados Celsius
μmol	Micromol
A-549	Células de cáncer de pulmón
AGCM	Ácidos Grasos de Cadena Media
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Trifosfato de adenosina
Bil	Bilobalida
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CBD	Cannabidiol
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
DTT	Ditriotreitol
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro

Fur	Furosemida
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GAE	Equivalente de Ácido Gálico
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
h	Horas
H <sub>2</sub> O	Agua
Hex	Hexano
IC <sub>50</sub>	Concentración media inhibitoria
kDa	Kilodalton
MAO	Mono amina oxidasa
MeOH	Metanol
Met	Metformina
mg	Miligramos
mGluR	Receptor Metabotrópico de Glutamato
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NL	Nuevo León
nm	Nanómetro
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-Aspartato
NMDARs	Receptores de NMDA
nNOS	Sintasa de óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PARP-1	poly-ADP-ribosa polimerasa-1
PBN	$\alpha$ -fenil- <i>N</i> -terbutilnitrona
PC12	Células de feocromocitoma de médula supradrenal de rata
pH	Potencial hidrógeno
ARN	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SH-SY5Y	Células de neuroblasto humano
SP1	Factor de transcripción promotor de polimerasa II
SOD-1	Superóxido Dismutasa 1
t-BHP	Terc-Butilo Hidroperóxido
THP-1	Células de leucemia humana

Val	Valproato
WST-1	Sal de tetrazolio soluble en agua
$\mu\text{L}$	Microlitro

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Generalidades**

El efecto neuroprotector se define como la prevención de la muerte de células neuronales al intervenir e inhibir el proceso patológico que provoca la disfunción y muerte neuronal (Farooqui 2022). Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan principalmente por la pérdida de neuronas (Lamprey *et al.* 2022) y aunque actualmente existen una gran variedad de medicamentos, tratamientos herbolarios y métodos quirúrgicos aprobados para el manejo y cuidado de enfermedades neurodegenerativas (Mitrofanis 2020), la gran mayoría solo ayuda con la sintomatología y no modifican la enfermedad (Lamprey *et al.* 2022; Mitrofanis 2020). Dentro de las principales enfermedades neurodegenerativas se encuentra la enfermedad de Alzheimer, en México, actualmente existen aproximadamente 860 000 adultos con más de 60 años de

edad afectados por algún tipo de demencia, siendo la enfermedad de Alzheimer la responsable del 50 a 70% de los casos de demencia (Reyes-Pablo et al. 2020).

La actividad neuroprotectora de diversos compuestos como efecto añadido ha sido documentada, de tal forma que el ácido valpróico, un antiepiléptico cuya estructura consiste en ser un ácido graso de cadena ramificada ha presentado actividad neuroprotectora en modelos *in vitro* e *in vivo* mediante el mecanismo propuesto de inhibición de histonas deacetilasa (Kanai y Chen 2004; Siqueira *et al.* 2018).

Metformina, el antidiabético primariamente indicado como tratamiento de *Diabetes mellitus* tipo 2, de igual manera ha demostrado tener actividad neuroprotectora por propiedades antioxidantes, (Patil *et al.* 2014) inhibitoria de apoptosis (Detaille et al. 2008) y antiepiléptica (Zhao *et al.* 2014). Furosemida ha presentado actividad neuroprotectora y moduladora de procesos inflamatorios de microglía ( Wang *et al.* 2020). Bilobalida es un sesquiterpeno trilactona componente del extracto de Ginkgo biloba, ha demostrado tener actividad neuroprotectora contra isquemia y actividad antiexcitotóxica, (Chandrasekaran *et al.* 2003) así como antioxidante y antiepiléptica (Abdel-Waha y Metwally 2011).

## 1.2 Cannabidiol

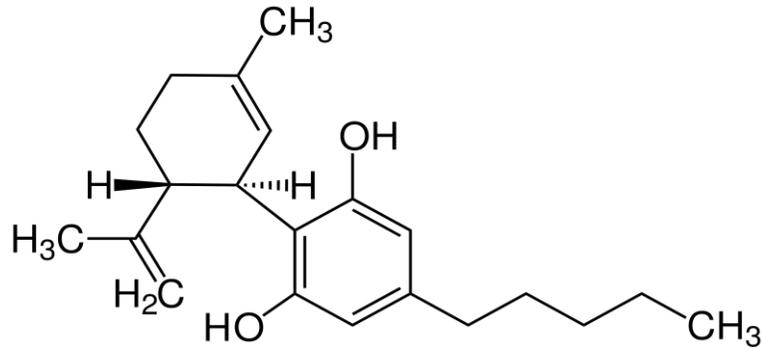
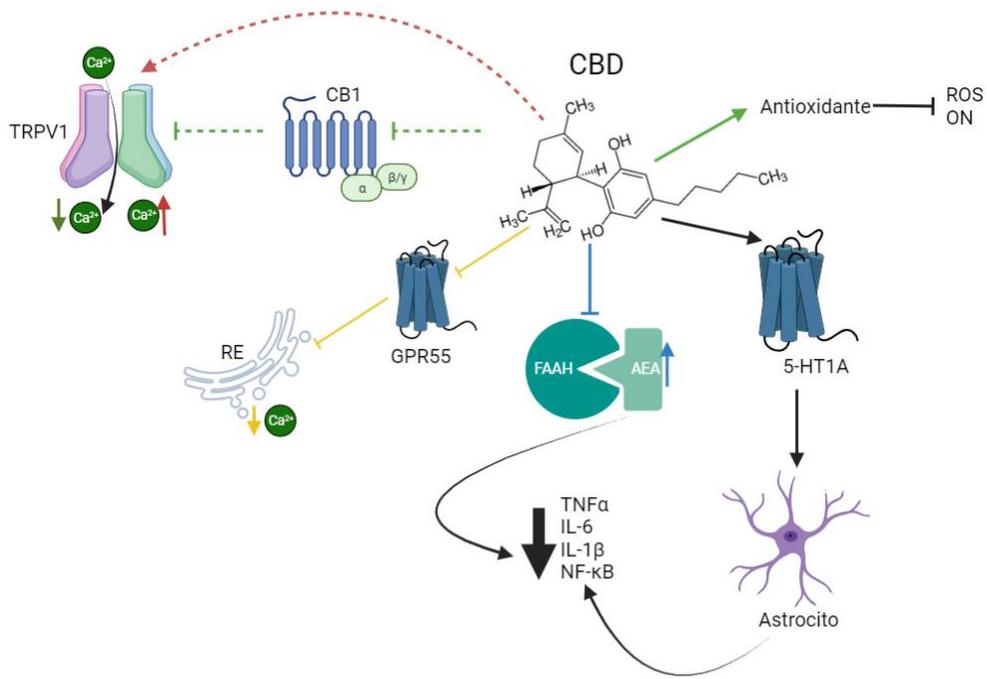


Figura 1. Estructura del cannabidiol

Cannabidiol (CBD), es el principal fitocannabinoide no psicoactivo, (Lazarini-lopes *et al.* 2020), ha sido propuesto como una alternativa para el tratamiento de varias enfermedades neuropsiquiátricas y neurológicas, incluyendo ansiedad, esquizofrenia, epilepsia y adicciones debido a su capacidad para interactuar con varias dianas moleculares (Vitale y Iannotti 2021). Además, tiene efecto neuroprotector a través de interacción directa con el sistema endocannabinoide y su influencia con estas moléculas (anandamida, 2-araquidilglicerol y amida hidrolasa de ácidos grasos), de tal forma que los beneficios neuroprotectores, antiinflamatorios e inmunomoduladores le son atribuidos, ya que, disminuye citoquinas inflamatorias e influencia células microgliales para que retomen su estadio normal y así mantener la circulación cerebral durante eventos isquémicos y reducir cambios vasculares y neuroinflamación (Camposa AC, Fogac MV, Sonogoa AB 2016).

CBD es hidroxilado a 7-OH-CBD y 7-COOH-CBD por enzimas de citocromo P450 específicamente las isoformas CYP3A4 y CYP2C9 en hígado y excretado en heces y en menor medida en orina (Chayasirisobhon 2020). Se ha reportado que 7-OH-CBD inhibe débilmente la hidrólisis de *N*-araquidonoiletanolamina, (AEA) por amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) (Bisogno *et al.* 2001), así como efectos antiinflamatorios como supresión de TNF $\alpha$  en ratones, inhibición de NO, ROS y actividad nociceptiva (Raphael, Mechoulam., Susana, Tchilibon., Ester, Fride., Lumir, Hanus., Aviva, Breuer., Ruth 2010).



**Figura 2. Mecanismos de neuroprotección de CBD**

### 1.3 Valproato

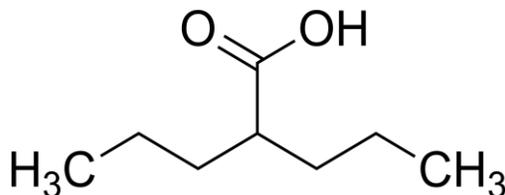
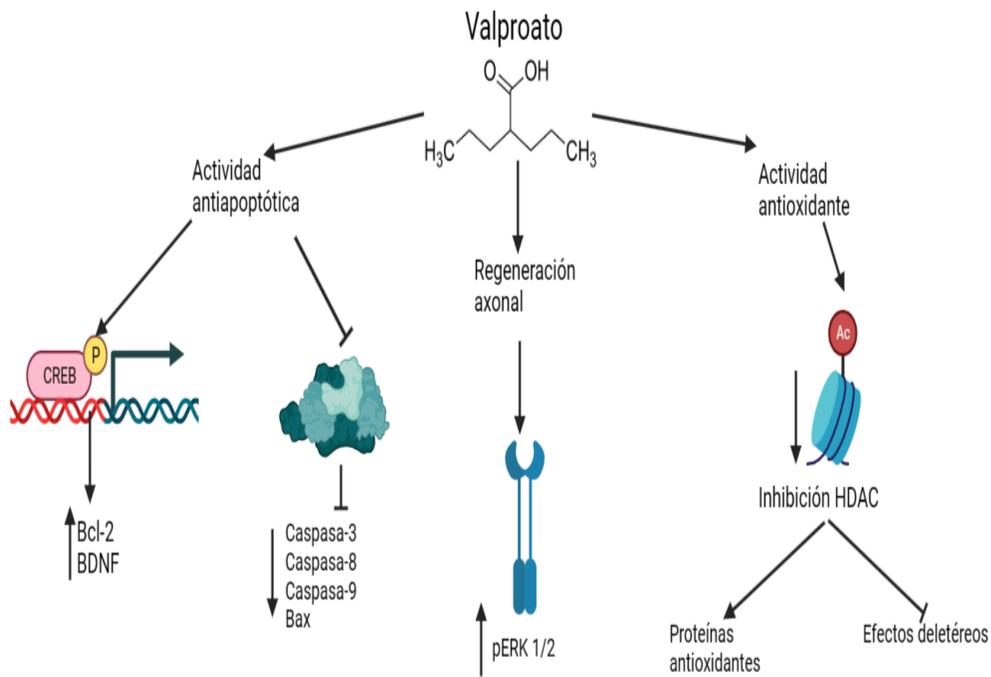


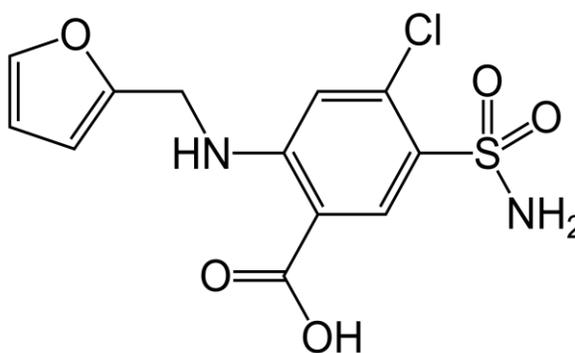
Figura 3. Estructura de valproato.

Es un fármaco de primera línea empleado como tratamiento para epilepsia y desorden bipolar. Estructuralmente es un ácido graso de cadena corta cuyo mecanismo de acción aún no es del todo comprendido (Chapman et al. 1982). Sin embargo, ha tomado importancia debido a los efectos observados como fármaco neuroprotector en condiciones neurodegenerativas. Principalmente por su actividad como inhibidor de histona deacetilasa (Kanai y Chen 2004),(Siqueira *et al.* 2018), de las cuales, se ha reportado que en alteraciones neuronales tienen un papel importante en inflamación, así mismo, se ha reportado que el dicho efecto es debido a potenciación de acetilación del factor de transcripción SP1, cuya presencia es importante para la prevención de muerte neuronal oxidativa, mediante inducción de proteínas antioxidantes y eliminación de los efectos deletéreos de estrés oxidativo en neuronas (Lee *et al.* 2003).



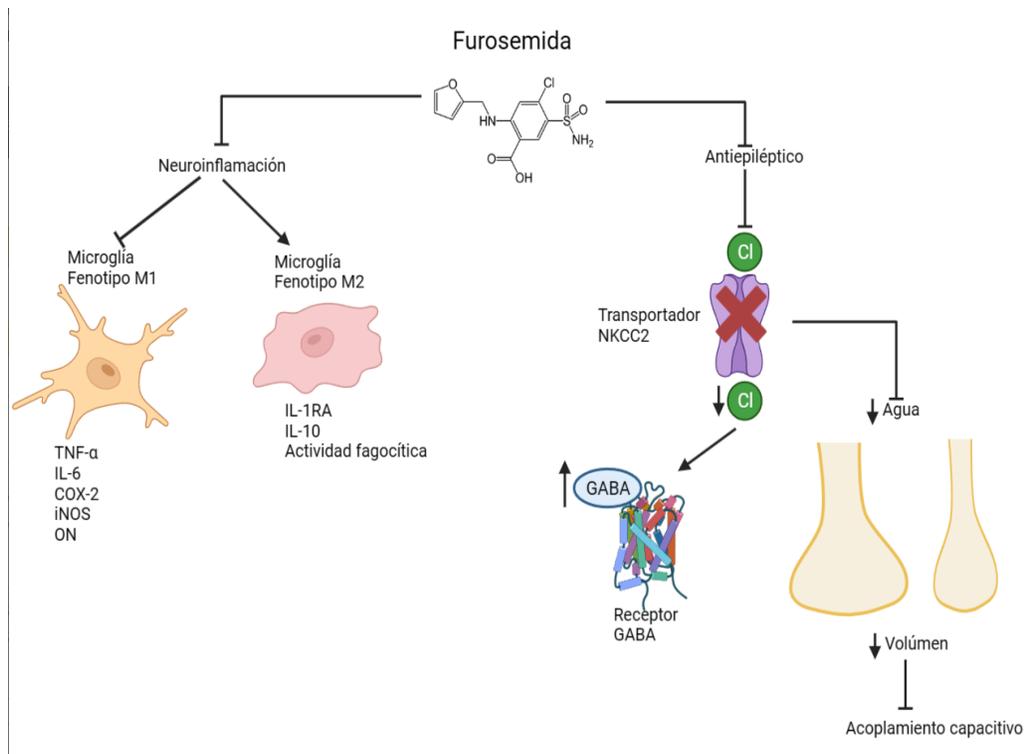
**Figura 4. Mecanismos de neuroprotección de valproato**

### 1.4 Furoseמידا



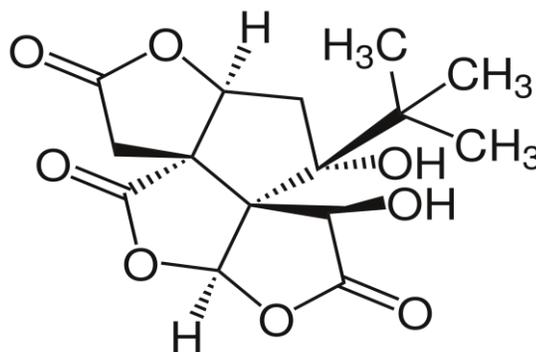
**Figura 5. Estructura de furoseמידا.**

Es un fármaco natriurético potente, ampliamente usado. Inhibe el cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  2 (NKCC-2) en el extremo ascendente del asa de Henle empleado para reducir expansión de volumen de fluido extracelular en corazón y riñón (Huang *et al.* 2016). Además, ha demostrado tener efecto como tratamiento de neuroinflamación en enfermedad de Alzheimer (Z. Wang *et al.* 2020), actividad antioxidante (Hamelink *et al.* 2005a) y antiepiléptica (Haglund *et al.* 2022). Algo importante a remarcar es el posible mecanismo que consiste en inhibir la secreción de TNF- $\alpha$  proinflamatorio, IL-6 y óxido nítrico, disminuye la expresión proteica de COX-2, iNOS y promueve la actividad fagocítica y potencia la expresión antiinflamatoria de IL-1RA y arginasa, de esta manera se disminuye el fenotipo pro inflamatorio microglial M1 y aumenta el fenotipo antiinflamatorio M2 el cual es un efecto benéfico para enfermedades inflamatorias como Alzheimer (Z. Wang *et al.* 2020). Otro efecto neuroprotector importante es su efecto antiepiléptico mediado principalmente por la inhibición del transportador NKCC2, que disminuiría la entrada de  $\text{Cl}^-$  a la neurona ocasionando la disminución de concentración de  $\text{Cl}^-$  neuronal lo que ocasionaría que el potencial de reversión de  $\text{GABA}_A$  fuera más negativo, aumentando la eficacia de la inhibición de GABA. Además, la inhibición de NKCC2 disminuiría el volumen de la célula al disminuir el ingreso de iones y agua, incrementando el espacio extracelular y reduciendo las convulsiones al disminuir el acoplamiento capacitivo (transmisión efáptica) entre las neuronas (Staley 2002).



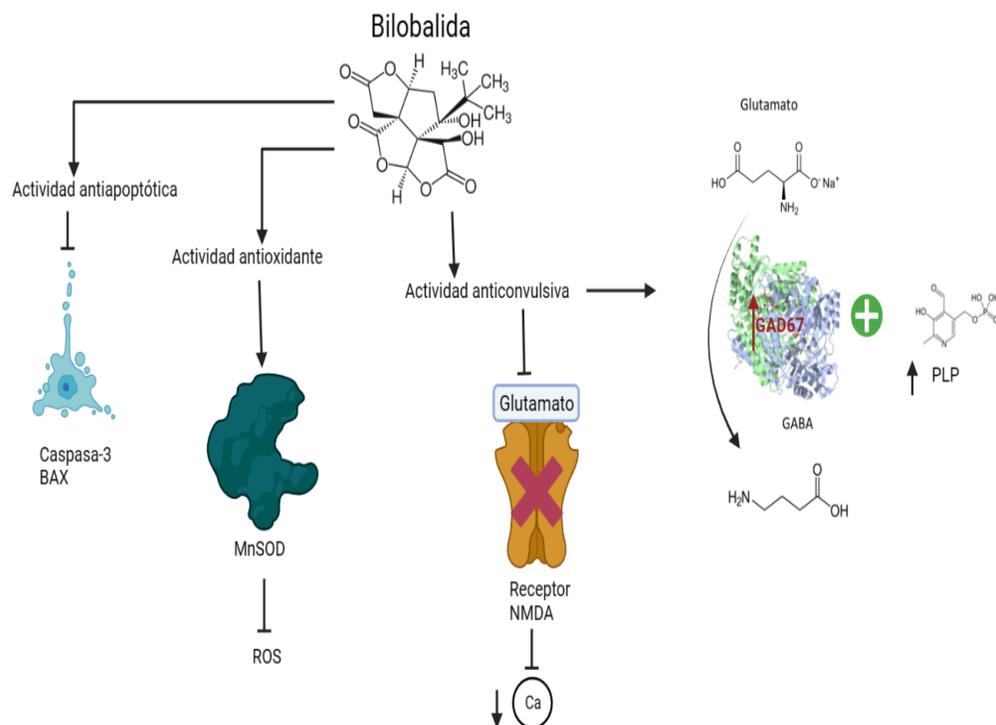
**Figura 6. Mecanismos de neuroprotección de furosemida**

### 1.5 Bilobalida



**Figura 7. Estructura de bilobalida.**

Ginkgólidos y bilobalida son los principales componentes terpenoides de los extractos de Ginkgo biloba. Los principales ginkgolidos reportados son A, B, C, J, K, L y M. Existe un extracto estandarizado que ha sido evaluado y ha representado efectos neuroprotectores contra varios desordenes neurológicos y cardiovasculares, dicho extracto estandarizado tiene nombre de EGb761 el cual tiene 2 grupos principales bioactivos: 24% de glicósidos flavonoides y 6% de terpenos trilactonas (Feng et al. 2019). El contenido de bilobalida en el extracto estandarizado es de tan solo 3.2% y se le han atribuido efecto reductor de apoptosis y mejora de la angiogénesis mediante la ruta de síntesis de óxido nítrico endotelial, aumento de captación de glucosa y evitando disminución de ATP, alteraciones iónicas y disfunción mitocondrial, así como mejoría de funciones cognitivas (Nowak et al. 2021).



**Figura 8. Mecanismos de neuroprotección de bilobalida**

## 1.6 Metformina

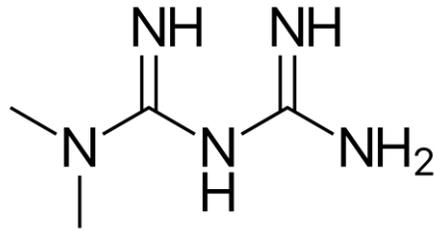
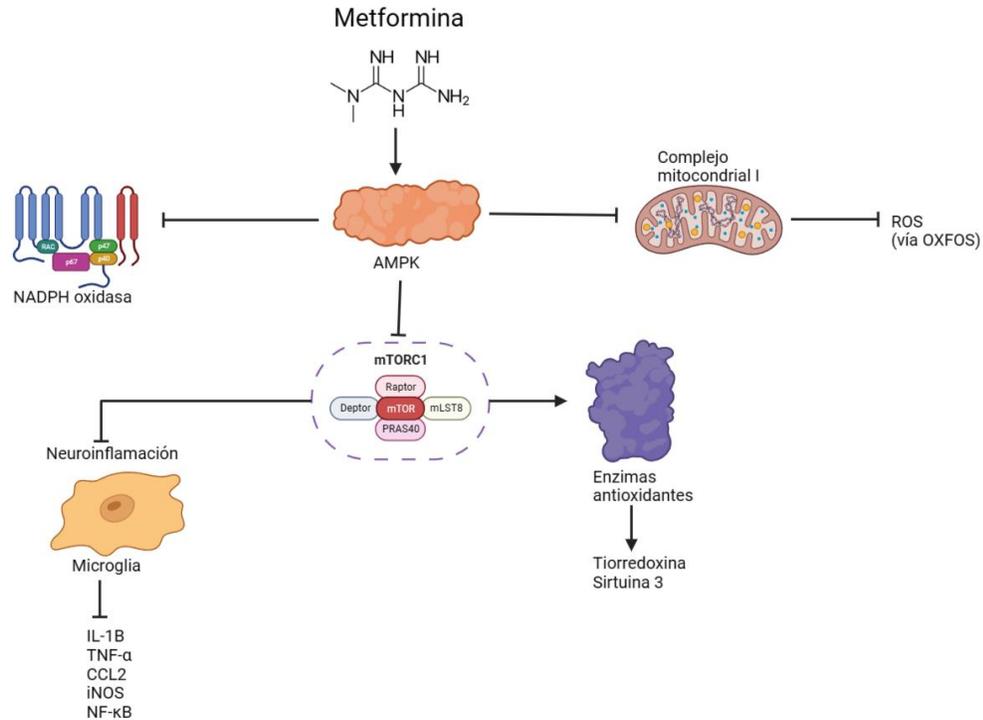


Figura 9. Estructura de metformina.

Es un fármaco de primera línea para el tratamiento de Diabetes mellitus tipo 2 siendo efectiva en monoterapia o bien, combinada con otros medicamentos reductores de glucosa (Baker *et al.* 2021). Estructuralmente es una dimetil biguanida sintética cuyo mecanismo de acción propuesto es mediante inhibición de producción de glucosa hepática, disminución de la absorción y mejoramiento en el consumo y utilización de ésta (Sheleme 2021). A pH fisiológico se encuentra como catión y es pobremente absorbida a nivel gastrointestinal mediante el transportador de cationes orgánicos y prácticamente excretada sin ser metabolizada en heces y en orina (Bouriche *et al.* 2021). Además, ha demostrado tener efectos neuroprotectores debido a sus propiedades antioxidantes, inhibitoria de apoptosis y antiepiléptica (Patil *et al.* 2014), (Detaille *et al.* 2008) , (Zhao *et al.* 2014). Se ha demostrado que puede atravesar la barrera hematoencefálica (Łabuzek *et al.* 2010) y logrado reducir la fosforilación y agregación de  $\alpha$ -sinucleína, disminuye autofagia e inflamación, procesos de los cuales se encuentran relacionados con patogénesis de enfermedad de Parkinson y se ha asociado el uso de metformina con menor

riesgo de empeoramiento cognitivo en paciente con DM2 (Rotermund, Machetanz, y Fitzgerald 2018).



**Figura 10. Mecanismos de neuroprotección de metformina**

## 1.7 Reposicionamiento farmacológico

Es una metodología también llamada “reutilización de medicamentos, rediseño o bien, reasignación de medicamentos enfocada en identificar nuevos usos para fármacos aprobados o en investigación que están fuera del alcance de la indicación médica original y ofrece ventajas sobre el desarrollo de un fármaco completamente nuevo para una determinada indicación. Por ejemplo: En primer lugar, el riesgo de fracaso es bajo, ya que, se ha determinado que el fármaco reposicionado es lo suficientemente seguro en modelo preclínicos y

humanos en caso de haber completado los ensayos de fase inicial. En segundo lugar, el marco de tiempo para el desarrollo de fármaco puede ser reducido, porque la mayoría de las pruebas preclínicas, evaluación de seguridad y en algunos casos, desarrollo de formulación se encuentran completadas. En tercer lugar, menos inversión es la requerida, aunque variará ampliamente dependiendo de la etapa y proceso de desarrollo del candidato a reposicionamiento. Finalmente, los fármacos reposicionados, pueden revelar nuevos objetivos y vías que pueden explotarse aún más (Pushpakom *et al.* 2018; Talevi 2016).

La estrategia general en la metodología del reposicionamiento farmacológico comienza con la identificación de una molécula candidata para una indicación determinada; posteriormente, es la evaluación del mecanismo del efecto farmacológico en modelos preclínicos y la evaluación de la eficacia en ensayos clínicos fase 2. Así mismo, los enfoques sistemáticos empleados para la identificación de una molécula candidata son principalmente dos, el enfoque experimental y el enfoque computacional (Pushpakom *et al.* 2018).

## **1.8 Enfermedades neurodegenerativas**

Son trastornos hereditarios esporádicos y raros del sistema nervioso central, que provocan pérdida de función lenta y progresiva de poblaciones de neuronas específicas y sus conexiones. Con secuelas como deficiencia cognitiva y dependencia de cuidado. La enfermedad de Parkinson y la de

Alzheimer son las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia, sin embargo también se incluyen padecimientos como la degeneración lobular frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la corea de Huntington (Reith 2018).

### 1.8.1 Enfermedad de Alzheimer

Es un trastorno neurodegenerativo irreversible que involucra la pérdida de memoria y la función ejecutiva, así como cambios en la personalidad. Resulta en pérdida de sinapsis y atrofia neuronal predominantemente en hipocampo y corteza cerebral. Además, existe la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares de tau y agregados de proteínas mal plegadas en todo el cerebro. Factores genéticos y ambientales juegan un rol importante en la generación y desarrollo de la enfermedad. Respecto a los factores ambientales y metabólicos, existe relación con diabetes, enfermedad cerebrovascular, dieta deficiente, daño en cabeza y estrés, estos factores están ligados al incremento de riesgo de demencia. A pesar de la información existente, la hipótesis más aceptada sobre el inicio y progresión de la enfermedad de Alzheimer es la hipótesis amiloide (Sheppard y Coleman 2020). La clasificación se puede realizar de acuerdo con el momento en que se manifiesta la enfermedad y si es hereditaria. De esta manera si ocurre antes de los 65 años, se clasifica como enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (EOAD, por sus siglas en inglés), si el inicio es posterior a los 65 años, se clasifica como Enfermedad de

Alzheimer de inicio tardío (LOAD, por sus siglas en inglés). Cabe resaltar que en el caso de EOAD, son en su mayoría relacionados con mutaciones en APP, PSEN1 o PSEN2 (Talwar *et al.* 2016). La proteína precursora de péptido  $\beta$ -amiloide, (APP) fue el primer gen que mostró mutaciones autosómicas dominantes que causan Alzheimer, desde su descubrimiento llevó a la hipótesis amiloide en la que se establece la acumulación tóxica de  $A\beta$  inicia una cascada de eventos que conducen a muerte neurona y desarrollo y progreso de la enfermedad (Hardy and Allsop 1991). La presenilina 1 (PSEN1) y presenelina 2 (PSEN2) codifican los componentes catalíticos de  $\gamma$ -secretasa, complejo enzimático involucrado en el procesamiento de APP y cuyas mutaciones causan enfermedad de Alzheimer autosómica dominante, (Brunkan y Goate 2005).

#### 1.8.1.1 Tratamiento farmacológico para la enfermedad de Alzheimer

Las estrategias de tratamiento modificador de la enfermedad aún se encuentran bajo investigación. Actualmente, solo existen tratamientos sintomáticos para este padecimiento, todos tratando de contrarrestar la alteración de los neurotransmisores. Para bloquear la progresión de la enfermedad los agentes terapéuticos deben interferir con el proceso patogénico responsable de los síntomas clínicos, principalmente enfocados en la agregación de placas extracelulares de  $\beta$ -amiloide y formación de marañas neurofibrilares intracelulares. Los medicamentos actualmente aprobados como

tratamiento para Alzheimer son los inhibidores de la acetilcolinesterasa: donepezilo, galantamina, rivastigmina y el antagonista de NMDA: memantina. Los inhibidores de acetilcolinesterasa mejoran la neurotransmisión colinérgica central y finalmente tienden a mitigar la disminución de la cognición. Otros mecanismos aun por explorar están dirigidos por agentes metabólicos, agentes neuroprotectores, antiinflamatorios, promotores del factor de crecimiento y terapia con células madre (Yiannopoulou y Papageorgiou 2020).

### 1.8.2 Enfermedad de Parkinson

Es el trastorno de movimiento neurodegenerativo más común. Los factores de riesgo asociados son edad, género masculino y algunos factores ambientales. La etiología de la enfermedad en la mayoría de los pacientes es desconocida. Los principales síntomas motores de la enfermedad son la existencia de tremores, rigidez, bradiquinesia / aquinesia e inestabilidad postural, sin embargo, se incluyen otros síntomas motores y no motores. Patológicamente, se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compact y por acumulación de  $\alpha$ -sinucleína mal plegada encontrada en inclusiones intra citoplásmicas llamadas cuerpos de Lewy (Balestrino y Schapira 2020). Una característica importante es la pérdida de pigmentación a causa de la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la presencia de cuerpos de Lewy, estos cuerpos son inclusiones eosinofílicas intraneuronales redondas con núcleo hialino y halo periférico pálido compuesto

de más de 90 proteínas (Wakabayashi *et al.* 2013). Además, el estrés oxidativo ha sido ampliamente asociado con la muerte de rutas dopaminérgicas desde la perspectiva de producción de especies tóxicas a través de la autooxidación de L-dopa y dopamina y la formación de neuromelanina. Cabe recalcar que las neuronas dopaminérgicas son vulnerables a estrés oxidativo (Schapira and Jenner 2011). Otro efecto fisiopatológico relacionado con enfermedad de Parkinson es la relación directa con disfunción mitocondrial, existen reportes sobre defectos en el complejo I en músculo esquelético, plaquetas y linfoblastos. Además, esta deficiencia parece estar confinada a la sustancia negra, (Schapira 1994) . La *sustancia negra* tiene características que la hacen vulnerable al ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), como niveles bajos de glutatión y vitamina E, y niveles altos de hierro libre (pro oxidante), mono amina oxidasa (MAO), óxido nítrico (radical pro oxidante neurotóxico) y neuromelanina (resultado de auto oxidación, condensación y polimerización de dopamina y de sus productos de oxidación) (Dorado, *et al.* 2003).

#### 1.8.2.1 Tratamiento farmacológico para enfermedad de Parkinson

Ninguna terapia disponible altera el proceso neurodegenerativo subyacente, las terapias sintomáticas pueden mejorar la calidad de vida del paciente. Aunque la levodopa es el medicamento disponible más efectivo para tratar los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson, principalmente los síntomas leves, temblor como el único síntoma o más destacado, menores de

60 años, inhibidores de monoaminoxidasa tipo B (IMAO), amantadina, anticolinérgicos, bloqueadores B o agonistas dopaminérgicos pueden iniciarse primero para evitar complicaciones motoras relacionadas con la levodopa. Las fluctuaciones motoras se pueden controlar mediante la modificación del régimen de dosificación de levodopa o agregando varios medicamentos como IMAO, inhibidores de catecol-O-metiltransferasa o agonistas de dopamina. Los trastornos del control de los impulsos generalmente se tratan reduciendo o retirando la medicación dopaminérgica, especialmente los agonistas de la dopamina. Sin embargo, respecto a los síntomas no motores, existe escasez de estudios positivos de alta calidad. Con base en evidencia sólida, se recomienda el uso de levodopa y agonistas dopaminérgicos para síntomas motores en todas las etapas de la enfermedad de Parkinson. Los agonistas dopaminérgicos y fármacos que bloquean el metabolismo de dopamina son eficaces para fluctuaciones motoras y la clozapina es eficaz para las alucinaciones. Respecto a los inhibidores de la acetilcolinesterasa, pueden mejorar los síntomas presentes en la etapa de demencia y los antidepresivos y pramipexol mejoran la depresión (Connolly y Lang 2014),(Armstrong y Okun 2020).

### 1.8.3 Esclerosis lateral amiotrófica

Es una rara enfermedad neurodegenerativa fatal, idiopática del sistema motor humano que genera debilidad en los músculos voluntarios. El grado de supervivencia en ELA es dependiente de varios factores entre los que se

incluye fenotipo o presentación clínica, progresión de la enfermedad, presencia temprana de falla respiratoria y estado nutricional de los pacientes (*Kiernan et al.* 2011). Entre las principales características clínicas destacan las alteraciones funcionales de las neuronas motora superior e inferior. Los síntomas de daño de la neurona motora superior incluyen enlentecimiento del habla, espasticidad, hiperreflexia, signo de Hoffman o de Babinsky. Los signos de la neurona motora inferior incluyen atrofia, fasciculaciones y debilidad (*Fallas, et al.* 2010). Es importante mencionar que alrededor del 5 al 10% de la enfermedad es familiar con patrón de herencia mendeliano y hasta hoy en día, se han identificado 13 genes y loci involucrados en la etiología de la enfermedad. De los genes involucrados existen mutaciones en SOD1 (codifica para super oxido dismutasa de unión a ión cobre/zinc), TARDBP ó TDP-43 (codifica para proteína TAR de unión a DNA), FUS (codifica fusión en sarcoma), ANG (codifica angiogenina, ribonucleasa, RNasa familia 5) y OPTN (codifica optineurina) que causan un fenotipo clínico típico (*Beleza-Meireles y Al-Chalabi* 2009). Al estar involucradas las mutaciones en SOD1 no está clara la muerte prematura de neuronas motoras con la generación de radicales libres que desencadenan daño y muerte neuronal, adicionalmente, las mutaciones inducen inestabilidad y mal plegamiento de SOD1 formando agregados intracelulares que interrumpen sistemas de transporte y funciones celulares vitales (*Kiernan et al.* 2011). Así mismo, otro proceso parece estar implicado en la patogénesis de la enfermedad, dicho proceso es la excitotoxicidad inducida por glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC y se une a los receptores ionotrópicos NMDA y AMPA en la membrana postsináptica (*Heath y*

Shaw 2002). La activación continua de los receptores postsinápticos de glutamato pueden generar neurodegeneración mediante la activación de rutas enzimáticas dependientes de calcio así como la generación de radicales libres que dañan organelos intracelulares y generan mediadores de procesos proinflamatorios (Meldrum y Garthwaite 1990), (Hensley *et al.* 2006).

#### 1.8.3.1 Tratamiento farmacológico para Esclerosis Lateral Amiotrófica

No hay cura para la ELA; sin embargo, las investigaciones en proceso se centran en identificar los mecanismos de la enfermedad y así encontrar fármacos para lograr retrasar la progresión de la enfermedad. Actualmente, se han aprobado dos medicamentos para el tratamiento de la enfermedad. El riluzol, un agente antiglutamato al cual se le han demostrado beneficio de supervivencia de aproximadamente 2 meses. Los efectos adversos más comunes de este fármaco fatiga, náusea y elevación de enzimas hepáticas. Otro fármaco recientemente aprobado, específicamente en el 2017, es la edaravona; sin embargo, el mecanismo de acción aún no es completamente dilucidado, los datos actuales sugieren que actúa como un captador /eliminador de radicales libres previniendo el daño por estrés oxidativo de neuronas. No existen datos sobre los beneficios de supervivencia, los efectos secundarios reportados para el fármaco incluyen hematomas, alteraciones de la marcha, dolor de cabeza, eccema y dermatitis de contacto. Además, se produjeron reacciones de hipersensibilidad en pacientes con alergia al sulfito. Actualmente,

existen varios fármacos que se encuentran en ensayos clínicos para evaluar su efectividad en el tratamiento de ELA, entre ellos se encuentran abacavir, memantina, lonis-SOD1Rx, células progenitoras gliales restringidas humanas y células madre mesenquimales. Así mismo, algunos ensayos clínicos con diferentes moléculas han tenido resultados negativos o poco promisorios, entre las moléculas evaluadas se encuentran factores de crecimiento, dexpramipexol, creatina, litio, ceftriaxona, antagonistas del glutamato, celecoxib, bloqueadores de canales de calcio y aminoácidos (Carter y Joyce 2018)(Willett y Norton 2014).

#### 1.8.4 Enfermedad de Huntington

Es un trastorno progresivo de afectaciones motoras, cognitivas y psiquiátricas, (Caron *et al.* 2019). La edad promedio de inicio es de 35 a 44 años y la mediana de supervivencia es de 15 a 18 años después del inicio. El diagnóstico se basa en antecedentes familiares positivos, hallazgos clínicos característicos y la detección de una expansión de 36 o más repeticiones de trinucleótidos CAG en el primer exón del gen IT15, situado en el cromosoma 4p16.3. Este gen se expande 210 kb y codifica para la huntingtina, una proteína de 348 kDa, de expresión ubicua en el núcleo o citoplasma de las células de diversos tejidos, incluidas las neuronas GABAérgicas de los ganglios basales (neuronas que producen y secretan GABA y tienen principalmente funciones de

inhibición en los receptores de vertebrados adultos) ocasionando incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, lo que concluye en incremento de los niveles de glutamato con efecto neurotóxico. La proteína mutante forma agregados nucleares, además el cerebro presenta una atrofia cortical en relación directa con el grado de evolución de la enfermedad (Michels 2008). El tratamiento es complejo y abarca diferentes aspectos de las manifestaciones clínicas, se incluye el empleo de neurolépticos como el haloperidol, olanzapina, benzodiazepinas o tetrabenazina; agentes antiparkinsonianos para hipocinesia y rigidez; psicotrónicos o antiepilépticos para trastornos psiquiátricos como depresión, síntomas psicóticos, arrebatos de agresión; valproato para la hipercinesia mioclónica. Se hereda de forma autosómica dominante, los hijos de un individuo con una variante patógena tienen 50% de probabilidad de heredar el alelo causante de la enfermedad y actualmente no existe cura para el trastorno. Las manifestaciones físicas que se pueden presentar o de las cuales se pueden sospechar son la discapacidad motora progresiva con coreas, movimiento voluntario afectado, trastornos mentales que incluyen deterioro cognitivo, cambios en personalidad, depresión, así como antecedentes familiares compatibles con herencia autosómica dominante (Mason, *et al.* 2016; Rodríguez, *et al.* 2013)(Reilmann, Leavitt, y Ross 2014).

#### 1.8.4.1 Tratamiento farmacológico para Enfermedad de Huntington

Actualmente no existe cura, además no hay terapia conocida que retrase la degeneración o la tasa de deterioro clínico, siendo esta una necesidad y prioridad en la investigación. Algunos síntomas pueden ser tratados farmacológicamente y otros pueden ser dirigidos mediante medidas de soporte no farmacológico. Los síntomas responden variablemente a los medicamentos, en general los síntomas psiquiátricos son los más aptos para farmacoterapia, respecto a los síntomas motores, corea es el más fácilmente receptivo. Los síntomas cognitivos y demencia son los menos receptivos. Muchos pacientes con corea no son conscientes de sus movimientos involuntarios o no son afectados por la corea. Desde el pasado, los bloqueadores del receptor de dopamina han sido los más ampliamente prescritos, entre los que destacan el haloperidol, risperidona y olanzapina, estos agentes tienen la ventaja de potenciar el tratamiento de la depresión y ayudar con irritabilidad, arrebatos y psicosis. Una desventaja es que los antipsicóticos típicos y atípicos incrementan el riesgo de muerte cardíaca súbita, sin embargo, empleados a dosis mínimas reducen riesgo de efectos adversos extrapiramidales. Otra opción importante para el tratamiento de corea es el agente agotador de dopamina tetrabenazina, la cual reduce la corea de forma dosis dependiente. Sin embargo, de igual manera disminuye otras catecolaminas incluyendo serotonina y norepinefrina, de tal manera que es evitada para individuos con ansiedad y depresión significativa, así mismo empeora la disfagia. Estas terapias pueden empeorar la

marcha y la bradicinesia, o causar somnolencia. El uso de amantadina ha demostrado tener efectos modestamente benéficos en el control de corea. La mioclonía siendo un caso raro en la enfermedad de Huntington puede responder al empleo de ácido valproico. La depresión aunada a EH generalmente responde bien a los antidepresivos comúnmente empleados, como inhibidores de la recaptura de serotonina (IRS) de la misma manera que los comportamientos obsesivos-compulsivos, ansiedad e irritabilidad. Los estabilizadores del humor como valproato y carbamazepina pueden ayudar con inestabilidad emocional e impulsividad. Buspirona puede ayudar con ansiedad (Dayalu y Albin 2015), (Adam y Jankovic 2008).

#### 1.8.5 Accidente cerebrovascular isquémico agudo

Se cree que esta lesión cerebral es el resultado de una serie progresiva de eventos que inician con el agotamiento de la energía hasta la muerte celular. Entre los factores involucrados se pueden considerar un exceso de actividad excitatoria por parte de aminoácidos extracelulares, formación de radicales libres e inflamación. De manera inicial, una vez presentada la oclusión arterial, un núcleo central de muy baja perfusión es rodeado por un área de disfunción a causa de alteraciones metabólicas e iónicas, sin embargo, se conserva la integridad estructural, este fenómeno también es conocido como “penumbra isquémica”. En las primeras etapas que pueden abarcar de minutos u horas, los cuadros clínicos no representan específicamente un daño irreparable.

Considerando factores como la duración de la isquemia y la tasa de flujo residual, la penumbra se podría incorporar al infarto si no se logra la reperfusión en el menor tiempo posible. La probabilidad de mala evolución tras el accidente aumenta con la edad, además de la coexistencia de enfermedades como cardiopatía isquémica y la diabetes mellitus, así como con el aumento del tamaño y del sitio del infarto. El accidente cerebrovascular agudo se caracteriza por la aparición repentina de un déficit neurológico focal, aunque algunos pacientes tienen una gran progresión escalonada o gradual de los síntomas. Los déficits más comunes incluyen disfasia, disartria, hemianopsia, debilidad, ataxia y pérdida sensorial. Los signos y síntomas son unilaterales y la conciencia es generalmente normal o alterada solo levemente, excepto en el caso de algunos infartos en la circulación posterior (Van Der Worp, Bart H; Van Gijn 2007).

## **1.9 Neuroprotección**

El fenómeno de neuroprotección se refiere a los mecanismos y estrategias usadas para proteger contra daño nervioso o degeneración y así prevenir la pérdida funcional del sistema nervioso central. Los neuroprotectores no son capaces de revertir el daño ocasionado, pero pueden proteger del daño adicional de las células nerviosas y retrasar su degeneración (Cadet, *et al.* 2017). El daño a nivel neuronal se debe a diferentes mecanismos, variando para cada una de las enfermedades neurodegenerativas. Los mecanismos de

daño a nivel neuronal son: estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, cambios inflamatorios, acumulación de hierro, sobreproducción de proteínas cerebrales. En los procesos que se llevan a cabo en las enfermedades neurodegenerativas, estos mecanismos se encuentran estrechamente relacionados, siendo de esta forma que el proceso de excitotoxicidad puede desencadenar cada uno de los mecanismos de daño neuronal (Cadet, *et al.* 2017; Stocchetti, *et al.* 2015).

### 1.9.1 Generalidades de efecto neuroprotector

Se han evaluado diferentes compuestos con propiedades de inhibir la muerte neuronal, como factores de crecimiento y factores neurotróficos (FNTC, factor neurotrófico ciliar) y anticuerpos (anti-VEGF), transferencia genética (terapia génica) y antioxidantes. Además, neuroprotección por antagonistas de receptor de glutamato, como memantina. Es importante considerar algunos factores clave sobre los neuroprotectores. Como el hecho de que la neuroprotección se refiere a un evento modificador de la enfermedad que protege células de daños patológicos como daño tóxico o mutaciones genéticas, además, existen gran cantidad de agentes herbales, métodos quirúrgicos que han mostrado ser neuroprotectores en modelos animales de enfermedad de Parkinson, desafortunadamente ninguno ha podido ser trasladado a la parte clínica. Actualmente, no hay opción de tratamiento neuroprotector para pacientes ya que todos son tratamientos sintomáticos con poca evidencia de modificación de la enfermedad. El ejercicio, ultrasonido y fotomodulación ofrecen diferentes enfoques promisorios de neuroprotección,

son no invasivos, seguros de usar y estimulan mecanismos intrínsecos de autoreparación. Clínicamente, los neuroprotectores pueden ser más exitosos si los tratamientos se combinan, como por ejemplo terapia farmacológica y ejercicio, ultrasonido y fotomodulación (Mitrofanis 2020).

### 1.9.2 Tratamientos potencialmente neuroprotectores

El desarrollo de nuevos tratamientos incluye agentes farmacéuticos potenciales es de gran importancia debido a las complejas respuestas del tejido cerebral antes distintos tipos de daño. Generalmente inicia con estrés oxidativo el cual juega un papel importante en la patogénesis de distintas afectaciones neuronales en los cuales se incrementa la producción de ROS, disminuyendo la actividad de enzimas y sistemas protectores antioxidantes (Grochowski *et al.* 2018). Además, los niveles de glutamato, ya que es el neurotransmisor excitatorio más abundante que actúa como potente neurotoxina bajo condiciones patológicas. Los niveles altos de glutamato extracelular juegan un rol esencial en citotoxicidad neuronal a través de receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA y AMPA). En algunas afectaciones neuronales, como inicio de isquemia, una serie de eventos inflamatorios son activados continuando la activación de células como la microglía, varias señales contribuyen a la activación de los dos principales fenotipos: M1, clásicamente activados y alternativamente activado M2 (Khanna, Briggs, y Rink 2015). Las células microgliales son especialmente sensibles a la señalización mediante receptores

TLR y PPAR- $\gamma$  (Kim, Kim, y Yenari 2015). El fenotipo M1 promueve la liberación de mediadores inflamatorios como óxido nítrico y ROS lo que lleva al incremento de muerte celular y disfunción de la barrera hematoencefálica, desencadenando la liberación de quimiocinas, activando la metaloproteinasa de matriz extracelular (MMP)-9 y regulando el incremento de moléculas de adhesión. El fenotipo M2 es activado por citoquinas antiinflamatorias como interleucina-4 la cual puede inhibir inflamación y promover reparación tisular y cicatrización de heridas (Bonaventura et al. 2016). Considerando cada uno de los efectos desencadenados en los padecimientos neurodegenerativos y la cascada de daño por isquemia se consideran de importancia como blancos para opciones terapéuticas, de tal manera que para el desarrollo de estrategias neuroprotectoras se incluyen opciones como:

*Inhibidores de NADPH oxidasa (NOX).* La inhibición de producción de ROS puede ser una estrategia viable para el tratamiento neuroprotector. Las ciclooxigenasas y las mitocondrias general ROS como subproducto de actividades enzimáticas; en cambio, la generación de ROS es la principal función de NOXs, conformada por subtipos NOX1-4. De los cuales NOX2 y NOX4 son los principales generadores de estrés oxidativo posterior a daño neuronal (Carvalho y Moreira 2018). El inhibidor más común es apocinina (Genovese et al. 2011), capaz de disminuir niveles de apoptosis e inhibir estrés oxidativo, otro inhibidor de NOX es difenil yodonio capaz de atenuar el daño a barrera hematoencefálica y mejorar el resultado después de isquemia cerebral. Un compuesto más específico es Gp91ds-tat, siendo un inhibidor de NOX más

específico capaz de penetrar en las células, sin embargo, al tratarse de un péptido su utilidad es limitada. Otro inhibidor de NOX es ebselen, es un antioxidante orgánico con baja toxicidad que puede ser benéfico para inhibir apoptosis (Yang *et al.* 2019).

Fármacos hipoglicemiantes. El mecanismo importante de neuroprotección es mediante inhibición de estrés oxidativo y respuesta excesiva inflamatoria. Se ha demostrado que tiazolidinedionas y agonistas de PPAR reducen accidentes cerebrovasculares recurrentes y otros eventos vasculares, mejorar sensibilidad a la insulina y estabilizar placas carótidas (Liu and Wang 2019). Metformina y sulfonilureas han reportado efectos benéficos mediante modulación de estrés oxidativo y mediadores inflamatorios, glibenclamida mejoró edema cerebral después de accidente cerebral (Sheth *et al.* 2016).

Minociclina. Es un antibiótico semisintético de segunda generación derivado de la tetraciclina que ha demostrado tener efectividad como neuroprotector en modelos animales y ensayos clínicos. El mecanismo de acción puede ser por actividad antiinflamatoria e inhibición de metaloproteinasas de la matriz (Malhotra *et al.* 2018).

Fingolimod. Es un análogo del receptor de esfingosina-1-fosfato empleado para tratar esclerosis múltiple remitente recurrente disminuyendo la entrada de linfocitos, reduciendo inflamación del sistema nervioso central siendo una opción prometedora como neuroprotector (Tsai y Han 2016).

Dimetil fumarato. Fármaco empleado para tratar esclerosis múltiple. Monometil fumarato, metabolito activo de DMF modula respuestas inflamatorias (disminución de citoquinas proinflamatorias), estimula rutas antioxidantes y también puede ser efectivo para tratar daño cerebral. Estos efectos pueden ser logrados mediante potenciación de la señalización de factor 2 relacionado con factor nuclear eritroide 2. Como ruta de supervivencia endógena que ejerce efectos antioxidantes y anti inflamatorios (Yang *et al.* 2019).

### 1.9.3 Principales procesos fisiológicos relacionados con neurodegeneración

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un conjunto de condiciones patológicas que causan pérdida de funciones progresiva, lenta e irreversible, así como pérdida de neuronas y sinapsis en determinadas áreas del sistema nervioso lo que determina la presentación clínica y curso. Los principales mecanismos que conducen a neurodegeneración son considerados multifactoriales causados por cuestiones genéticas, ambientales y factores endógenos relacionados al envejecimiento, pero su rol patogénico y su mecanismo molecular no son completamente entendidos. Los principales mecanismos patogénicos que subyacen en enfermedades neurodegenerativas son:

- Dinámica anormal de proteínas con mal plegamiento, degradación defectuosa, disfunción proteosomal y agregación; a menudo con acciones y mutaciones de chaperonas moleculares.

- Estrés oxidativo y formación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno.
- Deterioro de la bioenergética, disfunciones mitocondriales y daño de ADN.
- Fragmentación de aparato de Golgi neuronal.
- Alteración del transporte celular a través del axón.
- Disfunción de neurotrofinas
- Procesos neuro inflamatorios y neuroinmunes

Estos mecanismos están interrelacionados en círculos viciosos complejos que finalmente conducen a disfunción y muerte neuronal, cuyas cascadas moleculares básicas aún se encuentran en investigación (Jellinger 2010).

### **1.10 Excitotoxicidad y neurodegeneración**

La excitotoxicidad es un fenómeno que describe las acciones tóxicas de los neurotransmisores excitatorios, principalmente glutamato, donde la activación exacerbada o prolongada de los receptores de glutamato inicio una cascada de neurotoxicidad que finalmente conduce a la pérdida de la función neuronal y muerte celular. El desbalance entre la función fisiológica normal y la excitotoxicidad está controlado en gran medida por los astrocitos, ya que son

los encargados de controlar los niveles de glutamato en la hendidura sináptica y su reciclaje posterior a través del ciclo glutamato-glutamina. El mecanismo molecular desencadenante del proceso de excitotoxicidad involucra alteraciones en el metabolismo del glutamato y el calcio, así como disfunción de los transportadores y receptores de glutamato, principalmente los receptores de NMDA. Por otro lado, la excitotoxicidad puede considerarse como consecuencia de otros eventos celulares, como disfunción mitocondrial, daño físico y estrés oxidativo. Aun así, es sabido que la sobreactivación de los receptores de glutamato dan como resultado entrada constante de calcio que desencadena disfunción mitocondrial, sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, deterioro de amortiguación de calcio, liberación de factores proapoptóticos que culminan en muerte neuronal.

#### 1.10.1 Excitotoxicidad y ELA

La neurodegeneración es el producto de combinación de diferentes mecanismos concomitantes. Para el caso de ELA existen dos hipótesis sobre el origen de la enfermedad. La primera es la hipótesis de la muerte hacia adelante, en la que se propone una degeneración anterógrada de las neuronas motoras a través de la excitotoxicidad del glutamato a nivel de corteza. La segunda hipótesis es sobre muerte regresiva, que sugiere que ELA puede comenzar distalmente en la terminal nerviosa o en la unión neuromuscular, progresando hacia el cuerpo celular (Kiernan *et al.* 2011). A pesar de las

diferentes hipótesis, las alteraciones de la neurotransmisión excitatoria parecen tener papel clave en progresión de la enfermedad. Una forma sugerida en la que puede ocurrir la excitotoxicidad del glutamato es a través de disminución en los niveles de los transportadores responsables de la eliminación del glutamato en la sinapsis. En ELA, un desencadenante probable de la neuroinflamación es la liberación astrocítica y neuronal motora de proteínas mal plegadas, como SOD1 aberrante y otras moléculas tóxicas. Esta liberación estimula la activación de microglía, desencadenando acciones proinflamatorias y neurotóxicas que desregulan la comunicación entre neuronas motoras y células gliales. Las células microgliales se consideran las células inmunitarias del cerebro y capaces de adoptar fenotipos polarizados activados siendo los fenotipos M1 y M2 los más aceptados. El fenotipo M1 se asocia con liberación de moléculas proinflamatorias y activación de receptores, el fenotipo M2 se relaciona con secreción de mediadores antiinflamatorios y factores de crecimiento (Pinto *et al.* 2017). Las células gliales también juegan un papel en la excitotoxicidad mediada por glutamato, especialmente la regulación a la baja mediada por transportador 2 de aminoácidos excitadores de astrocitos que conduce a disminución en absorción de glutamato y posterior potenciación de efectos excitotóxicos en ELA (Howland, Taepavarapruk, y Phillips 2002), (Armada-Moreira *et al.* 2020).

#### 1.10.2 Excitotoxicidad y enfermedad de Alzheimer

Existe evidencia que sugieren que los oligómeros  $A\beta_{1-42}$  son las especies  $A\beta$  más tóxicas y ejercen sus acciones patológicas al interrumpir la transmisión glutamérgica principalmente al actuar sobre receptores de NMDA y mGlu. Además, puede incrementar liberación de glutamato de neuronas y astrocitos dando como resultado niveles anormalmente altos de glutamato extracelular capaces de activar receptores de NMDA y de tal manera activar vías favorables a la muerte y consiguiente excitotoxicidad. Por lo tanto, los efectos nocivos de pueden estar mediados por activación excesiva de receptor NMDA que contiene predominantemente subunidades GluN2B (Brito-Moreira *et al.* 2011). También se ha demostrado que puede inducir entrada sostenida de calcio vía NMDA que puede desencadenar una cascada de eventos que llevan a disfunción mitocondrial y sináptica, excitotoxicidad, producción de ROS y muerte neuronal (Ferreira *et al.* 2012). Bajo condiciones fisiológicas, la señalización de calcio mitocondrial estimula fosforilación oxidativa y síntesis de ATP en EA los niveles de calcio exacerbados derivados de la activación de NMDAR, las mitocondrias forman un poro no específico en su membrana interna, denominado poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Leung, Varanyuwatana, y Halestrap 2008). La evidencia existente resalta la importancia de astrocitos reactivos como factor clave en excitotoxicidad mediada por glutamato pues la astrogliosis provoca pérdida de función fisiológica de astrocitos y deterioro de transmisión sináptica neuronal. Así mismo,  $A\beta$  induce disfunción astrocítica funcional, morfológica y metabólica (Brawek y Garaschuk 2014), así mismo reduce la expresión de GLT-1 a través del mecanismo de calcineurina/factor nuclear de la vía de células T activadas y estrés oxidativo. Dicha reducción de GLT-1 resulta

en un aumento de niveles de glutamato en sinapsis que al actuar sobre NMDAR contribuye a progresión de la patología de enfermedad de Alzheimer (Simpson *et al.* 2010).

### 1.10.3 Excitotoxicidad y epilepsia

La epilepsia puede considerarse como una familia de trastornos que comprende varias enfermedades y condiciones. Puede definirse como aparición no provocada de al menos dos crisis con más de 24 horas de diferencia y como una crisis convulsiva no provocada y probabilidad de nuevas crisis convulsivas de al menos el 60%. Existen múltiples tipos de crisis que se caracterizan de acuerdo con su inicio, manifestación física y nivel de conciencia, diferenciándose en los correspondientes mecanismo fisiopatológicos (*Fisher et al.* 2017). No obstante, todas las crisis epilépticas implican cambios persistentes en los eventos sinápticos, como la liberación de neurotransmisores y la actividad de receptores y transportadores que presentan actividad neuronal anormal, excesiva o sincrónica, que generalmente resulta de un desequilibrio entre los procesos excitadores e inhibidores mediados por los neurotransmisores glutamato y GABA. La activación neuronal excesiva se acompaña de un aumento de los niveles extracelulares de glutamato, lo que provoca excitotoxicidad, una de las principales fuentes de daño neuronal en la epilepsia (*Soukupová et al.* 2014). La epilepsia de lóbulo temporal es el tipo de epilepsia con mayor presencia que afecta a más de 40 millones de personas en el mundo. El aumento de la excitación local y la citotoxicidad en el foco

epileptogénico se encuentra relacionado con incremento de niveles de glutamato extracelular. Además, se ha reportado cambios en niveles de glutamato en hipocampo de pacientes epilépticos antes, durante y después de las convulsiones, lo que puede ocurrir debido a una mayor liberación de glutamato o su recaptación alterada (Hubbard *et al.* 2016). Así mismo, la absorción de glutamato es un determinante importante de los niveles de glutamato extracelular y la evidencia muestra que la alteración de las concentraciones de glutamato en la epilepsia puede resultar de una expresión o función aberrante del transportador de aminoácidos excitatorios (Armada-Moreira *et al.* 2020; Proper *et al.* 2002).

### 1.11 Tipos de neuroprotección

El objetivo de un neuroprotector es limitar la muerte neuronal después del daño al sistema nervioso central y protegerlo de degeneración prematura y otras causas de muerte neuronal. Los agentes neuroprotectores deben contrarrestar los efectos de la neurodegeneración o pérdida de la funcionalidad neuronal (Stocchetti *et al.* 2015). Los agentes con propiedades neuroprotectoras se han agrupado en las siguientes categorías:

- *Captadores de radicales libres*: Estos agentes convierten los radicales libres inestables en moléculas más estables con menor o nula capacidad de dañar a la célula ya que pueden ser metabolizadas por el cuerpo.

Entre los principales captadores de radicales libres se encuentran los agentes antioxidantes (Cadet, *et al.* 2017).

- *Agentes antiexcitotóxicos*: Son agentes que pueden bloquear los receptores de glutamato y de esta manera, prevenir la excitotoxicidad y neurodegeneración. La amantadina, parece ser un ejemplo de antiexcitotóxico en la enfermedad de Parkinson al cambiar la manera en que interacciona el glutamato con su receptor (Cadet, *et al.* 2017).
- *Inhibidores de apoptosis*: Se refiere a inhibir un proceso de muerte natural de las células conforme la edad avanza y el cuerpo crece. Teóricamente, los agentes antiapoptóticos disminuirían este proceso en neuronas. Actualmente este tipo de terapia está siendo empleada en la investigación de tratamiento contra el cáncer (Clark, *et al.* 2016).
- *Agentes antiinflamatorios*: Generalmente empleados para alivio del dolor, pero también pueden verse involucrados en el proceso inflamatorio involucrado en el empeoramiento de la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Stocchetti, *et al.* 2015).
- *Factores neurotróficos*: Este grupo de biomoléculas promueve el crecimiento neuronal. Sin embargo, aún no es posible establecer un tratamiento clínico para este tipo de moléculas (Clark, *et al.* 2016).
- *Quelantes de iones metálicos*: Al existir niveles elevados de hierro en los padecimientos de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, se consideran opciones terapéuticas a las

sustancias que puedan disminuir de manera gradual dichas concentraciones de hierro. Sin embargo, aún existe escasa evidencia de su posible uso de manera terapéutica (Arun, *et al.* 2013).

## 1.12 Antecedentes

### 1.12.1 Actividad neuroprotectora de CBD

En 2000, Hampson *et al.* evaluaron la actividad neuroprotectora de CBD (EC50: 2-4  $\mu\text{M}$ ) y otros cannabinoides en cultivos de neuronas corticales de rata expuestos a niveles tóxicos de glutamato (100  $\mu\text{M}$ ). Los resultados obtenidos establecieron que THC y CBD redujeron los efectos neurotóxicos mediados por el receptor NMDA, AMP y Kainato. La neuroprotección no se vió afectada por antagonismo de receptor cannabinoide, lo que señala un mecanismo independiente de receptor. Por voltamperometría se determinó que CBD y los otros cannabinoides son fuertes antioxidantes y CBD fue superior a  $\alpha$ -tocoferol y ascorbato (Hampson *et al.* 2000).

En 2005, Hamelink *et al.* Evaluó el efecto neuroprotector de CBD (20 ó 40 mg/Kg/día), BHT (40 mg/Kg/día),  $\alpha$ -tocoferol (80 mg/Kg/día), dizocilpino (0.02 y 0.6 mg/Kg/día), memantina (30 mg/Kg/día), furosemida (10 mg/Kg/día) y bumetanida (1 mg/Kg/día), en hipocampo y corteza entorrinal de ratas Sprague-

Dawley sometidas a consumo de alcohol como modelo de neurodegeneración. Los resultados obtenidos demuestran la actividad neuroprotectora de CBD fue similar a la de los otros dos antioxidantes y de forma dosis dependiente. Furosemida en comparación de los otros diuréticos empleados, también neuroprotegió por actividad antioxidante en el modelo de neurotoxicidad inducida por etanol *in vitro* (Hamelink *et al.* 2005).

En 2008, Álvarez, *et al.* evaluaron actividad neuroprotectora de CBD 0.1 mg/Kg en lechones posterior a evento hipóxico-isquémico por daño cerebral evaluado por espectroscopia infrarroja y electroencefalografía. Obtuvieron que CBD redujo el daño a neuronas viables en 50%. Además la administración se asoció con efectos benéficos cardiacos, hemodinámicos y ventilatorios (Alvarez *et al.* 2008).

En 2009, Castillo *et al.* investigaron los mecanismos involucrados en neuroprotección mediada por CBD en cerebro inmaduro hipóxico-isquémico en rebanadas del prosencéfalo, las cuales experimentaron privación de oxígeno y glucosa en presencia de vehículo o CBD solo o con un antagonista selectivo de receptores CB1 y CB2, A1 y A2. Además, reduce el daño agudo en cerebro hipóxico-isquémico mediante reducción de concentración de glutamato e IL-6, y reducción de expresión de factor de necrosis tumoral alfa, COX-2 y sintasa de óxido nítrico inducible.(Castillo *et al.* 2010)

En 2011, Martín-Moreno, *et al.* evaluaron las propiedades antiinflamatorias de CBD (100 nM) y otros cannabinoides en funciones de células microgliales (N13) y en cultivo primario de microglía *in vitro* y en

comportamiento de aprendizaje, así como la expresión de citocinas posterior a la administración intraventricular de A $\beta$  en ratones, determinando que CBD y los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> pueden estar involucrados en el efecto de CBD. Además disminuyó la generación de nitrito inducido por lipopolisacárido y finalmente existió prevención de aprendizaje de navegación espacial y disminución de expresión de citocinas inducidas por inyección de A $\beta$  (Martín-Moreno *et al.* 2011).

En 2020, Kamkaen, *et al.* aislaron y evaluaron actividad neuroprotectora de CBD, CBN y THC en modelo de privación de suero y coadministración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dentro de los resultados obtenidos, CBD (10 ng/mL, 31.8 nM) y CBN (100 ng/mL, 322 nM) neuroprotegieron significativamente las neuronas cultivadas por daño debido a estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Kamkaen, Samee, y Tadtong 2020).

En 2021, Kim, *et al.* evaluaron la actividad neuroprotectora de CBD contra estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno *in vitro* en cultivo primario de neuronas hipocampales de crías de ratas Sprague-Dawley mediante análisis morfológico con microscopio confocal y cultivos tratados con CBD (0.1 – 100  $\mu$ M) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 – 50  $\mu$ M). Como resultados reportaron LC50 de CBD: 9.85  $\mu$ M y la neuroprotección de CBD 5  $\mu$ M contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10  $\mu$ M resultó en un incremento de la viabilidad celular de 24% a 57% y en el análisis morfológico se estableció que CBD no rescató completamente las alteraciones morfológicas como degeneración de neuritas (Kim *et al.* 2021).

### 1.12.2 Actividad neuroprotectora de valproato

En 2006, Bergeijk *et al.* evaluaron los efectos de valproato en línea celular PC12 como sistema modelo para diferenciación neuronal con respecto al crecimiento de neurita y expresión de gen de proteína de supervivencia de motoneuronas (SMN) relacionada con la enfermedad neurodegenerativa atrofia muscular espinal. Determinaron que VPA a concentración de 50  $\mu\text{M}$  no hubo incremento de longitud de neuritas, mientras que a 500 y 1000  $\mu\text{M}$  valproato promovió el crecimiento de neuritas (Van Bergeijk *et al.* 2006).

En 2010, Biermann, *et al.* evaluaron el efecto neuroprotector de valproato en células glanglionares de la retina mediante aplastamiento de nervio óptico y evaluaron tejido retinal, cuantificación de crecimiento de axón, evaluación de actividad de caspasa 3, análisis de transcripción de CREB y determinación de histona 3 y 4 acetiladas así como pERK 1/2. Determinaron que después del tratamiento con valproato subcutáneo existió mayor supervivencia de células ganglionares en comparación al control. Además, administración intravitreal retardó apoptosis, de igual manera se observó mayor regeneración de axones en cultivo que en aquellos tratados con control. Se estableció neuroprotección y neuroregeneración mediada por valproato acompañada por disminución de actividad de caspasa-3, inducción de CREB, activación de pERK1 / 2, sin embargo no hubo alteración de la acetilación de histonas (Biermann *et al.* 2010).

En 2010, Dash, *et al.* evaluaron el efecto de valproato en modelo de daño traumático cerebral mediante evaluación de la disminución de permeabilidad de barrera hematoencefálica, disminución de daño neuronal y mejora desarrollo cognitivo post daño. Como resultados se obtuvo que a dosis de 400 mg/Kg incrementaba acetilación de H3 y H4 y disminuyó la actividad de GSK-3 en hipocampo. 30 min después del daño, valproato mejoró la integridad de la barrera hematoencefálica mediante reducción de extravasación de colorante azul Evans. Además, se redujo daño dendrítico hipocampal, volumen de contusión cortical reducido, así como mejoría de función motora y memoria espacial (Dash *et al.* 2010).

En 2019, Iranapak *et al* evaluaron la inhibición de muerte celular, apoptosis, potencial de membrana mitocondrial y estrés oxidativo en línea celular PC12 por valproato de sodio (50 – 400  $\mu$ M) mediante inducción de daño por maltolato de aluminio (IC50: 1090  $\mu$ M. Obtuvieron que valproato disminuyó la muerte celular y apoptosis. Así mismo, disminuyó significativamente la generación de ROS, actividad de catalasa y reducción de MMP, estableciendo que la atenuación del daño fue por disminución de estrés oxidativo (Iranpak *et al.* 2019).

### 1.12.3 Actividad neuroprotectora de furosemida

En 2007, Luszczki et al. estudiaron la influencia de furosemida en la acción de fármacos antiepilépticos nuevos y convencionales (carbamazepina, lamotrigina, oxcarbazepina, fenobarbital, topiramato y valproato, en el modelo de MES y obtuvieron que furosemida (100 mg/kg, i.p.) no alteró el umbral para electroconvulsiones en ratones macho albino suizos. Sin embargo, potenció el efecto anticonvulsivo de VPA en el ensayo MES mediante la reducción del valor de ED50 que cambió de 230.4 a 185.4 mg/kg y no presentó efecto significativo en el resto de los fármacos evaluados.(Luszczki *et al.* 2007)

En 2020, Wang, *et al.* reportaron la actividad de furosemida 50  $\mu$ M en la reducción de la neuroinflamación en la línea celular SIM-A9, ya que, inhibe secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y óxido nítrico; además disminuye el nivel de Cd86 y la expresión de proteína COX-2, iNOS y promueve actividad fagocítica, además como potenciar la expresión de factores antiinflamatorios como IL-1RA y arginasa. Mediante daño inducido por lipopolisacárido de pared bacteriana (LPS 5 ng/mL). Así mismo, se reportó la capacidad para disminuir el fenotipo microglial M1 y potenciar el fenotipo antiinflamatorio M2 (Z. Wang *et al.* 2020).

#### 1.12.4 Actividad neuroprotectora de bilobalida

En 2007, Mdzinarishvili, *et al.* evaluaron la propiedad de bilobalida de prevenir formación de edema *in vitro* en modelo de privación de oxígeno-glucosa en rebanadas de hipocampo de rata. Se obtuvo que la privación de oxígeno-glucosa causó formación de edema por un incremento en el contenido de agua de la rebanada en 30 minutos mientras que bilobalida (1 – 10  $\mu\text{M}$ ) redujo el contenido de agua de las rebanadas de forma dosis dependiente. Como un modelo de isquemia *in vivo* se realizó la metodología de oclusión de la arteria media cerebral en ratones y el pretratamiento con bilobalida 10 mg/Kg disminuyó el área de infarto por 43% y la formación de edema en 70%. Además, se atenuó el contenido de agua en hemisferio isquémico en 57% (Mdzinarishvili *et al.* 2007).

En 2011, Lang, *et al.* determinaron las propiedades neuroprotectoras de bilobalida en modelo de oclusión de arteria media cerebral determinando que bilobalida (10 mg/Kg) disminuyó áreas de infarto en la región central en un rango de 40-50% administrada 1 h antes de la oclusión. Además, se observó a dosis menores o cuando se administró 1 h posterior a la inducción del daño cerebral. La función sensorial motora de los ratones mejoró por en los ensayos de esquina y chimenea. Los niveles extracelulares de glutamato en tejido estriatal e hipocampal y bilobalida disminuyó estos valores en ambas regiones. Además, disminuyó la isquemia inducida por glutamato en rebanadas de

cerebro *in vitro*. De esta manera establecieron que es capaz de reducir el proceso de excitotoxicidad, (Lang *et al.* 2011).

En 2013, Schwarzkopf, *et al.* evaluaron efectos neuroprotectores en ratones envejecidos mediante modelo de isquemia transitoria por oclusión de arteria media cerebral por 60 minutos. Determinando que bilobalida administrada localmente en el cuerpo estriado por microdiálisis existió reducción significativa del tamaño del infarto casi 70% observado. Además, el incremento extracelular de glutamato observado en animales no tratados fue fuertemente reducido. Los niveles de glucosa no se vieron afectados. En otro tipo de experimentos, se administró bilobalida vía intraperitoneal (10 mg/Kg) 1 h antes de la oclusión. Los niveles de ATP fueron significativamente reducidos pero, bilobalida previno dicha perdida (Schwarzkopf, Koch, y Klein 2013).

En 2014, Jiang, *et al.* investigaron el papel de bilobalida (5, 10 mg/Kg) en modelos de oclusión de arteria media cerebral y reperusión y privación de oxígeno-glucosa y reoxigenación de daño cerebral mediante modelo de isquemia y reperusión en ratas Sprague-Dawley sometidas a oclusión de arteria media cerebral por 2 horas seguida por reperusión por 24 h. Bilobalida fue administrada 60 minutos intraperitonealmente antes de la oclusión y los resultados que obtuvieron demostraron que el pretratamiento con bilobalida disminuyó volumen de infarto, peso de infarto, edema cerebral y concentración de MDA, óxido nítrico, TNG- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e incrementó la actividad de superóxido dismutasa. Además, disminuyó significativamente la expresión de p-JNK1/2 y p-

p38 MAPK, pero no cambió expresión de p-ERK1/2 en neuronas corticales después del daño (Jiang *et al.* 2014).

#### 1.12.5 Actividad neuroprotectora de metformina

En 2016, Khallaghi *et al.* evaluaron el efecto protector de metformina (0.1, 0.5, 1, 3, 5 y 7 mM) ante el daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 µM mediante ensayo de MTT. De acuerdo con la morfología y MTT se estableció la existencia significativa contra daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en concentraciones de 0.1 y 0.5 mM. Además, existió protección de acuerdo a actividad elevada de PI3K / Akt / mTOR / S6K así como potenciación de niveles de GSH, (Khallaghi *et al.* 2016).

En 2016, Zhou, *et al.* se evaluó el efecto atenuador de apoptosis inducida por glutamato (30 µM) en neuronas cerebelares granulares mediante bloqueo de actividad de caspasa-3 y fosforilación de JNK o p38. Se sugiere que metformina (20, 50 y 100 µM) podría proteger directamente las neuronas cerebelares granulares de apoptosis inducida por glutamato por inhibición caspasa-3 o independiente de rutas JNK/p38, (Zhou *et al.* 2016) .

En 2018, Zhao, *et al.* evaluaron la actividad protectora de metformina (0.25 – 8 mM) en línea celular PC12 de daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM. Demostraron que metformina disminuyó muerte celular debido al daño por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por restauración de cambios anormales en morfología nuclear, especies reactivas de oxígeno intracelular, lactato deshidrogenasa y potencial de

membrana mitocondrial. Además, hubo reducción de apoptosis y estimulación de fosforilación y activación de proteína cinasa activada por AMP (AMPK) estableciendo de esta forma que metformina es capaz de proteger neuronas de daño oxidativo al menos en parte activación de AMPK , (Zhao *et al.* 2019).

### **1.13 Hipótesis**

Al menos una combinación de los tipos de CBD o su metabolito activo con ácido valproico, furosemida, metformina o bilobalida presentan efecto neuroprotector y sinérgico

### **1.14 Justificación**

Considerando el extenso tiempo de investigación y desarrollo de moléculas nuevas con actividad neuroprotectora y las ventajas que ofrece la metodología de reposicionamiento farmacológico, así como la información existente de moléculas presuntamente neuroprotectoras y el uso de CBD en conjunto y como coadyuvante, cuya actividad neuroprotectora se encuentra documentada y con el amplio espectro de mecanismos de acción entre los que destaca su actividad antiinflamatoria. Su uso en combinación con moléculas presuntamente neuroprotectora como ácido valproico, furosemida, bilobalida y metformina, presentarían efectos benéficos en la disminución de la muerte neuronal a causa de procesos neurodegenerativos.

## 1.15 Objetivo general

Evaluar el efecto neuroprotector de dos tipos de cannabidiol y su metabolito activo en combinación binaria con fármacos presuntamente neuroprotectores en modelo *in vitro*.

### 1.15.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto neurotóxico de tres formas de cannabidiol (CBD, 7-OH-CBD y CBD/AGCM) en combinación binaria con ácido valproico, furosemida, bilobalida y metformina en línea celular PC12, mediante ensayo de MTT
2. Evaluar el efecto neuroprotector de tres formas de cannabidiol (CBD, 7-OH-CBD y CBD/AGCM) en combinación binaria con ácido valproico, furosemida, bilobalida y metformina en línea celular PC12, mediante proceso de excitotoxicidad por glutamato y ensayo de MTT
3. Evaluar la capacidad antioxidante de tres formas de cannabidiol (CBD, 7-OH-CBD y CBD/AGCM) en combinación binaria con ácido valproico, furosemida, bilobalida y metformina mediante ensayo de DPPH
4. Evaluar la actividad inhibidora de especies reactivas de oxígeno de tres formas de cannabidiol (CBD, 7-OH-CBD y CBD/AGCM) en combinación binaria con ácido valproico, furosemida, bilobalida y metformina en línea celular PC12, mediante ensayo de DCFDA

5. Evaluar la actividad antiapoptótica de cannabidiol, bilobalida y metformina en combinación binaria en línea celular PC12, mediante evaluación de actividad de caspasa-3
6. Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material y reactivos**

##### **2.1.1 Material biológico**

Los ensayos de neuroprotección y neurotoxicidad, se realizaron en la línea celular PC12 (ATCC<sup>®</sup>, CRL-1721), correspondiente a glándula adrenal de rata y considerada como línea celular neuronal. Las líneas celulares empleadas se conservaban congeladas a -80°C en el ultracongelador del Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos.

### 2.1.2 Equipos e instrumentos

Agitador / Placa de calentamiento (Corning), balanza analítica HR200 (AND), bomba de vacío A530 (HSENG), cámara Neubauer, campana de flujo laminar CFL102V (VICHI México), centrífuga refrigerada Sorvall ST16R (Thermo-Scientific), congelador horizontal -20°C CH10 (Torrey), esterilizador eléctrico autoclave 25x (All American), Incubadora MIDI 40 CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo-Fisher), frascos de vidrio 1 L (Kimax), frascos de vidrio 250 mL (Kimax), frascos de vidrio de 100 mL (Pyrex), invertoscopio TCM 400 (Labomed), lector de microplaca ELISA ELx800 (Biotek instruments), lector fluorómetro de microplaca Fluoroskan ascent (Thermo-Fisher), microcentrífuga Micro CL 17R (Thermo-Scientific), microplaca de 96 pocillos fondo plano (Costar), microplaca de 96 pocillos fondo redondo (Costar), pipetas estériles desechables 10 mL (Costar), potenciómetro pHep tester (Hanna instruments), sistema de purificación de agua Simplicity UV (Millipore), tubos Falcon 15 y 50 mL (Corning), ultracongelador horizontal -80°C HERA FREEZE HFC series (Thermo-Fisher).

### 2.1.3 Reactivos

CBD (Spex CertiPrep), 7-OH-CBD (MilliporeSigma Supelco), ácido valproico, metformina, bilobalida, trolox, glutamato, DCFDA, xantina oxidasa, DPPH,

DMSO, MTT, (Sigma-Aldrich), furosemida (PiSA laboratorios), RHOil 5 (HempMeds), 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) D9132 (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico, agua destilada, alcohol etílico, alcohol isopropílico, alcohol metílico, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) M5655 (Sigma-Aldrich), cloruro de potasio CP170126-01 (DEQ), cloruro de sodio 561-1 (DEQ), dimetilsulfóxido D4540 (Sigma-Aldrich), dodecil sulfato de sodio DSS170126-01 (DEQ), fosfato de potasio dibásico anhidro FPDA170126-01 (DEQ), fosfato de sodio dibásico anhidro FSDA170126-01 (DEQ), L-Ácido glutámico G8415 (Sigma-Aldrich), medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) MEP12-10LT (Caisson), medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) RPP12-10LT (Caisson), penicilina – estreptomicina 1%, Suero fetal bovino (SFB) (Caisson), tripsina (Caisson), Tritón X-100 H5142 (Promega).

## 2.2 Métodos

Las concentraciones empleadas para cada compuesto han sido previamente evaluadas, CBD, 7-OH-CBD y CBD disuelto en ácidos grasos de cadena media fue de 5  $\mu\text{M}$ , (Kim *et al.* 2021), en caso de ácido valproico de inicio a dosis de 200  $\mu\text{g/mL}$  (Brunn *et al.* 2014), sin embargo, en la línea celular PC12 presentó neurotoxicidad importante en ensayos previos, así que la dosis final se ajustó a 62.5  $\mu\text{g/mL}$  (216.7 $\mu\text{M}$ ). Bilobalida 5  $\mu\text{g/mL}$ (15.3  $\mu\text{M}$ ) (Chandrasekaran *et al.* 2003). Furosemida se evaluó de manera inicial a 16 500

$\mu\text{g/mL}$  (Z. Wang *et al.* 2020), sin embargo la dosis se disminuyó a 200  $\mu\text{g/mL}$  (604.7  $\mu\text{M}$ ) debido a la disminución importante de la viabilidad celular en la línea celular PC12. Metformina 200  $\mu\text{g/mL}$  (1548.4  $\mu\text{M}$ ) (Gabryel y Liber 2018).

Para la evaluación del efecto neuroprotector y el establecimiento del mecanismo principal relacionado a este efecto, se realizaron una serie de ensayos enfocados en medir las respuestas fisiopatológicas del proceso de excitotoxicidad y establecer la manera en la que la exposición a concentraciones controladas de CBD en combinación con ácido valproico, furosemida, bilobalida y metformina, afectaban el comportamiento de éstas. Entre los efectos existentes en el proceso de excitotoxicidad, destacan la producción de especies reactivas de oxígeno, incremento de la concentración de calcio intracelular y activación de las vías de señalización que culminan en apoptosis celular.

El cultivo de la línea celular PC12, se realizó en medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB. Dicha línea celular se mantuvo en condiciones de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas o hasta formación de monocapa (ATCC®, 2018).

Para los ensayos de actividad neurotóxica y evaluación del efecto neuroprotector se prepararon placas de 96 pocillos una vez alcanzada la confluencia de 70%-90% en los frascos de cultivo de línea celular PC12. La concentración celular empleada fue de 10 000 células / 0.1 mL, las cuales se colocaron en cada uno de los pocillos y se incubó a condiciones de 37 °C, 5%

de CO<sub>2</sub> de 24 a 48 horas o hasta la formación de monocapa, para el posterior tratamiento con los compuestos a evaluar.

Para el ensayo de actividad de caspasa-3 se realizó por la metodología descrita en el inserto propio del kit comercial (EnzChek™ Caspase-3 Activity Assay Kits, cat: E13183) se prepararon cajas Petri de 35 mm. Una vez alcanzada la confluencia de 70%-90% en los frascos de cultivo de línea celular PC12. La concentración celular empleada fue de 1 000 000 células / 0.1 mL, las cuales se colocaron en cajas Petri y se incubó a condiciones de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> de 24 a 48 horas o hasta la formación de monocapa, para el posterior tratamiento con los compuestos y combinaciones a evaluar.

La parte experimental correspondiente a la evaluación de la respuesta neurotóxica y neuroprotectora de los compuestos se realizaron en el cuarto de cultivo número dos del Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 2.2.1 Evaluación de la actividad neurotóxica mediante el ensayo de MTT

Se colocaron 10 000 células / pocillo, cumplido el lapso de 24 h y formada la monocapa se colocaron las moléculas solas y en combinación binaria de CBD con valproato, furosemida, bilobalida y metformina a las concentraciones mencionadas anteriormente. El mismo procedimiento se

realizó con las evaluaciones de 7-OH-CBD y CBD (RHOil). Transcurrido el periodo de 24 h, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con solución de MTT (0.5 mg/mL). Posteriormente, se incubó durante 3 h a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. Cumplido el periodo de incubación se retiró la solución de MTT y se colocó una solución de alcohol isopropílico / HCl (10%) y se incubó en oscuridad durante 30 minutos para posteriormente leer absorbancia a 550 nm y obtener el porcentaje de viabilidad celular (Denizot y Lang 1986). Como control positivo de neurotoxicidad se empleó glutamato 25 mM. Células sin tratamiento se consideraron control de 100% de viabilidad. Cada ensayo fue realizado por triplicado.

La siguiente ecuación fue usada para calcular el porcentaje de viabilidad:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{(ABSx - ABSo) * 100}{(ABSctl - ABSo)}$$

ABSx = Absorbancia de la muestra

ABSo = Absorbancia del blanco

ABSctl = Absorbancia del control

### 2.2.2 Ensayo de neuroprotección mediante el ensayo de MTT

Se inició el procedimiento de la misma manera que el ensayo de neurotoxicidad hasta formada la monocapa, pero se realizó un pretratamiento

de 2 h, (Patel et al. 2019) con los compuestos solos y en combinación como se indicó con anterioridad. Transcurrido el pretratamiento, se colocaron 0.1 mL de glutamato 25 mM (Chen *et al.* 2017) y se incubó la microplaca durante 22 h a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. Cumplido el periodo de incubación se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con solución de MTT (0.5 mg/mL), e incubación durante 3 h a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. Posteriormente, se retiró la solución de MTT, se colocó una solución de alcohol isopropílico / HCl (10%) y se incubó en oscuridad durante 30 minutos para posteriormente leer absorbancia a 550 nm para obtener el porcentaje de viabilidad celular. Como control positivo de neuroprotección se empleó Trolox ® a concentración de 50 µM (Xin 2019). El ensayo se realizó por triplicado.

La siguiente ecuación fue usada para calcular el porcentaje de viabilidad:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{(ABSx - ABSo) * 100}{(ABSctl - ABSo)}$$

ABSx = Absorbancia de la muestra

ABSo = Absorbancia del blanco

ABSctl = Absorbancia del control

### 2.2.3 Ensayo de capacidad antioxidante mediante inhibición de DPPH

Para la realización de la actividad antioxidante se realizó conforme al protocolo de captación del radical libre estable DPPH a concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Okawa *et al.* 2001). Se colocaron 0.1 mL de las combinaciones y las moléculas solas a concentraciones de CBD, 7-OH-CBD y CBD (RHOil) 5  $\mu\text{M}$ , (Kim *et al.* 2021), ácido valproico 62.5  $\mu\text{g/mL}$ . Bilobalida 5  $\mu\text{g/mL}$ . Furosemida 200  $\mu\text{g/mL}$  y metformina 200  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, se colocaron 0.1 mL de solución de DPPH en cada pocillo y la microplaca se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Cumplido el periodo de incubación se realizó la lectura de absorbancia a 517 nm. Como control negativo de actividad antioxidante se emplearon pocillos que contenían solución de DPPH 100  $\mu\text{M}$ . El ensayo se realizó por triplicado y se empleó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de inhibición de DPPH.

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{((\text{ABS}_{\text{ctl}} - \text{ABS}_{\text{x}}) * 100)}{\text{ABS}_{\text{ctl}}}$$

ABS<sub>ctl</sub> = Control absorbance

ABS<sub>x</sub> = Test absorbance

### 2.2.4 Actividad de inhibición de especies reactivas de oxígeno

Para el ensayo de inhibición de producción de especies reactivas de oxígeno se empleó el método de 2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína,

(H<sub>2</sub>DCFDA) (Tarpey *et al.* 2012). A placas de 96 pocillos con 10 000 células / pocillo de la línea celular PC12 se le colocó los compuestos solos y en combinación previamente descritos. Se incubó durante 2 horas las microplacas como pretratamiento y posteriormente se añadieron 0.1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM. Además, se añadió solución de H<sub>2</sub>DCFDA (0.05 mg/mL) y se incubó durante 1 h. Se realizó lectura a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Como control negativo se empleó celdas con células PC12 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM, como control positivo se empleó Trolox ® 50 µM. Se realizó el cálculo de los valores promedios y desviación estándar de lectura de fluorescencia emitida por las células PC12 sometidas a tratamiento con las moléculas solas y en combinación, así como los controles.

### 2.2.5 Evaluación de la actividad de caspasa-3

La activación de la caspasa 3, (CPP32/apopain), tiene un substrato específico para la secuencia de aminoácidos Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), y rompe diferentes proteínas incluyendo poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), proteína quinasa DNA-dependiente, proteína quinasa Cδ y actina (Molecular Probes, 2003).

La evaluación de la actividad antiapoptótica se realizó con el empleo del kit EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #2, el cual permite la detección de apoptosis, por el incremento de la actividad de caspasa-3 y otras proteasas específicas de la secuencia DEVD (p.ej. caspasa 7). El fundamento del ensayo

se basa en el rompimiento del sustrato rodamina 110 bis-(amida *N*-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-ácido aspártico) (Z-DEVD-R110). Este sustrato es una bisamida derivada de rodamina 110 (R110) que tiene unidos covalentemente los péptidos DEVD a cada grupo amino de R110. De este modo, se suprime la absorción visible del colorante y su fluorescencia. Por rompimiento enzimático, el sustrato bisamida no fluorescente es convertido a la monoamida fluorescente y después al más fluorescente R110, en un proceso de dos pasos. Ambos productos de la hidrólisis exhiben propiedades espectrales similares a los de fluoresceína, con picos de excitación y emisión a longitudes de onda de 496 nm y 520 nm, respectivamente. Además, del sustrato Z-DEVD-R110.

Para la realización del ensayo de actividad de caspasa-3 se consideró los compuestos con mejores resultados de actividad neuroprotectora y su combinación con CBD, siendo así que se realizó la evaluación de CBD, metformina y bilobalida con su respectiva combinación.

Formada la monocapa de la línea celular PC12 en las cajas Petri, se retiró el medio y se colocaron 1 mL de medio RPMI-1640 fresco en cada pocillo y posteriormente se realizó el pretratamiento de las células depositando 1 mL de los compuestos solos y en combinación, así como el control positivo de neuroprotección (Trolox 50  $\mu$ M) y como control negativo se emplearon células sin tratamiento. Además, como inductor de apoptosis se empleó glutamato 25 mM; con posterior incubación a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> que fue depositado 2 h después de colocados los compuestos a evaluar, a continuación, se incubó por 2 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.5.1 Ensayo de caspasa-3

Transcurrido el tiempo de exposición de las células a los compuestos y los controles, se retiró el medio de las cajas Petri y se cosecharon las células, posteriormente se lavaron con PBS. Se preparó una solución de trabajo de buffer de lisis celular 1X, agregando 50  $\mu$ L del buffer de lisis 20X (componente C) a 950  $\mu$ L de agua des ionizada. Se resuspendió cada muestra celular o control en 50  $\mu$ L del buffer de lisis celular 1X y se sometieron a ciclos de congelamiento-descogelamiento por 30 minutos. Se preparó una solución de buffer de reacción 2X, agregando 400  $\mu$ L de buffer de reacción 5X (componente D) y 10  $\mu$ L de DTT 1M a 590  $\mu$ L de agua des ionizada. El lisado celular fue centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos.

Se realizó la cuantificación de proteínas por metodología de Bradford para hacer los ajustes de concentración de proteínas y establecer la actividad debida a caspasa-3. De acuerdo con la concentración total de proteína obtenida; se ajustó a concentración de 50  $\mu$ g y se complementó con buffer de lisis 1X para obtener un volumen final de 50  $\mu$ L.

Una vez realizado el ajuste de concentración proteica; se transfirieron 50  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra a pocillos individuales de microplaca (por triplicado), respetando el orden de exposición a los compuestos. Se cubrió e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. A la par de incubación de las muestras, se preparó una solución de trabajo del substrato 2X, mezclando 10  $\mu$ L de Z-DEVD-R110 5 mM con 990  $\mu$ L de buffer de reacción 2X. Transcurrido el tiempo de incubación, se depositaron 50  $\mu$ L de la solución de trabajo del

substrato 2X a cada muestra y control. La microplaca fue cubierta e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos.

Se preparó una curva de estándar R110, diluyendo la solución *stock* de R110 5 mM en buffer de reacción 1X a concentraciones de 0 a 25  $\mu$ M. Se depositaron 0.1 mL de la solución estándar en pocillos vacíos antes de la medición de fluorescencia.

La fluorescencia fue medida a 496 nm/ 520 nm usando filtros de excitación y emisión. Los resultados se expresaron como promedios y desviaciones estándar. Se realizó la prueba de ANOVA para establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos y el grupo control.

### **2.3 Manejo de los residuos**

Los residuos generados durante la fase de cultivo celular, como fueron frascos de cultivo, cajas de 96 pocillos y cajas Petri, fueron esterilizados y colocados en bolsas rojas para su posterior recolección.

Los contenedores empleados fueron:

*A:* Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.

*E:* Muy tóxico, cancerígeno orgánico.

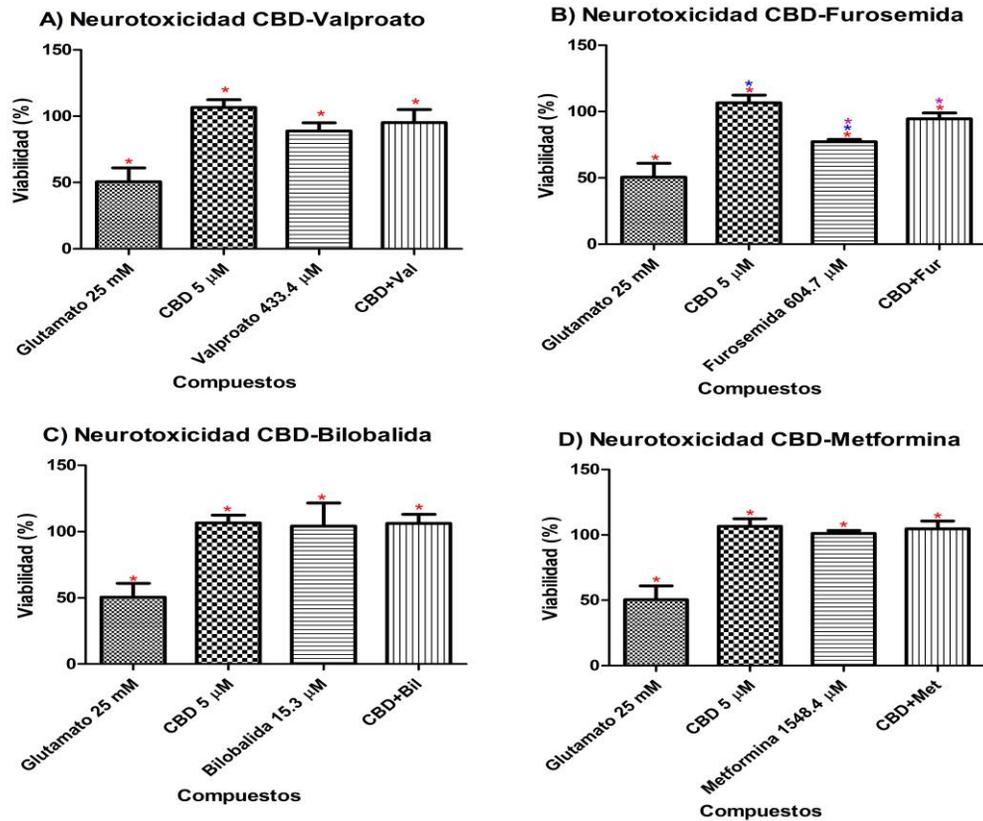
*Bolsa roja:* Frascos de cultivo, microplacas de 6 y 96 pocillos, reservorios para medios de cultivo, combitips, tubos Falcon de 50 y 15 mL, tubos eppendorf.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### 3.1 Actividad neurotóxica

El CBD y los demás fármacos evaluados no mostraron actividad neurotóxica y los resultados de viabilidad celular oscilaron entre 77.3 y 109.9% para furosemida y CBD, respectivamente. La furosemida presentó menor viabilidad celular que el CBD (77.3 vs 109.9%). Las combinaciones de CBD con los otros fármacos tampoco mostraron neurotoxicidad. ANOVA mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el control positivo de glutamato 25 mM (47 %) y los otros fármacos solos y combinados ( $p > 0.05$ ). La furosemida mostró una diferencia significativa con el CBD y la combinación de CBD más furosemida (94.6 %). Los demás fármacos y sus combinaciones mostraron resultados superiores al 80% (Figura 11).



**Figura 11. Actividad neurotóxica de CBD, solo y combinado con fármacos**

El metabolito del CBD, el 7-OH-CBD, no mostró neurotoxicidad a la concentración evaluada, oscilando la viabilidad celular entre 77,3 – 116,4% para furosemida y combinación de 7-OH-CBD más metformina, respectivamente. La combinación de este metabolito con los demás fármacos tampoco mostró neurotoxicidad y los valores de viabilidad celular estuvieron por encima del 80% y el control positivo de neurotoxicidad del glutamato 25 mM fue del 47%, ( $p > 0.05$ ) (Figura 12).

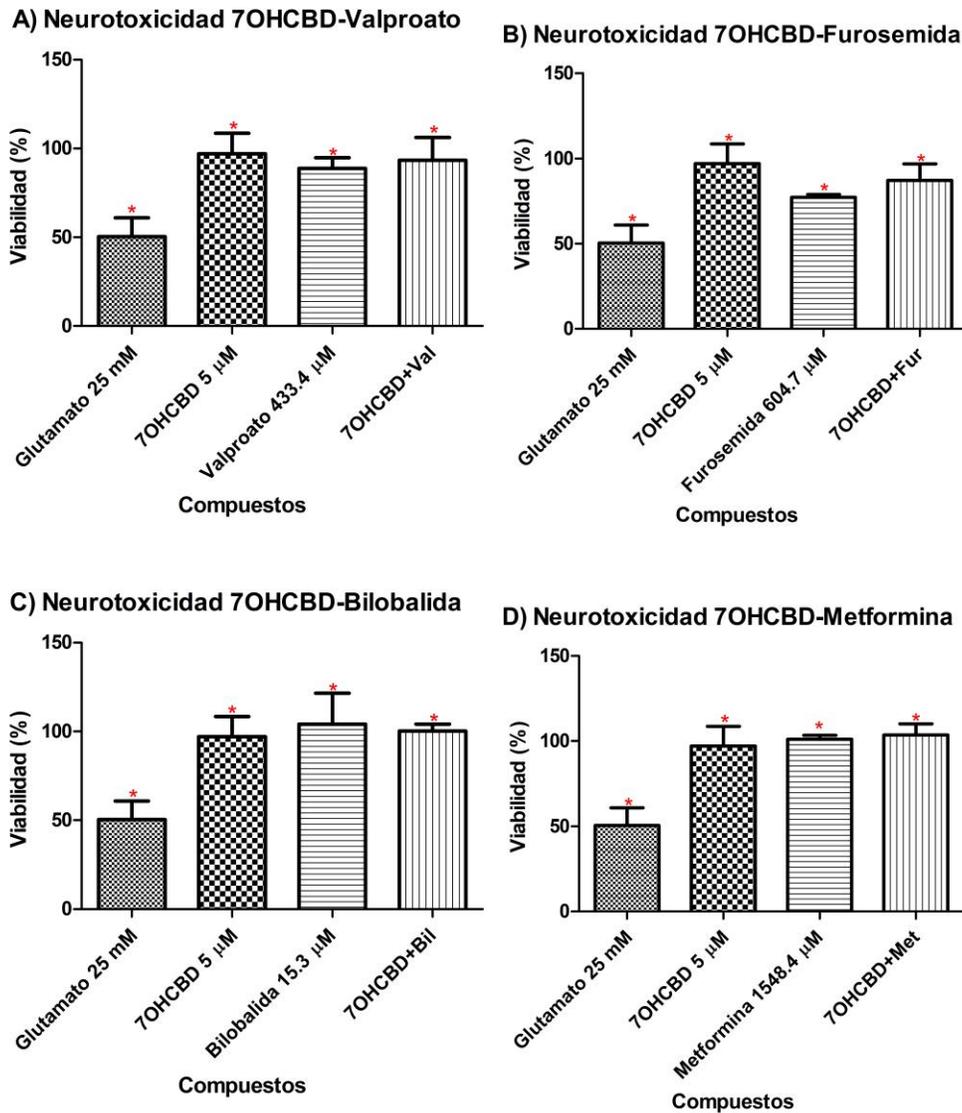


Figura 12. Actividad neurotóxica de 7-OH-CBD, solo y combinado con fármacos

El CBD en presentación disuelto en ácidos grasos de cadena media de coco (RHOil), obtuvo valor de viabilidad celular de  $83.2 \pm 11.9\%$ ; siendo menor que las otras dos presentaciones de CBD y su metabolito. Sin embargo, existe diferencia estadísticamente significativa entre RHOil y el control positivo de neurotoxicidad de glutamato 25 mM siendo el valor obtenido de la combinación

de RHOil con furosemda el de menor porcentaje de viabilidad (82.6%) y existiendo diferencia estadísticamente significativa respecto al control de neurotoxicidad de glutamato (47.0%) ( $p > 0.05$ ) (Figura 13).

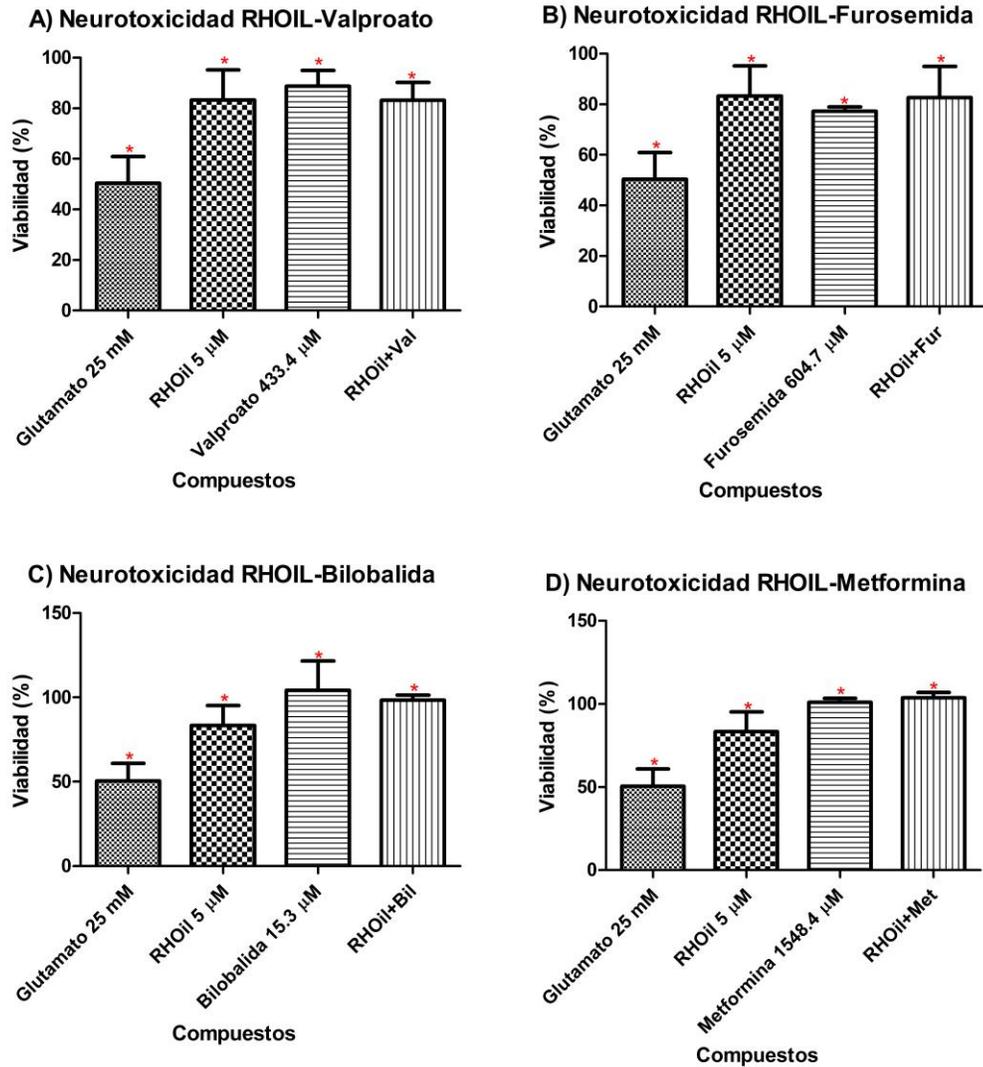
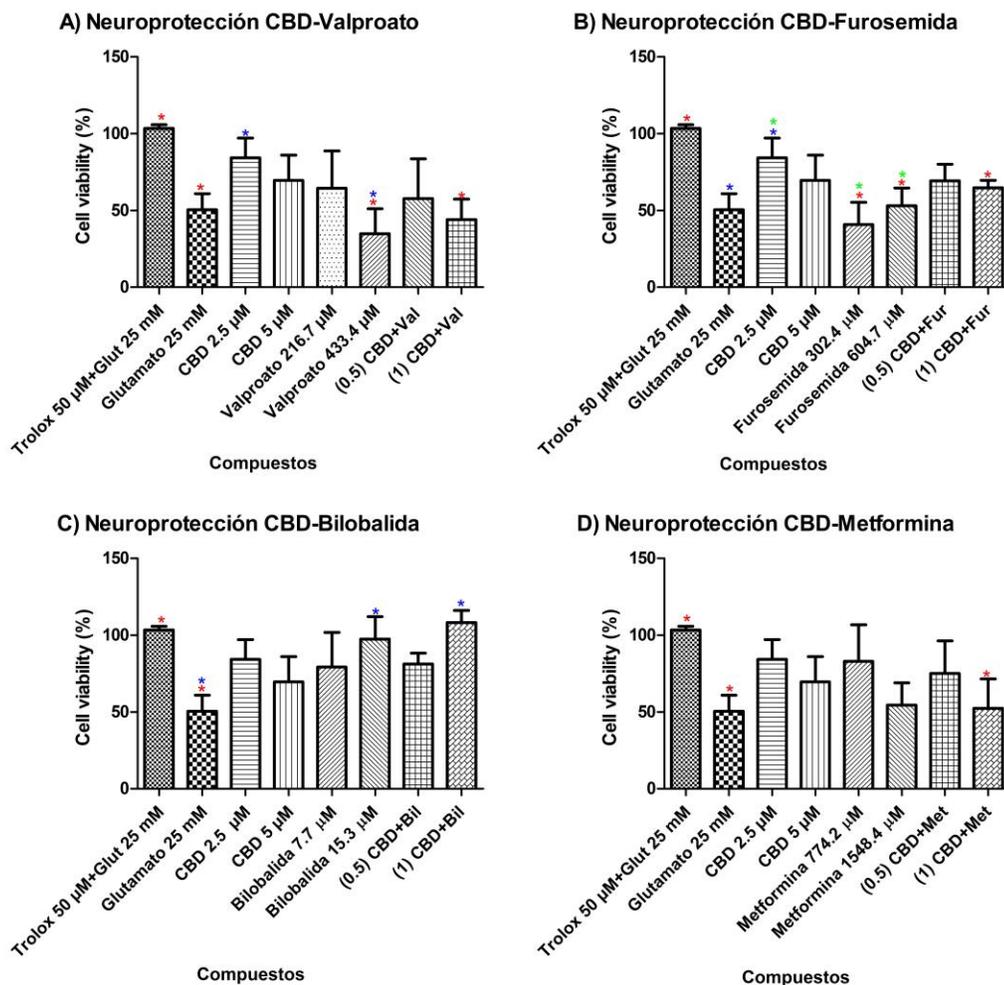


Figura 13. Actividad neurotóxica de RHOil, solo y combinado con fármacos

### 3.2 Actividad neuroprotectora

El CBD solo aumentó la viabilidad celular en un 20 % (69.6 %) de las células expuestas previamente a glutamato 25 mM, que mostró una viabilidad celular del 47 %, sin embargo, fue menor que el control positivo, Trolox 50  $\mu$ M (109 %). ANOVA mostró diferencia significativa entre el control positivo Trolox 50  $\mu$ M y otros fármacos solos y mezclados con CBD 5  $\mu$ M ( $p > 0,05$ ), excepto con bilobalida 15.3  $\mu$ M (97,6%) y la combinación con CBD (112.5%). La bilobalida mostró una diferencia significativa con el glutamato 25 mM y la combinación con CBD fue mayor que el CBD solo (112.5 % frente a 69.6 %, respectivamente).

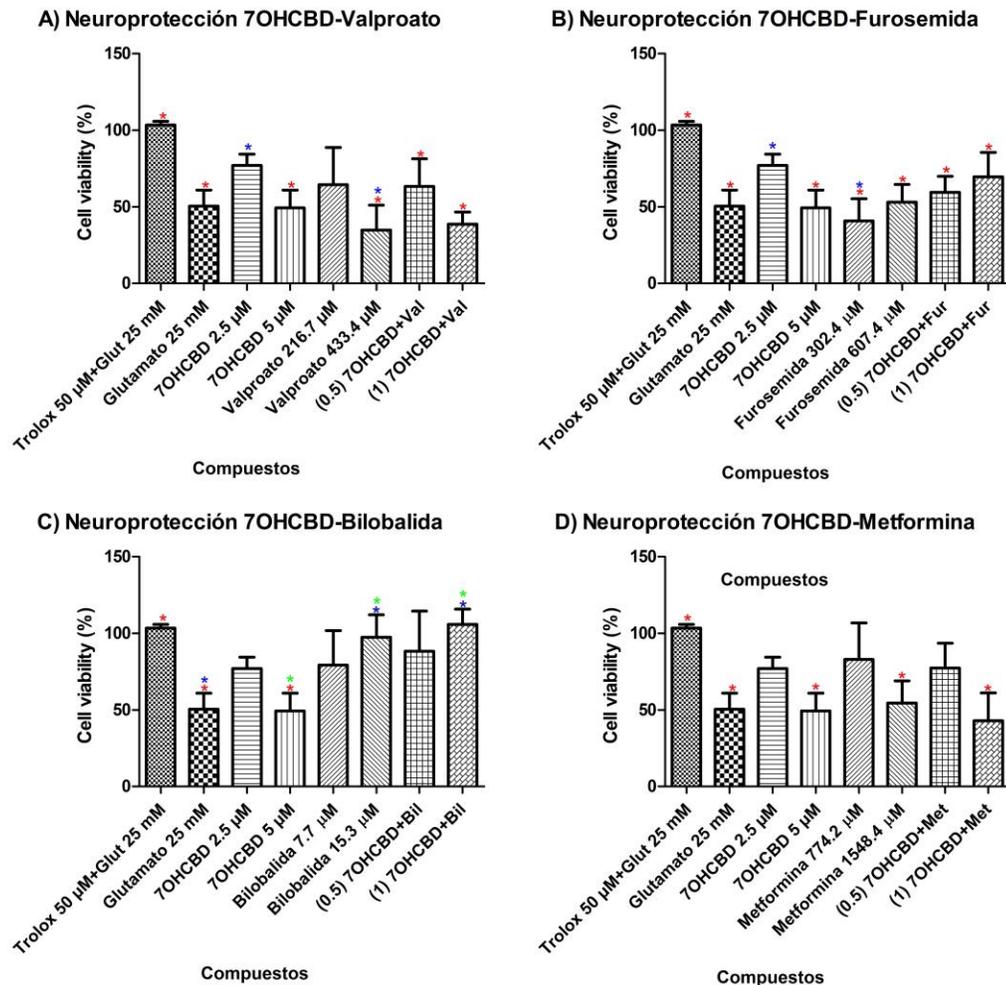
Para compuesto solo y en combinación con CBD a dos dosis, (siendo la dosis menor la mitad de la dosis mayor. CBD: 2.5 y 5  $\mu$ M; valproato: 216.7 y 433.4  $\mu$ M; furosemida: 302.4 y 604.7  $\mu$ M; bilobalida: 7.7 y 15.3  $\mu$ M y metformina 774.2 y 1548.4  $\mu$ M) demuestra que no hay efecto sinérgico o aditivo estadísticamente significativo (ANOVA), entre el CBD y las otras moléculas en el modelo evaluado (Figura 14).



**Figura 14. Actividad neuroprotectora de CBD, solo y combinado con fármacos**

Los valores de neuroprotección de 7-OH-CBD (49.4 %) fueron como el control negativo de glutamato 25 mM (47.0%) y no mostró efecto neuroprotector. ANOVA mostró que otros fármacos solos y combinados fueron significativamente diferentes con el control de neuroprotección positivo de Trolox 50 µM ( $p > 0,05$ ). Solo bilobalida 15.3 µM mostró efecto neuroprotector solo (97.6 %) y mezclado con 7-OH-CBD (105.9 %). Así como la existencia de

diferencias estadísticamente significativas con respecto al glutamato 25 mM y 7-OH-CBD 5  $\mu$ M, (Figura 15)



**Figura 15. Actividad neuroprotectora de 7-OH-CBD, solo y combinado con fármacos**

La evaluación del efecto neuroprotector de RHOil a dosis alta y dosis baja fue similar y al combinarse con las otras moléculas solo se observó mayor efecto al combinarse con bilobalida 15.3  $\mu$ M (Figura 16)

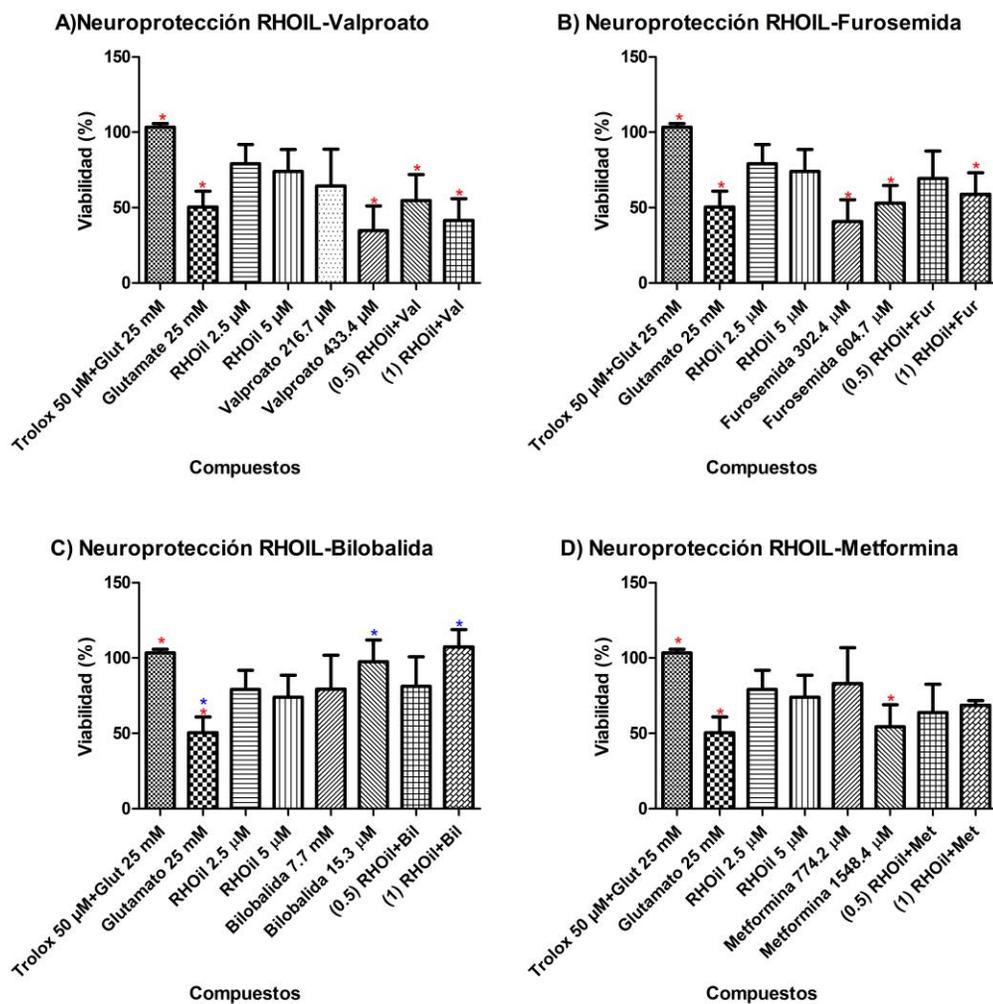


Figura 16. Actividad neuroprotectora de RHOil, solo y combinado con fármacos

### 3.3 Capacidad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante del CBD solo y en combinación con las otras moléculas supuestamente neuroprotectoras, se realizó el ensayo de inhibición de radical DPPH. Siendo el CBD 5 µM el que tuvo mayor actividad antioxidante con un porcentaje de inhibición de 9.37%. Los

otros compuestos solos y en combinación obtuvieron porcentajes en un rango de 3.87% a 8.21%, (valproato y CBD con furosemida, respectivamente). Sin embargo, el ANOVA realizado determinó que había diferencias estadísticamente significativas con el control de la actividad antioxidante Trolox 50  $\mu\text{M}$  el cual, tuvo resultados de 71.35% de inhibición de radical DPPH ( $p > 0.05$ ) (Figura 17).

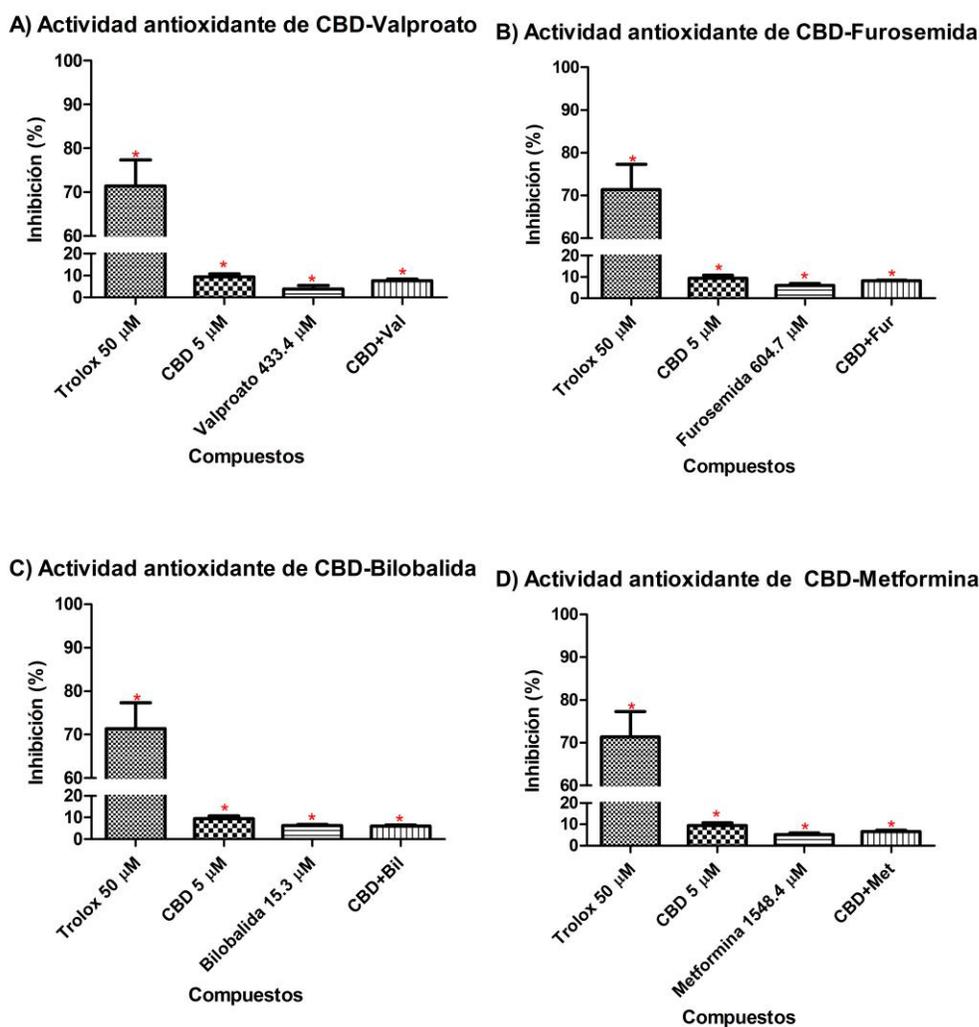


Figura 17. Capacidad antioxidante de CBD, solo y combinado con fármacos

El metabolito activo 7-OH-CBD 5  $\mu\text{M}$  obtuvo un porcentaje de inhibición de radical DPPH de 4.62 %, siendo menor que el resultado obtenido por el CBD 5  $\mu\text{M}$  de 9.37%. Los resultados de los otros compuestos en combinación fueron menores en comparación de los compuestos combinados con CBD, en un rango de 4.44 % a 5.34 % (correspondientes a 7-OH-CBD con valproato y 7-OH-CBD con metformina). Además, también el resultado de ANOVA determinó que hubo diferencias estadísticamente significativas respecto al control de actividad antioxidante Trolox 50  $\mu\text{M}$  (Figura 18).

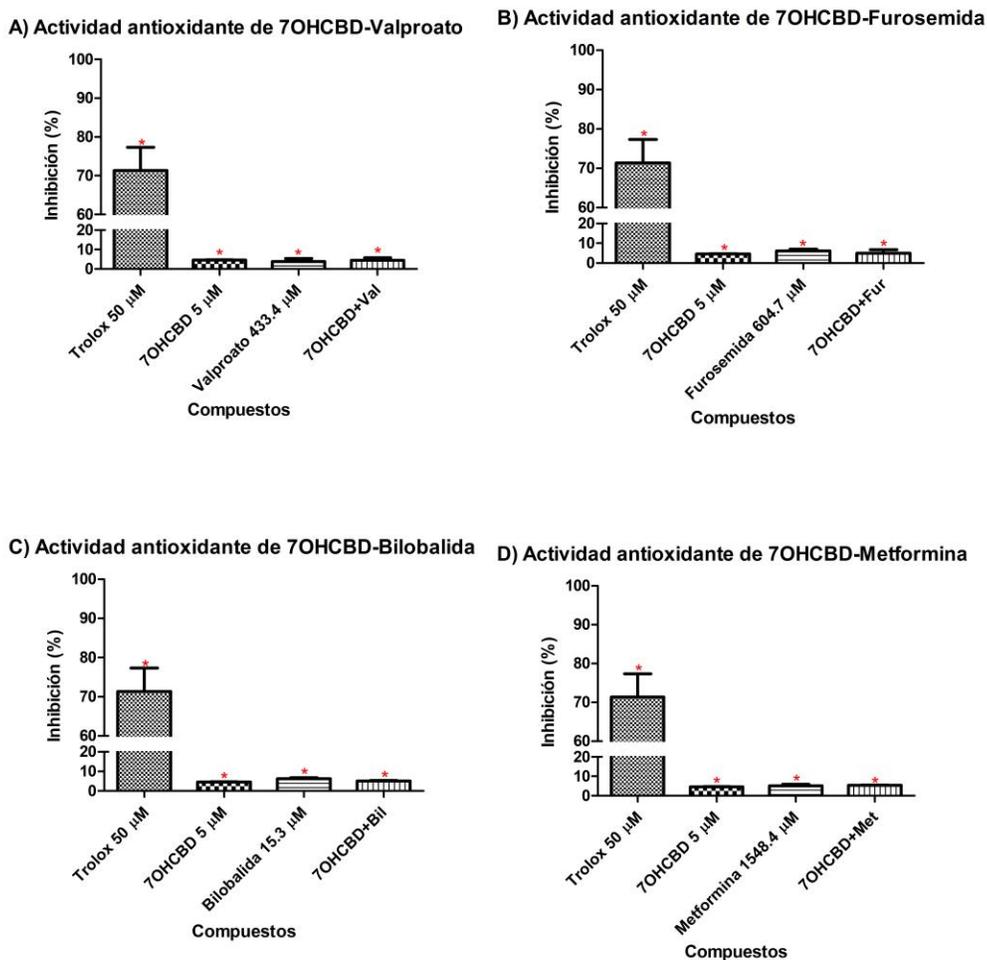


Figura 18. Capacidad antioxidante de 7-OH-CBD, solo y combinado con fármacos

La actividad antioxidante del CBD disuelto en ácidos grasos de cadena media de coco (RHOil) fue menor en comparación con los otros dos tipos de CBD con porcentaje de inhibición de 3.5% (CBD: 9.37%, 7-OH-CBD: 4.62) y al combinarse con los otros fármacos la actividad antioxidante no incrementó significativamente respecto al grupo control de Trolox 50  $\mu$ M (Figura 19).

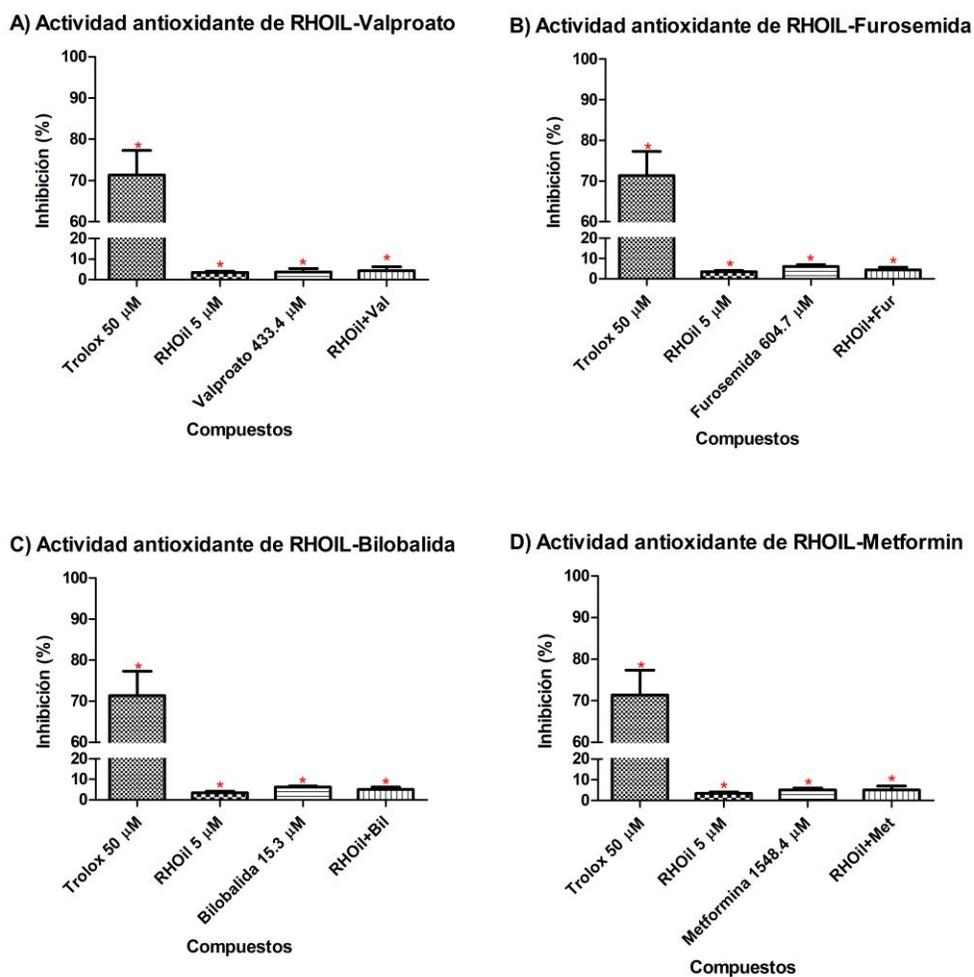
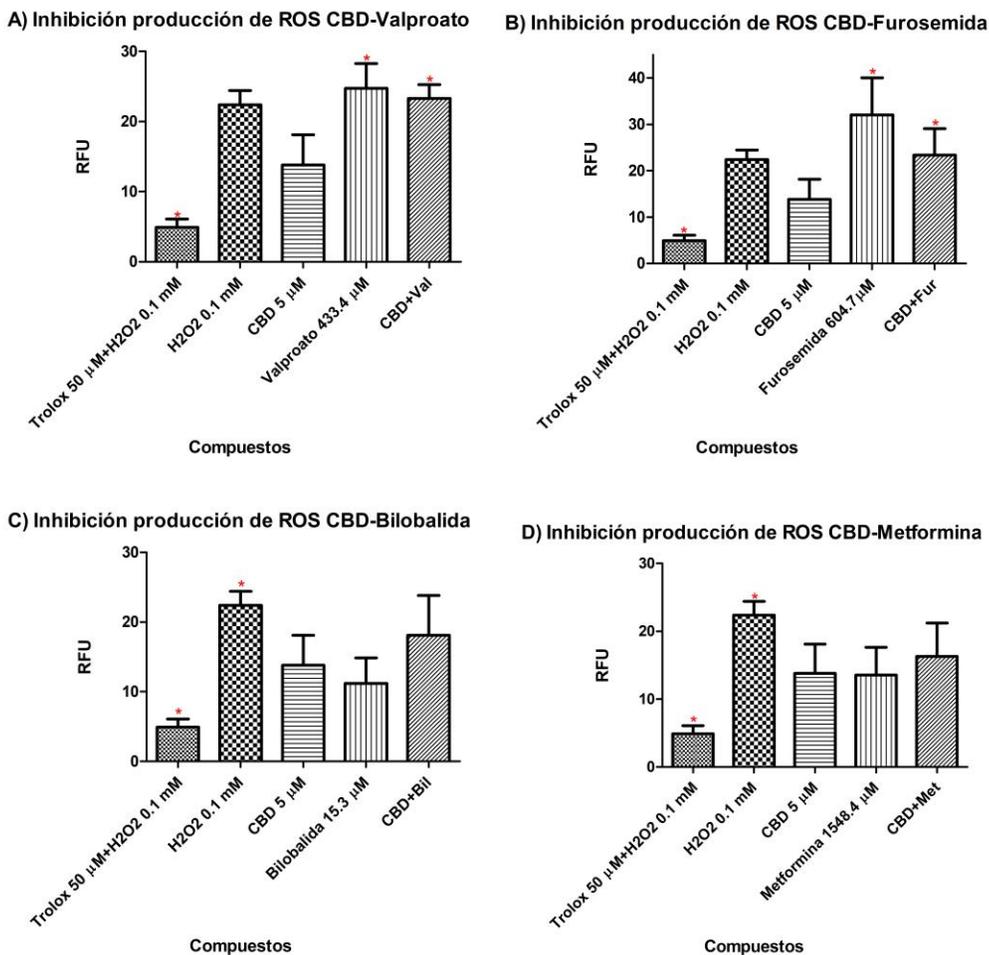


Figura 19. Capacidad antioxidante de RHOil, solo y combinado con fármacos

### 3.4 Actividad inhibidora de especies reactivas de oxígeno (ROS)

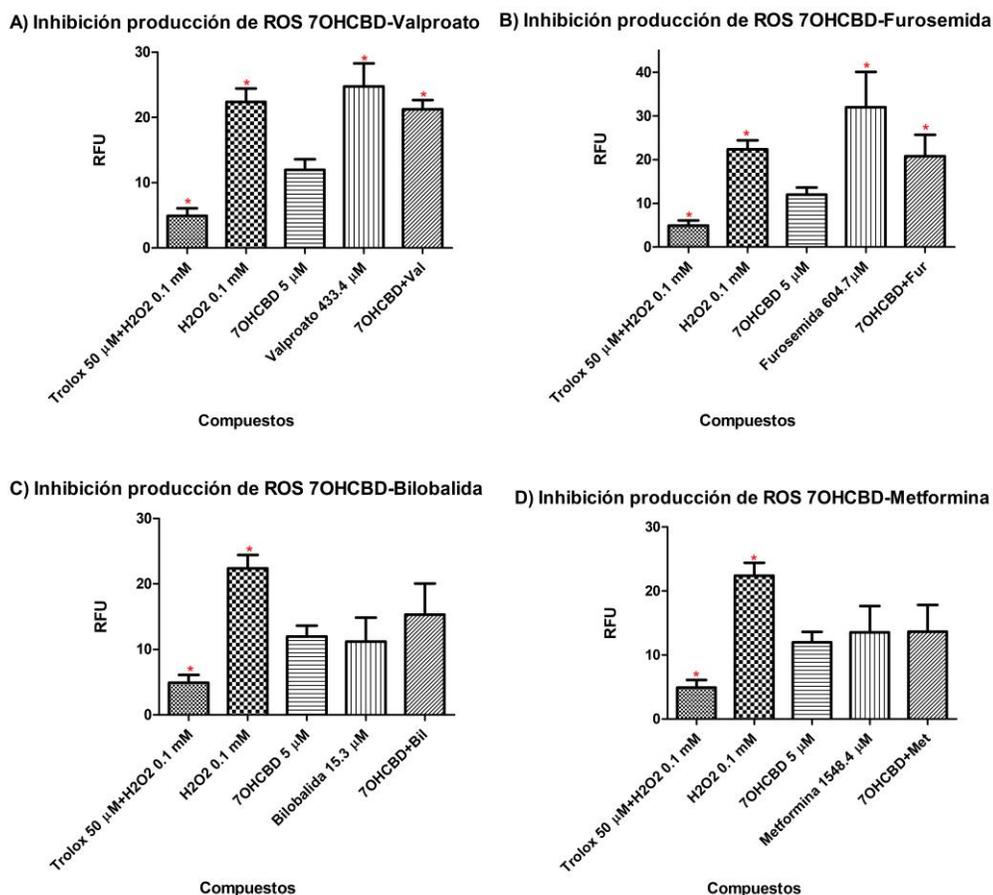
La inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó mediante el ensayo con DCFDA. Se inició con 2 horas de pretratamiento con los compuestos y las combinaciones, así mismo, se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM como inductor de ROS y control de 100% de producción. CBD disminuyó la producción de ROS 38.2%. La capacidad de CBD se afectó al mezclarse con las otras moléculas evaluadas. Valproato y furosemida no presentaron actividad inhibidora de ROS, ya que, sus valores fueron superiores a 100%. Por otro lado, bilobalida disminuyó 50% la producción de ROS mientras que metformina disminuyó 39.5%. El control positivo de inhibición empleado fue Trolox 50 µM logrando disminución de 78%, mediante ANOVA se obtuvo diferencia estadísticamente significativa respecto al control positivo y la combinación de CBD más valproato y furosemida; mientras que para el caso de CBD y bilobalida o metformina, la diferencia estadística fue entre el control positivo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM ( $p > 0.05$ ) (Figura 20).



**Figura 20. Actividad inhibidora de producción de ROS de CBD solo y en combinación con fármacos**

La disminución de ROS por parte de 7-OH-CBD fue de 46.5%, dicha actividad disminuyó por la combinación con las otras moléculas. Sin embargo, con valproato y furosemida se afectó la propiedad inhibitoria de 7-OH-CBD, ya que, fueron valores similares o superiores al control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM. Para el caso de bilobalida y metformina, la disminución de ROS fueron los mencionados previamente y no se vió mejorada al combinarse con 7-OH-CBD ya que, se obtuvieron valores similares a los obtenidos por los compuestos

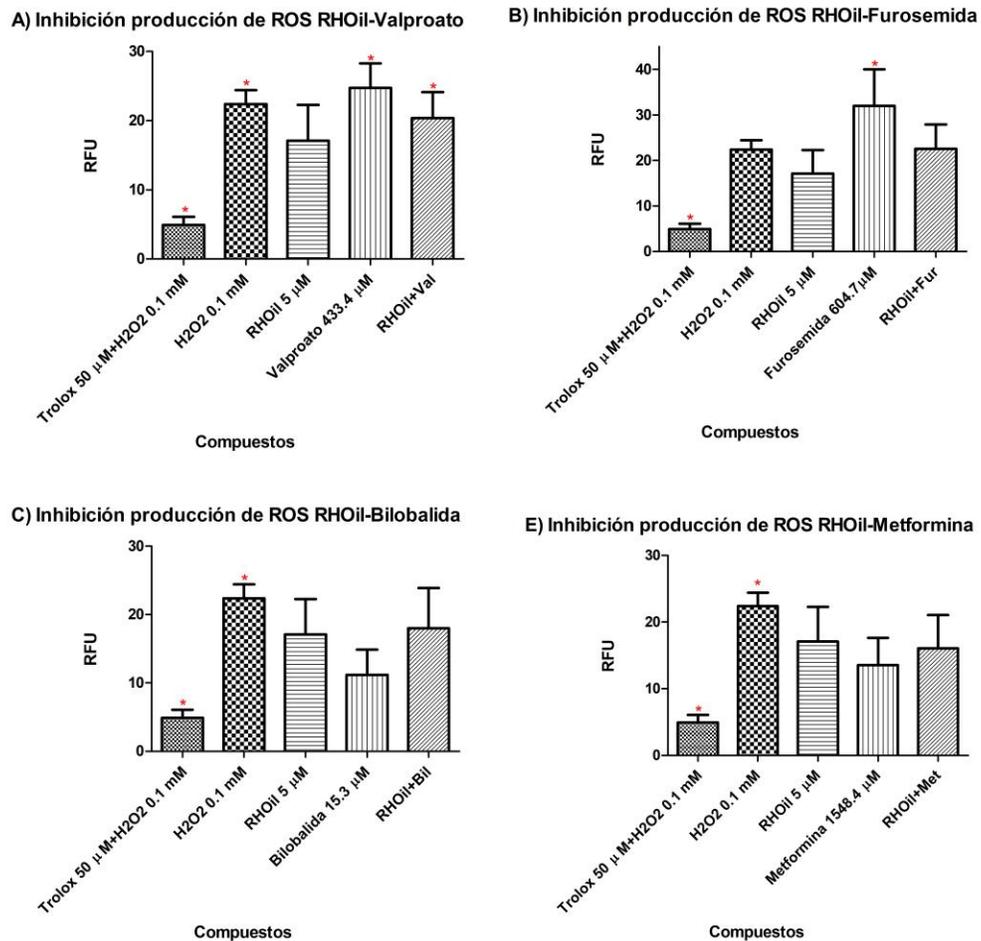
individuales. La prueba de ANOVA estableció diferencias significativas entre el control positivo de Trolox y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, valproato, furosemida y sus combinaciones, sin embargo, no se observó diferencia entre Trolox y 7-OH-CBD, bilobalida y metformina, así como con sus combinaciones ( $p > 0.05$ ) (Figura 21).



**Figura 21. Actividad inhibitoria de producción de ROS de 7-OH-CBD solo y en combinación con fármacos**

La inhibición de ROS por parte de RHOil fue menor que la de las otras formas de CBD pues no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM y el RHOil 5  $\mu$ M. En comparación con el control de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, valproato y furosemda generaron mayor cantidad de ROS, bilobalida y metformina disminuyeron la generación de ROS en mayor proporción que RHOil 5 µM. La diferencia estadísticamente significativa obtenida por ANOVA, se observó entre el control de Trolox vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, valproato, furosemda, así como la combinación de RHOil con valproato (p >0.05) (Figura 22).



**Figura 22. Actividad inhibidora de producción de ROS de RHOil solo y en combinación con fármacos**

### 3.5 Actividad de caspasa-3

De acuerdo con los resultados obtenidos de neuroprotección, se escogió al CBD para la evaluación de disminución de la actividad de caspasa-3 solo y en combinación con bilobalia y metformina siendo estos los compuestos que mejores resultados presentaron. Para dicha evaluación se realizó la evaluación de la actividad de caspasa-3, los resultados obtenidos muestran que CBD y su combinación con bilobalida, disminuyen los valores de fluorescencia en comparación con el control de glutamato 25 mM. Mientras que, para metformina, bilobalida y la combinación de CBD con metformina, no se observa disminución de la actividad de caspasa-3 y es similar a glutamato 25 mM. El ensayo de ANOVA, existe diferencia significativa entre el control de Trolox y metformina, bilobalida, CBD con metformina y glutamato 25 mM ( $p > 0.05$ ) (Figura 23).

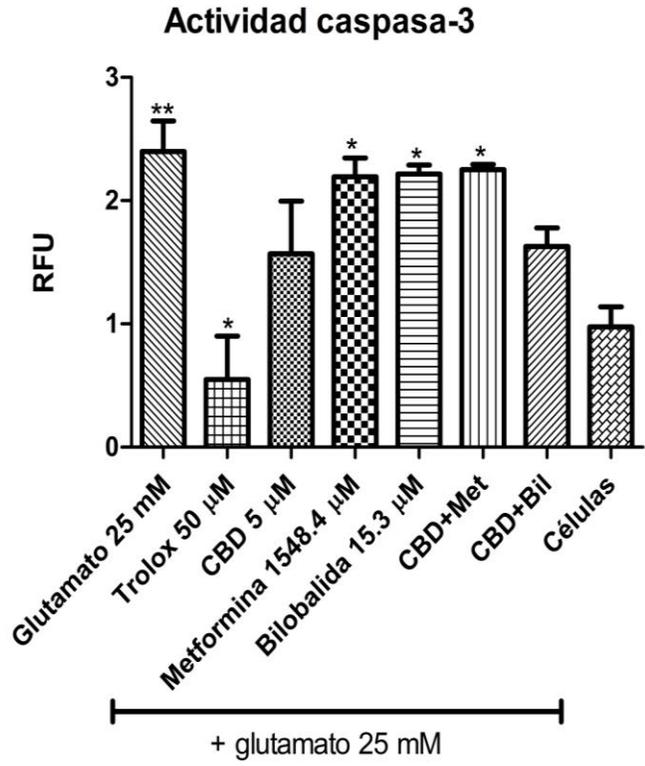


Figura 23. Evaluación de la actividad de caspasa-3

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Actividad neurotóxica

Se han realizado evaluaciones sobre la actividad neurotóxica de CBD en diferentes tipos celulares relacionados con enfermedades neurodegenerativas como es el caso de su actividad citotóxica observada en células progenitoras de oligodendrocitos (CPO), donde se menciona que la actividad citotóxica fue observada a concentraciones de 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, este efecto no se observó a concentraciones de 0.1 y 1  $\mu\text{M}$ , (Mecha *et al.* 2012). Se ha reportado actividad citotóxica en oligodendrocitos de nervio óptico por elevación de calcio intracelular a dosis de 100 nM a 10  $\mu\text{M}$  (Mato, *et al.* 2010). Por otro lado, en cultivo primario de neuronas hipocámpales determinaron el LC50 a 9.85  $\mu\text{M}$  (Kim *et al.* 2021). La actividad neurotóxica de CBD se ha reportado tener efecto negativo en la disminución de viabilidad celular de manera dosis dependiente a concentraciones de 0.1 a 40  $\mu\text{M}$ , siendo notable la disminución de la viabilidad

celular a concentraciones de 30 y 40  $\mu\text{M}$  en células PC12 diferenciadas y no diferenciadas observando disminución de la cantidad de microtúbulos y microfilamentos (Tahir *et al.* 1992). Considerando que a concentración de 5  $\mu\text{M}$  no hay disminución de la viabilidad celular, dicha concentración se empleó para realizar la evaluación de actividad neurotóxica en la línea celular PC12, existiendo concordancia con lo reportado previamente en donde la viabilidad celular disminuía a partir de 10  $\mu\text{M}$ . Se logra observar que los efectos citotóxicos varían dependiendo del tipo celular en el que se expongan, es decir, resulta ser citotóxico en células progenitoras de oligodendrocitos a concentraciones de 2.5 y 5  $\mu\text{M}$ , así como en oligodendrocitos de nervio óptico a dosis de 100 nM - 10  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en líneas neuronales como PC12, solo se observó disminución de la viabilidad celular a dosis de 30 y 40  $\mu\text{M}$ , (en un rango de concentraciones de 0.1 a 40  $\mu\text{M}$ ) mientras que, en cultivo primario de neuronas hipocampales, se determinó LC50 a 9.85  $\mu\text{M}$ . Los resultados reportados previamente son equiparables a los obtenidos en el presente trabajo en el que no se observó efecto neurotóxico por parte de CBD (5 $\mu\text{M}$ ) sobre la línea celular PC12. Así mismo, dicha concentración se empleó para la posterior evaluación del efecto neuroprotector en un modelo diferente a la exposición de a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , realizando en este trabajo la exposición a glutamato 25 mM (Kim *et al.* 2021)

Actualmente, no se ha evaluado la actividad neurotóxica del metabolito activo 7-OH-CBD en líneas celulares. Pero se le han atribuido actividades biológicas similares a su precursor (Raphael, *et al.* 2010). La actividad neurotóxica de valproato de sodio en la línea celular PC12 se evaluó a

concentraciones de 50 – 1500  $\mu\text{M}$  en donde resultó que a concentraciones de 50 – 400  $\mu\text{M}$  no había cambio en la viabilidad celular. Sin embargo a concentraciones superiores, disminuyó la viabilidad significativamente (Iranpak *et al.* 2019). Estos resultados concuerdan con lo realizado en el presente trabajo, pues se observa que no hay disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular (88.8%) a concentración de 433.4  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, se ha reportado que a concentraciones de 1 y 5 mM existe muerte celular de 35 – 50% a través de ruta atípica de necroptosis dependiente de calpaína (Bollino, Balan, and Aurelian 2015). Respecto a lo investigado de furosemida, se reporta que la línea celular PC12 tiene un Sistema de cotransporte de Na/K/2Cl sensible a bumetanida el cual puede ser inhibido por furosemida y se involucra con la neurodiferenciación neurotípica y el volumen celular (Leung *et al.* 1994). Sin embargo, no se ha reportado actividad citotóxica en dichas células, pero se hace mención que un metabolito, piridinio presenta toxicidad en la línea celular SH-SY5Y, desencadenando acumulación de  $\alpha$ -sinucleína, generación de especies reactivas de oxígeno y apoptosis (Laurencé *et al.* 2019). De igual manera, se realizó su evaluación en liberación de citoquinas de células mononucleares sanguíneas periféricas y se estableció que hubo disminución significativa de niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 a concentración de  $0.5 \times 10^{-2}$  y disminución de IL-8 a  $10^{-2}$  M. Sin embargo, a concentraciones altas ( $10^{-2}$ M) existió citotoxicidad significativa (Yuengsrigul, *et al.* 1999). En línea neuronal no se ha realizado evaluación neurotóxica y los resultados obtenidos en el presente trabajo se obtuvo viabilidad celular de 77.2%. Las evaluaciones realizadas a bilobalida (0.26  $\mu\text{g/mL}$ ) en la línea celular PC12 han puesto de

manifiesto su nula actividad neurotóxica ya que no afectan de manera negativa los valores de viabilidad celular y genera crecimiento de neuritas así como protección contra péptidos A $\beta$  (Usuki *et al.* 2020) y bloquear apoptosis por exposición a especies reactivas de oxígeno mediante la atenuación de c-Myc, p53, Bax y la activación de caspasa-3 (Zhou y Zhu 2000). Estos resultados son equiparables a los obtenidos para bilobalida (104.1%) en el presente trabajo en donde no hubo disminución de la viabilidad celular. Metformina en línea neuronal SH-SY5Y ha reportado que a concentraciones de 0.6, 1.2 o 2 mM no hay disminución de la viabilidad celular y no tiene efecto en la producción de ROS, cuyos resultados son similares a lo reportado en el presente trabajo con valores de viabilidad celular de 101% (Lamichhane *et al.* 2017). CBD es metabolizado por el sistema CYP450 (CYP2C19 forma el metabolito 7-OH-CBD y CYP3A4 forma 7-COOH-CBD), así mismo existen otras isoformas son capaces de metabolizar CBD como lo son CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 y CYP3A5 de las cuales, CYP2C19 y CYP3A4 son inhibidas (Gilmartin *et al.* 2021). En ensayos clínicos se ha reportado potencial hepatotoxicidad al administrar CBD y valproato juntos determinado por el incremento de enzimas aminotransferasas hepáticas (alanina aminotransferasa o aspartato aminotransferasa) así como alteraciones plaquetarias (Devinsky *et al.* 2016, 2017). Además, se ha reportado que el CBD no modifica el efecto terapéutico de valproato en monoterapia sin presentar efecto sinérgico aparente (Cabral-Pereira *et al.* 2021). No se ha evaluado la coadministración de CBD y furosemida, sin embargo, existe evidencia del efecto neuroprotector similar que presenta furosemida y CBD al administrarse en un modelo de consumo de

etanol en ratas pues disminuyó muerte celular aproximadamente 60% (Hamelink *et al.* 2005). Furosemida es principalmente metabolizada por glucuronidación a nivel renal y en menor medida en hígado sin tener interacción directa con el sistema CYP450 (Huang *et al.* 2016). Bilobalida es un constituyente de extracto de *G.biloba* y la evaluación farmacocinética aun es escasa, no se ha evaluado su administración conjunta con CBD. Sin embargo, se ha reportado que induce la actividad y expresión de CYP3A1 y 1A2 e incrementa actividad de CYP2E1 y expresión proteica de CYP2B1 y CYP2B2 de forma dosis-dependiente (Deng *et al.* 2008), por lo tanto es necesario realizar futuras evaluaciones para determinar si existe interacción entre CBD y bilobalida, ya que ambas moléculas interaccionan con la isoforma CYP1A2. No existen estudios sobre la administración conjunta de CBD y metformina y la mayoría de información reportada es de casos anecdóticos. Sin embargo, de igual manera que CBD, metformina disminuye la expresión de CYP3A4, por lo tanto es importante considerar los cambios en el metabolismo de CBD (Gong *et al.* 2012).

#### **4.2 Actividad neuroprotectora**

Por otro lado se han reportado diferentes mecanismos de neuroprotección del CBD en línea celular PC12, cuya respuesta ante pretratamiento con CBD y posterior exposición de A $\beta$  resulta en incremento de porcentaje de viabilidad celular, disminución de la acumulación de ROS,

disminución de peroxidación lipídica dependiente de concentración, disminución de caspasa-3 y de fragmentación de DNA así como atenuación del incremento de calcio intracelular (Iuvone *et al.* 2004), así como la inhibición de la óxido nítrico sintasa inducible y la producción de óxido nítrico (Esposito *et al.* 2006), los resultados son comparables a los obtenidos en cultivos de neuronas hipocampales con daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim *et al.* 2021). De igual manera, en modelo de enfermedad de Parkinson, por toxicidad inducida con MPP<sup>+</sup> en el cual, CBD incrementó el valor de viabilidad celular significativamente a concentraciones de 1, 5 y 10 μM, así mismo, disminuyó la actividad de caspasa-3, indujo diferenciación neuronal y protegió contra inhibición por MPP<sup>+</sup> y favoreció la expresión de proteínas neuronales (sinaptofisina, GAP-43 y sinapsina I) (Santos *et al.* 2015). Los resultados obtenidos son equiparables a los reportes expuestos previamente. CBD 5 μM incrementó viabilidad celular de 47% a 69.6% respecto glutamato 25 mM. La evaluación del efecto neuroprotector de valproato se ha realizado en la línea celular PC12 mediante la inducción de daño por exposición conjunta a maltolato de aluminio, cuyos resultados fueron disminución de la muerte celular y de apoptosis. Además, disminución significativa de ROS, actividad de catalasa y reducción de potencial de membrana mitocondrial (Iranpak *et al.* 2019). Cabe mencionar, la actividad inhibidora de histona deacetilasa (HDAC) afecta directamente la regulación positiva de Bcl-2 (Nagańska *et al.* 2015). Respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se observó neuroprotección por parte de valproato en la línea celular PC12 expuesta a glutamato 25 mM. Así mismo, se observó incremento de la producción de ROS y de caspasa-3. Un mecanismo diferente

para atenuar los procesos neurodegenerativos es el enfoque en neuroinflamación, y desde esa perspectiva, furosemida inhibe la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y óxido nítrico y disminuye la expresión de COX-2, iNOS, así como promover la actividad fagocítica y potencia la expresión IL-1R y arginasa. De tal manera que disminuye el fenotipo de microglía proinflamatoria M1 y favorece el fenotipo antiinflamatorio M2 en la línea celular microglial SIM-A9 (Z. Wang *et al.* 2020). Así mismo, la actividad neuroprotectora de furosemida tiene relación con la disminución de edema cerebral en eventos isquémicos (Oria de Suárez y Eblen Zajjur 2001). En el presente trabajo, furosemida no presentó actividad neuroprotectora en la línea celular PC12 expuesta a glutamato. Así mismo, existió una sobre producción de ROS e incremento de la actividad de caspasa-3

Bilobalida ha reportado tener efectos neuroprotectores en modelos animales de edemas cerebrales al disminuir el contenido de agua y de la formación del edema en rebanadas de hipocampo de rata sometidas a privación de oxígeno y glucosa así como en tejido de cerebro de ratón con oclusión de arteria cerebral media mediante protección de la energía mitocondrial y actividad Na-K-ATPasa, así como interferencia con el flujo de cloruros a través de canales operados por ligando, mejora actividad de complejo mitocondrial I y disminución de niveles de glutamato extracelular (Mdzinarishvili *et al.* 2007; Schwarzkopf *et al.* 2013). Además, ha mostrado actividad neuroprotectora al inhibir mediadores proinflamatorios (óxido nítrico, TNF- $\alpha$ , IL-1b) y disminuir la activación de JNK1/2 y p38 MAPK e incrementar la actividad de SOD (Jiang *et al.* 2014). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están en concordancia con lo expuesto en los reportes previos, de igual manera existió actividad

neuroprotectora de bilobalida en la línea celular PC12 expuesta a glutamato 25 mM en las dos concentraciones evaluadas, existiendo mayor viabilidad a la concentración de 15.3  $\mu$ M siendo el efecto dosis-dependiente. En modelo de neurotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M en células PC12 y cultivo primario de neuronas hipocampales, metformina incrementó viabilidad celular a concentración de 2 mM disminuyendo apoptosis y necrosis, disminuyó producción de intracelular ROS, impidió disminución de potencial de membrana mitocondrial, se observó que la protección fue por la activación de AMPK, (Zhao *et al.* 2019). Además, la actividad protectora de metformina se ve relacionada con actividad elevada de PI3K/Akt/mTOR/S6K, así como niveles restaurados de GSH y catalasa, (Khallaghi *et al.* 2016). Los resultados de actividad neuroprotectora de metformina no fueron significativos a las concentraciones evaluadas, sin embargo; fueron similares a las obtenidas por CBD 5  $\mu$ M.

### **4.3 Capacidad antioxidante**

CBD tiene actividad antioxidante debido al hecho de que su radical libre catiónico tiene varias estructuras de resonancia en las cuales los electrones desapareados son principalmente distribuidos en el grupo éter y en los grupos alquilo, así como en el anillo bencénico, (Borges *et al.* 2013). La actividad antioxidante de CBD fue significativamente menor respecto al control de Trolox, así como los otros compuestos solos y en combinación, siendo el CBD solo el

que obtuvo mayor capacidad antioxidante (9.37 vs 71.35 %). La metodología reportada para la evaluación de la actividad antioxidante es diferente a la empleada en el presente trabajo por la estructura y complejidad del ensayo y no fue posible obtener el IC<sub>50</sub> de cada compuesto para compararlo con lo reportado en la bibliografía. Sin embargo, existe información referente a la baja interacción de CBD y el radical DPPH ya que, la transferencia de electrones requiere una orientación mutua apropiada de la molécula antioxidante y el radical pues el acceso al centro activo del radical DPPH es más complicado en comparación con otro radical libre como ABTS (Dawidowicz, Olszowy-Tomczyk, y Typek 2021). El poder antioxidante de CBD se ha evaluado y se ha establecido un EC<sub>50</sub> de 89.2 µM, el cual resulta ser mayor de la concentración evaluada en este trabajo (5 µM) sin embargo, se observa dicha actividad antioxidante (Hayakawa *et al.* 2007).

Respecto a la actividad antioxidante de valproato, se ha reportado inhibición de radical DPPH (%) de 37% a 50 µg/mL, en este mismo trabajo, el ensayo realizado se evaluaron concentraciones de 5 a 200 µg/mL y en combinación de valproato con resveratrol o silimarina, su actividad antioxidante incrementó a 88 y 81%, respetivamente, es importante mencionar que ambas moléculas (resveratrol y silimarina), han demostrado tener capacidad antioxidante por sí mismas y el valproato no incrementó el porcentaje de inhibición, (Palol, Saravana, y Subramanyam 2021). En el presente trabajo, el valor de inhibición de valproato fue de 3.87% a 62.5 µg/mL (433.4 µM) y dicha actividad no incrementó significativamente al combinarse con otras moléculas, como CBD o 7-OH-CBD.

La actividad antioxidante de furosemida se ha evaluado en diferentes tiempos de exposición a DPPH (5, 10, 20, 30 y 60 min) se obtuvieron valores de capacidad antioxidante total (AAEAC) de 0.94, 0.00, 0.44, 0.88 y 1.00  $\mu\text{M}$  AA a concentración de  $4 \times 10^{-4}$  M observando de esta manera que no presenta actividad antioxidante relevante al someterse a DPPH y al combinarse con otro fármaco, como losartan, su actividad incrementó a 4.98 y 4.89  $\mu\text{M}$  AA a 30 y 60 min, respectivamente. Sin embargo dicho incremento no fue estadísticamente significativo (Rogóž *et al.* 2022) .

La actividad antioxidante de bilobalida no se ha reportado de manera aislada, sino como parte de diferentes tipos de extractos de hojas de *G. biloba* que van desde  $\text{IC}_{50}$  de 0.103 mg/mL a 746  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Petrov *et al.* 2022; X. Wang *et al.* 2020) y del extracto estandarizado EGb761 con  $\text{IC}_{50}$  de  $47.82 \pm 1.05$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Zhang *et al.* 2022). En el presente trabajo, se obtuvo un valor de captación de radical DPPH de 6.22% a concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cabe destacar que de los extractos evaluados en la literatura, la actividad antioxidante se le atribuye principalmente a flavonoides como quercetina y kaempferol (Sadowska-Krępa *et al.* 2017) y que en el caso de los terpenos, se ha reportado que su efecto terapéutico debido a su protección de daño por estrés oxidativo y a su actividad antioxidante directa (Liu *et al.* 2019).

La actividad captadora de radical DPPH de metformina se ha reportado ser dosis dependiente en un rango de 25 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el  $\text{IC}_{50}$  fue de  $56.90 \pm 0.83$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (Nasrin 2014) mientras que en el presente trabajo la inhibición de DPPH fue de 5.14% a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por otro lado, se ha reportado disminución de radical DPPH de 31% a concentración de 20 mM, haciendo mención que la

actividad captadora de radicales por parte de metformina es débil, similar a lo observado en este ensayo (Clark *et al.* 2015).

#### **4.4 Actividad inhibidora de producción de especies reactivas de oxígeno**

CBD disminuye condiciones oxidativas por prevención de formación de radicales superóxido, principalmente generados por xantina oxidasa y NADPH oxidasa, así mismo disminuye niveles de óxido nítrico, ROS por quelación de metales de transición, (Atalay, Jarocka-karpowicz, y Skrzydlewskas 2020). En el ensayo realizado se obtuvo disminución de 38.2% por parte del CBD 5  $\mu\text{M}$  respecto al control de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 mM, en lo reportado en la literatura para el CBD en línea celular SH-SY5Y el  $\text{IC}_{50}$  es de 42.7  $\mu\text{g/mL}$ , es decir, se requiere concentración más alta de CBD para disminuir al 50% la concentración de ROS que la empleada en el presente trabajo (Raja *et al.* 2020).

Valproato (50, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$ ) ha demostrado tener efectos benéficos en disminución de ROS inducido por aluminio (Almal 1000  $\mu\text{M}$ ) pues disminuyó significativamente la generación de ROS respecto a células sin tratamiento. Sin embargo no existió diferencia significativa entre las diferentes concentraciones empleadas (Iranpak *et al.* 2019). Por otro lado, valproato (325  $\mu\text{M}$ ) ha disminuido significativamente la producción de ROS en línea celular de astrocitoma 1321N1 por daño inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  120  $\mu\text{M}$  (Rodrigues y Chichger

2019). A diferencia de lo reportado, en el presente trabajo no se observó disminución de ROS generadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 mM, sino, se obtuvo 10.5% más que lo obtenido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y dicho valor no se mejoró al combinarse con CBD.

Furosemida incrementó 43% la producción de ROS respecto al control de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 mM, en estudios previos se ha mencionado que induce estrés oxidativo compartimentado en mitocondrias hepáticas (N. Agbedanu *et al.* 2022). Lo cual establecería un comportamiento similar en la línea celular PC12 y cuyo mecanismo neuroprotector sería diferente.

Bilobalida (100  $\mu\text{M}$ ) inhibe muerte celular y producción de ROS por privación de glucosa y oxígeno en cultivo primario de astrocitos mediante regulación positiva de manganeso superóxido dismutasa (Xiang *et al.* 2019). Además, ante la generación de ROS por xantina/ xantina oxidasa (100  $\mu\text{M}$  /150 mU/mL) bilobalida (25 -100  $\mu\text{M}$ ) disminuyó apoptosis, expresión de Bax y activación de caspasa-3 en línea celular PC12 (Zhou y Zhu 2000). Dicho efecto comparable con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde bilobalida disminuyó la fluorescencia 50% respecto al control de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 mM. Sin embargo, la combinación con CBD no potenció este efecto.

La actividad inhibitoria de generación de ROS de metformina (2 mM) se ha evaluado en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  mediante el empleo del kit CellROXs Deep Red en la línea celular PC12 en la que existió disminución significativa de la producción intracelular de ROS por activación de AMPK (Zhao *et al.* 2019). En el presente trabajo, metformina disminuyó 39.5% la producción de ROS respecto el control de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dicho valor es semejante al obtenido por CBD, sin

embargo, no se observa mejoría en la actividad inhibitoria de ROS al combinarlos.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- El CBD, 7-OH-CBD, RHOil, valproato, furosemida, bilobalida y metformina no presentan efecto neurotóxico.
- El CBD, 7-OH-CBD y RHOil presentan actividad neuroprotectora en células PC12 expuestas a glutamato 25 mM.
- La actividad neuroprotectora de CBD y 7-OH-CBD y RHOil no mejora al combinarse con furosemida, valproato y metformina.
- Bilobalida mostró actividad neuroprotectora. Sin embargo, no incrementa cuando se combina con CBD.
- CBD, bilobalida y metformina disminuyen la producción de ROS, pero solo el CBD disminuye la actividad de la caspasa-3.
- Ninguna combinación mostró efectos sinérgicos.

## PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de Western-blot o qPCR para evaluar niveles de expresión de sistemas antioxidantes (SOD, catalasa y GSH)
- Realizar los ensayos de las combinaciones en modelos *in vivo*.

## CAPÍTULO 6

### 6.1 REFERENCIA

- Abdel-Waha, B. A., and M. E. Metwally. 2011. "Ginkgo Biloba Enhances the Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Sodium Valproate Against Kainic Acid-Induced Seizures in Mice." *Journal of Pharmacology and Toxicology* 6(8):679–90.
- Adam, Octavian R., and Joseph Jankovic. 2008. "Symptomatic Treatment of Huntington Disease." *Neurotherapeutics* 5(2):181–97.
- Alvarez, Francisco J., Hector Lafuente, M. Carmen Rey-Santano, Victoria E. Mielgo, Elena Gastiasoro, Miguel Rueda, Roger G. Pertwee, Ana I. Castillo, Julián Romero, and José Martínez-Orgado. 2008. "Neuroprotective Effects of the Nonpsychoactive Cannabinoid Cannabidiol in Hypoxic-Ischemic Newborn Piglets." *Pediatric Research* 64(6):653–58.
- Anon. n.d. "Vero ATCC ® CCL-81™ Cercopithecus Aethiops Kidney Normal." Retrieved April 11, 2018 (<https://www.atcc.org/Products/All/CCL-81.aspx#culturemethod>).
- Armada-Moreira, Adam, Joana I. Gomes, Carolina Campos Pina, Oksana K. Savchak, Joana Gonçalves-Ribeiro, Nádia Rei, Sara Pinto, Tatiana P. Morais, Robertta Silva Martins, Filipa F. Ribeiro, Ana M. Sebastião, Vincenzo Crunelli, and Sandra H. Vaz. 2020. "Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14(April):1–27.
- Armstrong, Melissa J., and Michael S. Okun. 2020. "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 323(6):548–60.

- Arun, Tarunya, Valentina Tomassini, Emilia Sbardella, Michiel B. de Ruiter, Lucy Matthews, Maria Isabel Leite, Rose Gelineau-Morel, Ana Cavey, Sandra Vergo, Matt Craner, Lars Fugger, Alex Rovira, Mark Jenkinson, and Jacqueline Palace. 2013. "Targeting ASIC1 in Primary Progressive Multiple Sclerosis: Evidence of Neuroprotection with Amiloride." *Brain* 136(1):106–15.
- Atalay, Sinemyiz, Iwona Jarocka-karpowicz, and Elzbieta Skrzydlewska. 2020. "Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol." *Antioxidants* 9(1):1–20.
- Baker, Chelsea, Cimmaron Retzik-Stahr, Vatsala Singh, Renee Plomondon, Victoria Anderson, and Neda Rasouli. 2021. "Should Metformin Remain the First-Line Therapy for Treatment of Type 2 Diabetes?" *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 12.
- Balestrino, R., and A. H. V. Schapira. 2020. "Parkinson Disease." *European Journal of Neurology* 27(1):27–42.
- Beleza-Meireles, Ana, and Ammar Al-Chalabi. 2009. "Genetic Studies of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Controversies and Perspectives." *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10(1):1–14.
- Van Bergeijk, Jeroen, Kirsten Haastert, Claudia Grothe, and Peter Claus. 2006. "Valproic Acid Promotes Neurite Outgrowth in PC12 Cells Independent from Regulation of the Survival of Motoneuron Protein." *Chemical Biology and Drug Design* 67(3):244–47.
- Biermann, Julia, Philippe Grieshaber, Ulrich Goebel, Gottfried Martin, Solon Thanos, Simone Di Giovanni, and Wolf Alexander Lagrèze. 2010. "Valproic Acid-Mediated Neuroprotection and Regeneration in Injured Retinal Ganglion Cells." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(1):526–34.
- Bisogno, Tiziana, Lumír Hanuš, Luciano De Petrocellis, Susanna Tchilibon, Datta E. Ponde, Ines Brandi, Aniello Schiano Moriello, John B. Davis, Raphael Mechoulam, and Vincenzo Di Marzo. 2001. "Molecular Targets for Cannabidiol and Its Synthetic Analogues: Effect on Vanilloid VR1 Receptors and on the Cellular Uptake and Enzymatic Hydrolysis of Anandamide." *British Journal of Pharmacology* 134(4):845–52.
- Bollino, Dominique, Irina Balan, and Laure Aurelian. 2015. "Valproic Acid Induces Neuronal Cell Death through a Novel Calpain-Dependent Necroptosis Pathway." *Journal of Neurochemistry* 133(2):174–86.
- Bonaventura, Aldo, Luca Liberale, Alessandra Vecchié, Matteo Casula, Federico Carbone, Franco Dallegri, and Fabrizio Montecucco. 2016. "Update on Inflammatory Biomarkers and Treatments in Ischemic Stroke." *International Journal of Molecular Sciences* 17(12):1–53.
- Borges, Rosivaldo S., João Batista, Rommel B. Viana, Ana C. Baetas, Ednilsom

- Orestes, Marcieni A. Andrade, Káthia M. Honório, and Albérico B. F. Da Silva. 2013. "Understanding the Molecular Aspects of Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol as Antioxidants." *Molecules* 18(10):12663–74.
- Bouriche, Sihem, Angela Alonso-García, Carlos M. Cárceles-Rodríguez, Farouk Rezgui, and Emilio Fernández-Varón. 2021. "An in Vivo Pharmacokinetic Study of Metformin Microparticles as an Oral Sustained Release Formulation in Rabbits." *BMC Veterinary Research* 17(1):1–11.
- Brawek, Bianca, and Olga Garaschuk. 2014. "Network-Wide Dysregulation of Calcium Homeostasis in Alzheimer's Disease." *Cell and Tissue Research* 357(2):427–38.
- Brito-Moreira, J., A. C. Paula-Lima, T. R. Bomfim, F. F. Oliveira, F. J. Sepulveda, F. G. De Mello, L. G. Aguayo, R. Panizzutti, and S. T. Ferreira. 2011. "Aβ Oligomers Induce Glutamate Release from Hippocampal Neurons." *Current Alzheimer Research* 8(5):552–62.
- Brunkan, A. L., and A. M. Goate. 2005. "Presenilin Function and γ-Secretase Activity." *Journal of Neurochemistry* 93(4):769–92.
- Brunn, Judith, Viktor Wiroth, Michael Kowalski, Uwe Runge, and Michael Sabolek. 2014. "Valproic Acid in Normal Therapeutic Concentration Has No Neuroprotective or Differentiation Influencing Effects on Long Term Expanded Murine Neural Stem Cells." *Epilepsy Research* 108(4):623–33.
- Cabral-Pereira, Giselda, David Sánchez-Benito, Sandra M. Díaz-Rodríguez, Jaime Gonçalves, Consuelo Sancho, Orlando Castellano, Luis J. Muñoz, Dolores E. López, and Ricardo Gómez-Nieto. 2021. "Behavioral and Molecular Effects Induced by Cannabidiol and Valproate Administration in the GASH/Sal Model of Acute Audiogenic Seizures." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 14(January):1–22.
- Cadet, Jean, and Kelvin J. A. Davies. 2017. "Oxidative DNA Damage & Repair: An Introduction." *Free Radical Biology and Medicine* 107:2–12.
- Camposa AC, Fogac MV, Sonogoa AB, Guimarães FS. 2016. "Cannabidiol, Neuroprotection and Neuropsychiatric Disorders." *Pharmacological Research*.
- Caron, Nicholas S., Galen E. B. Wright, Michael R. Hayden, and C. Frpc. 2019. "Huntington Disease Summary Suggestive Findings." 1–34.
- Carter, Gregory T., and Nanette C. Joyce. 2018. *Motor Neuron Disease*. Fourth Edi. Elsevier Inc.
- Carvalho, Cristina, and Paula I. Moreira. 2018. "Oxidative Stress: A Major Player in Cerebrovascular Alterations Associated to Neurodegenerative Events." *Frontiers in Physiology* 9(JUL):1–14.
- Castillo, A., M. R. Tolón, J. Fernández-Ruiz, J. Romero, and J. Martínez-Orgado. 2010. "The Neuroprotective Effect of Cannabidiol in an in Vitro

- Model of Newborn Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Mice Is Mediated by CB2 and Adenosine Receptors." *Neurobiology of Disease* 37(2):434–40.
- Chandrasekaran, K., Z. Mehrabian, B. Spinnewyn, C. Chinopoulos, K. Drieu, and G. Fiskum. 2003. "Neuroprotective Effects of Bilobalide , a Component of Ginkgo Biloba Extract ( EGb 761 ) in Global Brain Ischemia and in Excitotoxicity-Induced Neuronal Death."
- Chapman, A., P. E. Keane, B. S. Meldrum, J. Simiand, and J. C. Vernieres. 1982. "Mechanism of Anticonvulsant Action of Valproate." *Progress in Neurobiology* 19(4):315–59.
- Chayasirisobhon, Sirichai. 2020. "Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis." *The Permanente Journal* 25:1–3.
- Chen, Ahong, Hongyun Wang, Yuqin Zhang, and Xiaoying Wang. 2017. "Paeoniflorin Exerts Neuroprotective Effects against Glutamate - Induced PC12 Cellular Cytotoxicity by Inhibiting Apoptosis." 825–33.
- Clark, George, Sanket Patel, Mitul Parikh, and Cesar Lau-Cam. 2015. *Assessment of the Antioxidant Actions of Metformin in Vitro and in the Brain of Diabetic Rats.*
- Clark, Ian A., and Bryce Vissel. 2016. "Excess Cerebral TNF Causing Glutamate Excitotoxicity Rationalizes Treatment of Neurodegenerative Diseases and Neurogenic Pain by Anti-TNF Agents." *Journal of Neuroinflammation* 13(1):236.
- Connolly, Barbara S., and Anthony E. Lang. 2014. "Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review." *Jama* 311(16):1670–83.
- Dash, Pramod K., Sara A. Orsi, Min Zhang, Raymond J. Grill, Shibani Pati, Jing Zhao, and Anthony N. Moore. 2010. "Valproate Administered after Traumatic Brain Injury Provides Neuroprotection and Improves Cognitive Function in Rats." *PLoS ONE* 5(6).
- Dawidowicz, Andrzej L., Małgorzata Olszowy-Tomczyk, and Rafał Typek. 2021. "CBG, CBD,  $\Delta$ 9-THC, CBN, CBGA, CBDA and  $\Delta$ 9-THCA as Antioxidant Agents and Their Intervention Abilities in Antioxidant Action." *Fitoterapia* 152.
- Dayalu, Praveen, and Roger L. Albin. 2015. "Huntington Disease: Pathogenesis and Treatment." *Neurologic Clinics* 33(1):101–14.
- Deng, Y., H. C. Bi, L. Z. Zhao, F. He, Y. Q. Liu, J. J. Yu, Z. M. Ou, L. Ding, X. Chen, Z. Y. Huang, M. Huang, and S. F. Zhou. 2008. "Induction of Cytochrome P450s by Terpene Trilactones and Flavonoids of the Ginkgo Biloba Extract EGb 761 in Rats." *Xenobiotica* 38(5):465–81.
- Denizot, François, and Rita Lang. 1986. "Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival." *Journal of Immunological Methods* 89(2):271–77.

- Detaille, Dominique, Bruno Guigas, Stephane Attia, and Eric Fontaine. 2008. "Neuroprotective Role of Antidiabetic Drug Metformin Against Apoptotic Cell Death in Primary Cortical Neurons." 77–87.
- Devinsky, Orrin, J. Helen Cross, Linda Laux, Eric Marsh, Ian Miller, Rima Nabbut, Ingrid E. Scheffer, Elizabeth A. Thiele, and Stephen Wright. 2017. "Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome." *New England Journal of Medicine* 376(21):2011–20.
- Devinsky, Orrin, Eric Marsh, Daniel Friedman, Elizabeth Thiele, Linda Laux, Joseph Sullivan, Ian Miller, Robert Flamini, Angus Wilfong, Francis Filloux, Matthew Wong, Nicole Tilton, Patricia Bruno, Judith Bluvstein, Julie Hedlund, Rebecca Kamens, Jane Maclean, Srishti Nangia, Nilika Shah Singhal, Carey A. Wilson, Anup Patel, and Maria Roberta Cilio. 2016. "Cannabidiol in Patients with Treatment-Resistant Epilepsy: An Open-Label Interventional Trial." *The Lancet Neurology* 15(3):270–78.
- Dorado Martínez, Claudia, Concepción Rugerio Vargas, and Selva Rivas Arancibia. 2003. "Estrés Oxidativo y Neurodegeneración." *Edigraphic.Com MG Rev Fac Med UNAM* 46(6).
- Esposito, Giuseppe, Daniele De Filippis, Maria Chiara Maiuri, Daniela De Stefano, Rosa Carnuccio, and Teresa Iuvone. 2006. "Cannabidiol Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase Protein Expression and Nitric Oxide Production in  $\beta$ -Amyloid Stimulated PC12 Neurons through P38 MAP Kinase and NF-KB Involvement." *Neuroscience Letters* 399(1–2):91–95.
- Fallas, Melissa. 2010. "Esclerosis Lateral Amiotrofica." *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica* 67(591):89–92.
- Farooqui, Akhlaq A. 2022. "Chapter 6 - Contribution of Neuroinflammation, Resolution, and Neuroprotection in Neuropsychiatric Diseases." Pp. 161–86 in *Neuroinflammation, Resolution, and Neuroprotection in the Brain*, edited by A. A. Farooqui. Academic Press.
- Feng, Zili, Qian Sun, Wang Chen, Yu Bai, Daihua Hu, and Xin Xie. 2019. "The Neuroprotective Mechanisms of Ginkgolides and Bilobalide in Cerebral Ischemic Injury: A Literature Review." *Molecular Medicine* 25(1):1–8.
- Ferreira, I. L., L. M. Bajouco, S. I. Mota, Y. P. Auberson, C. R. Oliveira, and A. C. Rego. 2012. "Amyloid Beta Peptide 1-42 Disturbs Intracellular Calcium Homeostasis through Activation of GluN2B-Containing N-Methyl-d-Aspartate Receptors in Cortical Cultures." *Cell Calcium* 51(2):95–106.
- Fisher, Robert S., J. Helen Cross, Jacqueline A. French, Norimichi Higurashi, Edouard Hirsch, Floor E. Jansen, Lieven Lagae, Solomon L. Moshé, Jukka Peltola, Eliane Roulet Perez, Ingrid E. Scheffer, and Sameer M. Zuberi. 2017. "Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology." *Epilepsia* 58(4):522–30.

- Gabryel, Bożena, and Sebastian Liber. 2018. "Metformin Limits Apoptosis in Primary Rat Cortical Astrocytes Subjected to Oxygen and Glucose Deprivation." 328–36.
- Genovese, Tiziana, Emanuela Mazzon, Irene Paterniti, Emanuela Esposito, Placido Bramanti, and Salvatore Cuzzocrea. 2011. "Modulation of NADPH Oxidase Activation in Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats." *Brain Research* 1372:92–102.
- Gilmartin, Christopher G. S., Zoya Dowd, Alasdair P. J. Parker, and Pooja Harijan. 2021. "Interaction of Cannabidiol with Other Antiseizure Medications: A Narrative Review." *Seizure* 86(June 2020):189–96.
- Gong, Li, Sriji Goswami, Kathleen M. Giacomini, Russ B. Altman, and Teri E. Klein. 2012. "Metformin Pathways." *Pharmacogenetics and Genomics* 22(11):820–27.
- Grochowski, Cezary, Jakub Litak, Piotr Kamieniak, and Ryszard Maciejewski. 2018. "Oxidative Stress in Cerebral Small Vessel Disease. Role of Reactive Species." *Free Radical Research* 52(1):1–13.
- Haglund, Michael M., Daryl W. Hochman, M. Michael, and Daryl W. Hochman Furosemide. 2022. "Furosemide and Mannitol Suppression of Epileptic Activity in the Human Brain." 907–18.
- Hamelink, Carol, Aidan Hampson, David A. Wink, Lee E. Eiden, and Robert L. Eskay. 2005a. "Comparison of Cannabidiol, Antioxidants, and Diuretics in Reversing Binge Ethanol-Induced Neurotoxicity." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314(2):780–88.
- Hamelink, Carol, Aidan Hampson, David A. Wink, Lee E. Eiden, and Robert L. Eskay. 2005b. "Comparison of Cannabidiol, Antioxidants, and Diuretics in Reversing Binge Ethanol-Induced Neurotoxicity." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314(2):780–88.
- Hampson, A. J., M. Grimaldi, M. Lolic, D. Wink, R. Rosenthal, and J. Axelrod. 2000. "Neuroprotective Antioxidants from Marijuana." *Annals of the New York Academy of Sciences* 899(July):274–82.
- Hardy, John, and David Allsop. 1991. "Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 12(C):383–88.
- Hayakawa, Kazuhide, Kenichi Mishima, Masanori Nozako, Ayumi Ogata, Mai Hazekawa, An Xin Liu, Masayuki Fujioka, Kohji Abe, Nobuyoshi Hasebe, Nobuaki Egashira, Katsunori Iwasaki, and Michihiro Fujiwara. 2007. "Repeated Treatment with Cannabidiol but Not  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol Has a Neuroprotective Effect without the Development of Tolerance." *Neuropharmacology* 52(4):1079–87.
- Heath, Paul R., and Pamela J. Shaw. 2002. "Update on the Glutamatergic

- Neurotransmitter System and the Role of Excitotoxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Muscle and Nerve* 26(4):438–58.
- Hensley, Kenneth, Molina Mhatre, Shenyun Mou, Quentin N. Pye, Charles Stewart, Melinda West, and Kelly S. Williamson. 2006. "On the Relation of Oxidative Stress to Neuroinflammation: Lessons Learned from the G93A-SOD1 Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Antioxidants and Redox Signaling* 8(11–12):2075–87.
- Howland, John G., Pornnarin Taepavarapruk, and Anthony G. Phillips. 2002. "Glutamate Receptor-Dependent Modulation of Dopamine Efflux in the Nucleus Accumbens by Basolateral, but Not Central, Nucleus of the Amygdala in Rats." *Journal of Neuroscience* 22(3):1137–45.
- Huang, Xiaohua, Evert Dorhout Mees, Pieter Vos, Shereen Hamza, and Branko Braam. 2016. "Everything We Always Wanted to Know about Furosemide but Were Afraid to Ask." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 310(10):F958–71.
- Hubbard, Jacqueline A., Jenny I. Szu, Jennifer M. Yonan, and Devin K. Binder. 2016. "Regulation of Astrocyte Glutamate Transporter-1 (GLT1) and Aquaporin-4 (AQP4) Expression in a Model of Epilepsy." *Experimental Neurology* 283:85–96.
- Iranpak, Forough, Jamileh Saberzadeh, Mahmood Vessal, and Mohammad Ali Takhshid. 2019. "Sodium Valproate Ameliorates Aluminum-Induced Oxidative Stress and Apoptosis of PC12 Cells." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 22(11):1353–58.
- Iuvone, Teresa, Giuseppe Esposito, Ramona Esposito, Rita Santamaria, Massimo Di Rosa, and Angelo A. Izzo. 2004. "Neuroprotective Effect of Cannabidiol, a Non-Psychoactive Component from Cannabis Sativa, on  $\beta$ -Amyloid-Induced Toxicity in PC12 Cells." *Journal of Neurochemistry* 89(1):134–41.
- Jellinger, Kurt A. 2010. "Basic Mechanisms of Neurodegeneration: A Critical Update." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14(3):457–87.
- Jiang, Mingjin, Jing Li, Qiuxian Peng, Yi Liu, Wei Liu, Chaohua Luo, Ju Peng, Junkui Li, Ken Kin Lam Yung, and Zhixian Mo. 2014. "Neuroprotective Effects of Bilobalide on Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury Are Associated with Inhibition of Pro-Inflammatory Mediator Production and down-Regulation of JNK1/2 and P38 MAPK Activation." *Journal of Neuroinflammation* 11(1):1–17.
- Kamkaen, Narisa, Weerasak Samee, and Sarin Tadtong. 2020. "Neuroprotective Activities of Three Cannabinoids Separated from Confiscated Cannabis in Thailand." *Thammasat Medical Journal* 20(4):286–96.
- Kanai, H., and R-w Chen. 2004. "Valproic Acid Inhibits Histone Deacetylase

- Activity and Suppresses Excitotoxicity-Induced GAPDH Nuclear Accumulation and Apoptotic Death in Neurons.” (June):336–44.
- Khallaghi, Behzad, Fatemeh Safarian, Sanaz Nasoohi, Abolhassan Ahmadiani, and Leila Dargahi. 2016. “Metformin-Induced Protection against Oxidative Stress Is Associated with AKT/MTOR Restoration in PC12 Cells.” *Life Sciences* 148:286–92.
- Khanna, Savita, Zachary Briggs, and Cameron Rink. 2015. “Inducible Glutamate Oxaloacetate Transaminase as a Therapeutic Target Against Ischemic Stroke.” *Antioxidants & Redox Signaling* 22(2):175–86.
- Kiernan, Matthew C., Steve Vucic, Benjamin C. Cheah, Martin R. Turner, Andrew Eisen, Orla Hardiman, James R. Burrell, and Margaret C. Zoing. 2011. “Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *The Lancet* 377(9769):942–55.
- Kim, Jong Youl, Nuri Kim, and Midori A. Yenari. 2015. “Mechanisms and Potential Therapeutic Applications of Microglial Activation after Brain Injury.” *CNS Neuroscience and Therapeutics* 21(4):309–19.
- Kim, Jungnam, Ji Yu Choi, Jeongyeon Seo, and Insung S. Choi. 2021. “Neuroprotective Effect of Cannabidiol Against Hydrogen Peroxide in Hippocampal Neuron Culture.” 6(1):40–48.
- Łabuzek, Krzysztof, Dariusz Suchy, Bożena Gabryel, Anna Bielecka, Sebastian Liber, and Bogusław Okopień. 2010. “Quantification of Metformin by the HPLC Method in Brain Regions, Cerebrospinal Fluid and Plasma of Rats Treated with Lipopolysaccharide.” *Pharmacological Reports* 62(5):956–65.
- Lamichhane, Santosh, Tonking Bastola, Ramesh Pariyar, Eun Sol Lee, Ho Sub Lee, Dae Ho Lee, and Jungwon Seo. 2017. “ROS Production and ERK Activity Are Involved in the Effects of D-β-Hydroxybutyrate and Metformin in a Glucose Deficient Condition.” *International Journal of Molecular Sciences* 18(3):1–16.
- Lamprey, Richard N. L., Bivek Chaulagain, Riddhi Trivedi, Avinash Gothwal, Buddhadev Layek, and Jagdish Singh. 2022. “A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics.” *International Journal of Molecular Sciences* 23(3).
- Lang, Dorothee, Cornelia Kiewert, Alexander Mdzinarishvili, Tina Maria Schwarzkopf, Rachita Sumbria, Joachim Hartmann, and Jochen Klein. 2011. “Neuroprotective Effects of Bilobalide Are Accompanied by a Reduction of Ischemia-Induced Glutamate Release in Vivo.” *Brain Research* 1425:155–63.
- Laurencé, Céline, Narimane Zeghib, Michael Rivard, Sonia Lehri-Boufala, Isabelle Lachaise, Caroline Barau, Philippe Le Corvoisier, Thierry Martens, Laure Garrigue-Antar, and Christophe Morin. 2019. “A New Human Pyridinium Metabolite of Furosemide, Inhibitor of Mitochondrial Complex I,

- Is a Candidate Inducer of Neurodegeneration.” *Biochemical Pharmacology* 160(December 2018):14–23.
- Lazarini-lobes, Willian, Raquel A. Do, Val-da Silva, Rui M. P. Silva-júnior, João P. Leite, and Norberto Garcia-cairasco. 2020. “Neuroscience and Biobehavioral Reviews The Anticonvulsant e Ff Ects of Cannabidiol in Experimental Models of Epileptic Seizures : From Behavior and Mechanisms to Clinical Insights.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 111(November 2019):166–82.
- Lee, Junghee, Beatrix A. Olofsson, Aziza Mwidau, Maria Escudero, Erik Flemington, Jane Azizkhan-, Robert J. Ferrante, Rajiv R. Ratan, Hoon Ryu, Junghee Lee, Beatrix A. Olofsson, Aziza Mwidau, Alpaslan Dedeoglu, Maria Escudero, Erik Flemington, Jane Azizkhan-clifford, Robert J. Ferrante, Rajiv R. Ratan, Lian Fan, Brian W. Busser, and Traci Q. Lifsted. 2003. “Histone Deacetylase Inhibitors Prevent Oxidative Neuronal Death Independent of Expanded Polyglutamine Repeats via an Sp1-Dependent Pathway.” 100(11).
- Leung, Anna W. C., Pinadda Varanyuwatana, and Andrew P. Halestrap. 2008. “The Mitochondrial Phosphate Carrier Interacts with Cyclophilin D and May Play a Key Role in the Permeability Transition.” *Journal of Biological Chemistry* 283(39):26312–23.
- Leung, Sara, Martha E. O'Donnell, Anthony Martinez, and H. Clive Palfrey. 1994. “Regulation by Nerve Growth Factor and Protein Phosphorylation of Na/K/2Cl Cotransport and Cell Volume in PC12 Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 269(14):10581–89.
- Liu, Jia, and Lu Ning Wang. 2019. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists for Preventing Recurrent Stroke and Other Vascular Events in People with Stroke or Transient Ischaemic Attack.” *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019(10).
- Liu, Qiu, Zhiquan Jin, Zhiliang Xu, Hao Yang, Liang Li, Guiping Li, Fang Li, Shaoli Gu, Shaobo Zong, Jun Zhou, Liang Cao, Zhenzhong Wang, and Wei Xiao. 2019. “Antioxidant Effects of Ginkgolides and Bilobalide against Cerebral Ischemia Injury by Activating the Akt/Nrf2 Pathway in Vitro and in Vivo.” *Cell Stress and Chaperones* 24(2):441–52.
- Luszczki, Jarogniew J., Katarzyna M. Sawicka, Justyna Kozinska, Kinga K. Borowicz, and Stanislaw J. Czuczwar. 2007. “Furosemide Potentiates the Anticonvulsant Action of Valproate in the Mouse Maximal Electroshock Seizure Model.” *Epilepsy Research* 76(1):66–72.
- Malhotra, Konark, Jason J. Chang, Arjun Khunger, David Blacker, Jeffrey A. Switzer, Nitin Goyal, Adrian V. Hernandez, Vinay Pasupuleti, Andrei V. Alexandrov, and Georgios Tsivgoulis. 2018. “Minocycline for Acute Stroke Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials.” *Journal of Neurology* 265(8):1871–79.

- Martín-Moreno, Ana María, David Reigada, Belén G. Ramírez, R. Mechoulam, Nadia Innamorato, Antonio Cuadrado, and María L. De Ceballos. 2011. "Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation in Vitro and in Vivo: Relevance to Alzheimer's Disease." *Molecular Pharmacology* 79(6):964–73.
- Mason, Sarah L., and Roger A. Barker. 2016. "Advancing Pharmacotherapy for Treating Huntington's Disease: A Review of the Existing Literature." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 17(1):41–52.
- Mato, Susana, María Victoria Sánchez-Gómez, and Carlos Matute. 2010. "Cannabidiol Induces Intracellular Calcium Elevation and Cytotoxicity in Oligodendrocytes." *Glia* 58(14):1739–47.
- Mdzinarishvili, A., C. Kiewert, V. Kumar, M. Hillert, and J. Klein. 2007. "Bilobalide Prevents Ischemia-Induced Edema Formation in Vitro and in Vivo." *Neuroscience* 144(1):217–22.
- Mecha, M., A. S. Torrao, L. Mestre, F. J. Carrillo-Salinas, R. Mechoulam, and C. Guaza. 2012. "Cannabidiol Protects Oligodendrocyte Progenitor Cells from Inflammation-Induced Apoptosis by Attenuating Endoplasmic Reticulum Stress." *Cell Death and Disease* 3(6):e331-8.
- Meldrum, Brian, and John Garthwaite. 1990. "Excitatory Amino Acid Neurotoxicity and EAA Pharmacology j Neurodegenerative Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 11(9):379–287.
- Michels, Leslie. 2008. "A Question of Balance--Positive versus Negative Allosteric Modulation of GABA(A) Receptor Subtypes as a Driver of Analgesic Efficacy in Rat Models of Inflammatory and Neuropathic Pain." *Nature* 452(1–2):707–8.
- Mitrofanis, John. 2020. "Neuroprotection in Animal Models of Parkinson's Disease: Exploring Exercise, Sound, and Light." Pp. 663–76 in *Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease*, edited by C. R. Martin and V. R. Preedy. Elsevier.
- N. Agbedanu, Prince, Troy B. Puga, Joshua Schafer, Pearce Harris, Gary Branum, and Nora Strasser. 2022. "Investigation of Reactive Oxygen Species Production in Human Hepatocytes." *Gastroenterology Pancreatology and Hepatobiliary Disorders* 6(2):01–06.
- Nagańska, Ewa, Ewa Matyja, Anna Taraszewska, and Janina Rafałowska. 2015. "Protective Effect of Valproic Acid on Cultured Motor Neurons under Glutamate Excitotoxic Conditions. Ultrastructural Study." *Folia Neuropathologica* 53(4):309–16.
- Nasrin, Fatema. 2014. "Study of Antimicrobial and Antioxidant Potentiality of Anti-Diabetic Drug Metformin." *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis* 2(3):220–24.

- Nowak, Anna, Klaudyna Kojder, Joanna Zielonka-Brzezicka, Jacek Wróbel, Mateusz Bosiacki, Marta Fabiańska, Mariola Wróbel, Joanna Solek-Pastuszka, and Adam Klimowicz. 2021. "The Use of Ginkgo Biloba L. as a Neuroprotective Agent in the Alzheimer's Disease." *Frontiers in Pharmacology* 12(November):1–18.
- Okawa, Masafumi, Junei Kinjo, Toshihiro Nohara, and Masateru Ono. 2001. "DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24(10):1202–5.
- Oria de Suárez, Carlota, and Antonio Eblen Zajjur. 2001. "Efectos Extrarrenales de La Furosemida En El Tejido Cerebral Normal e Isquémico de La Rata." *Revista de Neurología* 32(05):414.
- Palol, Varsha Virendra, Sowmi Saravana, and Veni Subramanyam. 2021. "Effects of Valproic Acid with Different Drugs in Ovarian Cancer Cell Lines : An in Vitro Study." 13(3):1–13.
- Patel, Dipan C., Glenna Wallis, Robert S. Fujinami, Karen S. Wilcox, and Misty D. Smith. 2019. "Cannabidiol Reduces Seizures Following CNS Infection with Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus." *Epilepsia Open* 4(3):431–42.
- Patil, S. P., P. D. Jain, P. J. Ghumatkar, R. Tambe, and S. Sathaye. 2014. "NEUROPROTECTIVE EFFECT OF METFORMIN IN MPTP-INDUCED PARKINSON ' S DISEASE IN MICE." *NEUROSCIENCE* 277:747–54.
- Petrov, Lubomir, Albena Alexandrova, Mariana Argirova, Teodora Tomova, Almira Georgieva, Elina Tsvetanova, and Milka Mileva. 2022. "Chromatographic Profile and Redox-Modulating Capacity of Methanol Extract from Seeds of Ginkgo Biloba L. Originating from Plovdiv Region in Bulgaria." *Life* 12(6):878.
- Pinto, Sara, Carolina Cunha, Marta Barbosa, Ana R. Vaz, and Dora Brites. 2017. "Exosomes from NSC-34 Cells Transfected with HSOD1-G93A Are Enriched in Mir-124 and Drive Alterations in Microglia Phenotype." *Frontiers in Neuroscience* 11(MAY).
- Probes, Molecular. 2003. "EnzChek ® Caspase-3 Assay Kit # 2." *Cell* 2–4.
- Proper, E. A., G. Hoogland, S. M. Kappen, G. H. Jansen, M. G. A. Rensen, L. H. Schrama, C. W. M. Van Veelen, P. C. Van Rijen, O. Van Nieuwenhuizen, W. H. Gispen, and P. N. E. De Graan. 2002. "Distribution of Glutamate Transporters in the Hippocampus of Patients with Pharmaco-Resistant Temporal Lobe Epilepsy." *Brain* 125(1):32–43.
- Pushpakom, Sudeep, Francesco Iorio, Patrick A. Eyers, K. Jane Escott, Shirley Hopper, Andrew Wells, Andrew Doig, Tim Williams, Joanna Latimer, Christine McNamee, Alan Norris, Philippe Sanseau, David Cavalla, and Munir Pirmohamed. 2018. "Drug Repurposing: Progress, Challenges and

- Recommendations." *Nature Reviews Drug Discovery* 18(1):41–58.
- Raja, Aruna, Soha Ahmadi, Fernanda de Costa, Nan Li, and Kagan Kerman. 2020. "Attenuation of Oxidative Stress by Cannabinoids and Cannabis Extracts in Differentiated Neuronal Cells." *Pharmaceuticals* 13(11):1–16.
- Raphael, Mechoulam., Susana, Tchilibon., Ester, Fride., Lumir, Hanus., Aviva, Breuer., Ruth, Gallily. 2010. "Patent: Pharmaceutical Compositions Comprising Cannabidiol Derivatives." 2(12).
- Reilmann, Ralf, Blair R. Leavitt, and Christopher A. Ross. 2014. "Diagnostic Criteria for Huntington's Disease Based on Natural History." *Movement Disorders* 29(11):1335–41.
- Reith, Wolfgang. 2018. "Neurodegenerative Erkrankungen." *Radiologe* 58(3):241–58.
- Reyes-Pablo, Aldelmo Emmanuel, B. Berenice Campa-Córdoba, Nabil Itzi Luna-Viramontes, Miguel Ángel Ontiveros-Torres, Ignacio Villanueva-Fierro, Marely Bravo-Muñoz, Bárbara Sáenz-Ibarra, Oralía Barbosa, Parménides Guadarrama-Ortíz, Linda Garcés-Ramírez, Fidel De La Cruz, Charles R. Harrington, Sandra Martínez-Robles, Erik González-Ballesteros, George Perry, Mar Pacheco-Herrero, and José Luna-Muñoz. 2020. "National Dementia BioBank: A Strategy for the Diagnosis and Study of Neurodegenerative Diseases in México." *Journal of Alzheimer's Disease* 76(3):853–62.
- Rodrigues, Joana Gc, and Havovi Chichger. 2019. "At Physiologically Relevant Concentrations, Valproic Acid and Lithium Carbonate Reduce Oxidative Stress in Human Astrocytoma Cells." (August):71–79.
- Rodríguez, J., V. Díaz, Y. Rojas, Y. Rodríguez, and E. Núñez. 2013. "Actualización En Enfermedad de Huntington." *Correo Científico Médico* 17(1):546–57.
- Rogóż, Wojciech, Jadwiga Pożycka, Aleksandra Owczarzy, Karolina Kulig, and Małgorzata Maciążek-Jurczyk. 2022. "Comparison of Losartan and Furosemide Interaction with HSA and Their Influence on HSA Antioxidant Potential." *Pharmaceuticals* 15(5).
- Rotermund, Carola, Gerrit Machetanz, and Julia C. Fitzgerald. 2018. "The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Endocrinology* 9(JUL).
- Sadowska-Krępa, Ewa, Barbara Kłapcińska, Ilona Pokora, Przemysław Domaszewski, Katarzyna Kempa, and Tomasz Podgórski. 2017. "Effects of Six-Week Ginkgo Biloba Supplementation on Aerobic Performance, Blood pro/Antioxidant Balance, and Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor in Physically Active Men." *Nutrients* 9(8):1–11.
- Santos, Neife Aparecida Guinaim, Nádia Maria Martins, Flávia Malvestio Sisti,

- Laís Silva Fernandes, Rafaela Scalco Ferreira, Regina Helena Costa Queiroz, and Antônio Cardozo Santos. 2015. "The Neuroprotection of Cannabidiol against MPP<sup>+</sup>-Induced Toxicity in PC12 Cells Involves TrkA Receptors, Upregulation of Axonal and Synaptic Proteins, Neuritogenesis, and Might Be Relevant to Parkinson's Disease." *Toxicology in Vitro* 30(1):231–40.
- Schapira, A. H. .. 1994. "Evidence for Mitochondria1 Dysfunction in Parkinson's Disease-A Critic A1 Ap P." 9(2):125–38.
- Schapira, Anthony H., and Peter Jenner. 2011. "Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease." *Movement Disorders* 26(6):1049–55.
- Schwarzkopf, Tina M., Konrad A. Koch, and Jochen Klein. 2013. "Neurodegeneration after Transient Brain Ischemia in Aged Mice: Beneficial Effects of Bilobalide." *Brain Research* 1529:178–87.
- Sheleme, Tadesse. 2021. "Clinical Pharmacokinetics of Metformin." in *Metformin*, edited by J. Akhtar, U. Ahmad, Badruddeen, and M. I. Khan. Rijeka: IntechOpen.
- Sheppard, Olivia, and Michael Coleman. 2020. "Enfermedad de Alzheimer: Etiología, Neuropatología y Patogenia." *Enfermedad de Alzheimer: Descubrimiento de Fármacos* 1–22.
- Sheth, Kevin N., J. Marc Simard, Jordan Elm, Golo Kronenberg, Hagen Kunte, and W. Taylor Kimberly. 2016. "Human Data Supporting Glyburide in Ischemic Stroke." *Acta Neurochirurgica, Supplementum* 121:13–18.
- Simpson, J. E., P. G. Ince, G. Lace, G. Forster, P. J. Shaw, F. Matthews, G. Savva, C. Brayne, and S. B. Wharton. 2010. "Astrocyte Phenotype in Relation to Alzheimer-Type Pathology in the Ageing Brain." *Neurobiology of Aging* 31(4):578–90.
- Siqueira, De, Danielly Gonçalves, Sombra Lima, Jonathan Almeida, Ana Elisa, Roberta Oliveira Costa, Daniel Luna Lucetti, Elaine Cristina, Pereira Lucetti, Kelly Rose, Gonçalves Sombra Lima, Jonathan Almeida Moura, Ana Elisa, Oliveira Costa, Daniel Luna Lucetti, Elaine Cristina, Pereira Lucetti, and Kelly Rose Tavares. 2018. "Neuroprotective Effects of Valproic Acid on Brain Ischemia Are Related to Its HDAC and GSK3 Inhibitions." *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.
- Soukupová, Marie, Anna Binaschi, Chiara Falcicchia, Silvia Zucchini, Paolo Roncon, Eleonora Palma, Eros Magri, Enrico Grandi, and Michele Simonato. 2014. "Impairment of GABA Release in the Hippocampus at the Time of the First Spontaneous Seizure in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy." *Experimental Neurology* 257:39–49.
- Staley, Kevin J. 2002. "Diuretics as Antiepileptic Drugs: Should We Go with the Flow?" *Epilepsy Currents* 2(2):35–38.

- Stocchetti, Nino, Fabio S. Taccone, Giuseppe Citerio, Paul E. Pepe, Peter D. Roux, Mauro Oddo, Kees H. Polderman, Robert D. Stevens, William Barsan, Andrew IR Maas, Geert Meyfroidt, Michael J. Bell, Robert Silbergleit, Paul M. Vespa, Alan I. Faden, Raimund Helbok, Samuel Tisherman, Elisa R. Zanier, Terence Valenzuela, Julia Wendon, David K. Menon, and Jean Louis Vincent. 2015. "Neuroprotection in Acute Brain Injury: An up-to-Date Review." *Critical Care* 19(1):186.
- Tahir, S. K., J. E. Trogadis, J. K. Stevens, and A. M. Zimmerman. 1992. "Cytoskeletal Organization Following Cannabinoid Treatment in Undifferentiated and Differentiated PC12 Cells." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire* 70(10–11):1159–73.
- Talevi, Alan. 2016. "The Importance of Drug Repurposing in the Field of Antiepileptic Drug Development." Pp. 365–77 in.
- Talwar, Puneet, Juhi Sinha, Sandeep Grover, Chitra Rawat, Suman Kushwaha, Rachna Agarwal, Vibha Taneja, and Ritushree Kukreti. 2016. "Dissecting Complex and Multifactorial Nature of Alzheimer's Disease Pathogenesis: A Clinical, Genomic, and Systems Biology Perspective." *Molecular Neurobiology* 53(7):4833–64.
- Tarpey, Margaret M., David A. Wink, Matthew B. Grisham, Sang-keun Bae, Heyna Cha, Tae-jin Ju, Yong-woon Kim, Hee Sun Kim, Yong-dae Kim, Jinmyoung Dan, Jong-yeon Kim, Se-dong Kim, So-young Park, Ivan Rousseau, Monica Galleano, Susana Puntarulo, Mohamed Lamine Freidja, Bertrand Toutain, Antoine Caillon, Valérie Desquirit, Laurent Loufrani, Vincent Procaccio, Daniel Henrion, Allison E. Devan, Daniel Umpierre, Michelle L. Harrison, Hsin-fu Lin, Takashi Tarumi, Christopher P. Renzi, Mandeep Dhindsa, Stacy D. Hunter, Hirofumi Tanaka, Margaret M. Tarpey, David A. Wink, and Matthew B. Grisham. 2012. "Methods for Detection of Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen : In Vitro and in Vivo Considerations Exercise Methods for Detection of Reactive Metabolites of Oxygen and Nitrogen : In Vitro and in Vivo Considerations."
- Tsai, Hsing Chuan, and May H. Han. 2016. "Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation." *Drugs* 76(11):1067–79.
- Usuki, Toyonobu, Yukiko Yoshimoto, Makiko Sato, Tae Takenaka, Ryota Takezawa, Yusuke Yoshida, Masayuki Satake, Noriyuki Suzuki, Daisuke Hashizume, and Sergei V. Dzyuba. 2020. "Bilobalide and PC12 Cells: A Structure Activity Relationship Study." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 28(2):115251.
- Vitale, Rosa Maria, and Fabio Arturo Iannotti. 2021. "The ( Poly ) Pharmacology of Cannabidiol in Neurological and Neuropsychiatric Disorders : Molecular Mechanisms and Targets."
- Wakabayashi, Koichi, Kunikazu Tanji, Saori Odagiri, Yasuo Miki, Fumiaki Mori,

- and Hitoshi Takahashi. 2013. "The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders." *Molecular Neurobiology* 47(2):495–508.
- Wang, Xiaoyue, Xiaoyan Gong, Huina Zhang, Wanshan Zhu, Zewu Jiang, Yujing Shi, and Li Li. 2020. "In Vitro Anti-Aging Activities of Ginkgo Biloba Leaf Extract and Its Chemical Constituents." *Food Science and Technology (Brazil)* 40(2):476–82.
- Wang, Zhiyu, Prachi Vilekar, Junbo Huang, and Donald F. Weaver. 2020. "Furosemide as a Probe Molecule for the Treatment of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease."
- Willett, G. M., and N. S. Norton. 2014. "Amyotrophic Lateral Sclerosis☆." Pp. 490–94 in *Reference Module in Biomedical Sciences*. Vol. 59 Suppl 8. Elsevier.
- Van Der Worp, Bart H; Van Gijn, Jan. 2007. "Acute Ischemic Stroke." *The New England Journal of Medicine* 213–18.
- Xiang, Jun, Jingsi Zhang, Xiaofang Cai, Feng Yang, Wen Zhu, Wen Zhang, Min Cai, Zhonghai Yu, Xiangting Li, Ting Wu, Guohua Wang, and Dingfang Cai. 2019. "Bilobalide Protects Astrocytes from Oxygen and Glucose Deprivation-Induced Oxidative Injury by Upregulating Manganese Superoxide Dismutase." *Phytotherapy Research* 33(9):2329–36.
- Xin, Haolin. 2019. "RSC Advances Attenuated Glutamate Induced ROS Production by Antioxidative Compounds in Neural Cell Lines." 34735–43.
- Yang, Qianwen, Qianyi Huang, Zhiping Hu, and Xiangqi Tang. 2019. "Potential Neuroprotective Treatment of Stroke: Targeting Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Inflammation." *Frontiers in Neuroscience* 13(SEP):1–7.
- Yiannopoulou, Konstantina G., and Sokratis G. Papageorgiou. 2020. "Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update." *Journal of Central Nervous System Disease* 12:117957352090739.
- Yuengsrigul, Anchalee, Terry W. Chin, and Eliezer Nussbaum. 1999. "Immunosuppressive and Cytotoxic Effects of Furosemide on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells." *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 83(6 1):559–66.
- Zhang, Lihu, Chunyi Zhu, Xiaoqing Liu, Erzhen Su, Fuliang Cao, and Linguo Zhao. 2022. "Study on Synergistic Antioxidant Effect of Typical Functional Components of Hydroethanolic Leaf Extract from Ginkgo Biloba In Vitro." *Molecules* 27(2).
- Zhao, Ran Ran, Xiao Chen Xu, Fei Xu, Wei Li Zhang, Wen Lin Zhang, Liang Min Liu, and Wei Ping Wang. 2014. "Metformin Protects against Seizures, Learning and Memory Impairments and Oxidative Damage Induced by Pentylentetrazole-Induced Kindling in Mice." *Biochemical and Biophysical*

*Research Communications* 448(4):414–17.

- Zhao, Xia, Zhiwen Zeng, Uma Gaur, Jiankang Fang, Tangming Peng, Shuai Li, and Wenhua Zheng. 2019. "Metformin Protects PC12 Cells and Hippocampal Neurons from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Damage through Activation of AMPK Pathway." *Journal of Cellular Physiology* 234(9):16619–29.
- Zhou, Changwei, Rong Sun, Sujuan Zhuang, Chongyi Sun, Yongqing Jiang, Yang Cui, Shitou Li, Yanqiu Xiao, Yansheng Du, Huiying Gu, and Qingpeng Liu. 2016. "Metformin Prevents Cerebellar Granule Neurons against Glutamate-Induced Neurotoxicity." *Brain Research Bulletin* 121:241–45.
- Zhou, Li-Jun, and Xing-Zu Zhu. 2000. "Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in PC12 Cells and Protective Effect of Bilobalide." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293(3):982 LP – 988.