

PROYECTO DE TESINA LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

FCIEN-UdelaR

Distribución cerebral de Cannabidiol vehiculizado en MCT luego de su administración intranasal en ratas

Bach. Federico Sturla López

Orientadora: Dra Carolina Echeverry

Co-orientadora: Dra Jessika Urbanavicius

Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección,
Departamento de Neurofarmacología Experimental

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay.

Noviembre de 2025.

Índice

Resumen.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Historia del Cannabis.....	5
1.2. Fitocannabinoides.....	6
1.3. Sistema Endocannabinoide.....	8
1.4. Neuroprotección y sistema endocannabinoide.....	9
1.5. CBD como agente neuroprotector.....	11
1.7. Biodisponibilidad de CBD.....	15
1.8. Administración intranasal.....	16
1.6. Antecedentes particulares.....	18
2. Hipótesis.....	22
3. Objetivos.....	22
3.1. Objetivo general.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. Materiales y métodos.....	22
4.1. Animales.....	22
4.2. Drogas.....	23
4.3. Grupos experimentales.....	23
4.4. Administración intranasal y obtención de muestras.....	24
4.5. Puesta a punto y cuantificación de CBD en muestras biológicas.....	25
4.5.1. Condiciones cromatográficas.....	25
4.5.2. Curvas de calibración.....	25
4.5.4. Validación del método de extracción.....	27
4.6. Análisis de datos.....	27
5. Resultados.....	28
5.1. Puesta a punto.....	28
5.2. Niveles de CBD en cerebro.....	32
5.3. Niveles de CBD en plasma.....	35
5.4. Niveles de CBD en hígado.....	37
7. Conclusiones.....	42
8. Perspectivas.....	43
Referencias.....	44

Resumen

El Cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide no psicotomimético presente en la planta *Cannabis sativa*, con un amplio potencial terapéutico. En particular, estudios preclínicos han demostrado su propiedad neuroprotectora en diversos modelos de neurodegeneración y neurotoxicidad, posicionándolo como un candidato prometedor para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, uno de los principales desafíos de los productos farmacéuticos a base de cannabis para el tratamiento de enfermedades neurológicas es la baja biodisponibilidad de los cannabinoides. Actualmente existe escasa información sobre la biodisponibilidad cerebral de las distintas formulaciones a base de compuestos extraídos del *Cannabis*. En este sentido, en los últimos años la vía de administración intranasal ha emergido como estrategia alternativa no invasiva para la entrega de drogas, permitiendo el acceso al cerebro de forma rápida y directa. Resultados previos del grupo demostraron que el CBD posee un efecto neuroprotector en un modelo de neurotoxicidad inducido por rotenona en cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo. De forma interesante, se observó que un factor clave en esta propiedad es el vehículo en el cual se encuentra preparado el CBD (vehículo de formulación). En particular, se observó que el vehículo *medium-chain triglyceride* (MCT) elimina la toxicidad asociada al CBD a altas concentraciones.

En este marco, el objetivo general de este proyecto fue realizar un estudio detallado de la distribución cerebral de CBD preparado en el vehículo de formulación MCT, utilizando la vía de administración intranasal. Para esto, se cuantificaron las concentraciones de CBD en diferentes regiones cerebrales (bulbo olfatorio, corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo y cerebelo), así como en plasma e hígado, a los 30, 60 y 90 minutos posteriores a la administración intranasal por goteo de 10 mg de CBD en 30 µL de MCT. Las muestras fueron procesadas mediante una combinación de precipitación proteica y extracción líquido-líquido, usando delta-9-tetrahidrocannabinol (THC)

como estándar interno, y analizadas mediante cromatografía líquida de alta performance acoplado a espectrometría de masa (UHPLC-MS).

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de CBD en todas las regiones cerebrales analizadas, con perfiles de absorción y eliminación dependientes de su localización en el eje anteroposterior. Se observaron concentraciones mayores en las regiones más anteriores, con fases de absorción y eliminación características de cada región. En el plasma, la concentración de CBD disminuyó con el tiempo debido a su eliminación, mientras que en el hígado se registraron concentraciones relativamente muy superiores, con un perfil farmacocinético clásico. Estos hallazgos respaldan el uso de la administración intranasal de CBD en MCT como una estrategia eficaz para alcanzar concentraciones cerebrales potencialmente terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Palabras clave: Cannabidiol; Cannabinoides; Biodisponibilidad cerebral; Administración intranasal; *Medium chain triglyceride*; Plasma; UHPLC-MS.

1. Introducción

1.1. Historia del *Cannabis*

La historia del *Cannabis* puede dividirse en distintas etapas, como se muestra en la *Figura 1* [1]. La primera etapa se remonta a miles de años atrás, cuando la planta de *Cannabis sativa* era cultivada con fines utilitarios como la fabricación de ropa, cuerdas y papel. Las primeras referencias documentadas sobre el uso psicotrópico y medicinal del *Cannabis* datan del 2700 a.C en la farmacopea china del emperador Shen Nong. En este texto, se recomendaba su uso como sedante durante cirugías en una mezcla con vino y extractos vegetales. En la India, el *Cannabis* ha sido utilizado durante miles de años bajo el nombre de *Viyaya*, con un rol religioso como agente para la inspiración divina. Sus propiedades estimulantes y eufóricas fueron destacadas hacia el año 1200 a.C en el libro sagrado *Atharva Veda*, donde se lo menciona como una de las cinco plantas sagradas [2,3].

La segunda etapa se caracteriza por el estudio de su composición, mediante la identificación y caracterización de los principales fitocannabinoides presentes en la planta. El primero en ser aislado fue el cannabinol (CBN), extraído en el año 1899 a partir de la resina del cáñamo. Su estructura fue determinada y sintetizada en 1940, junto al descubrimiento, aislamiento y caracterización estructural de cannabidiol (CBD). Posteriormente, en el año 1965, ocurrió el aislamiento y caracterización del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) [4].

La tercera y cuarta etapa estuvieron marcadas por el descubrimiento y la elucidación de la estructura de los receptores cannabinoides tipo 1 y 2 (CBR1 y CBR2), en 1988 y 1993 respectivamente, a partir de estudios sobre su interacción con THC. En 1992 se aisló y caracterizó su ligando endógeno, la anandamida (AEA), lo cual permitió el descubrimiento de distintos ligandos para estos receptores [1, 5]. Estos hallazgos condujeron a la formulación del concepto de un nuevo sistema de señalización endógeno denominado sistema endocannabinoide (SECB), a finales de la década de 1990 [6].

La última etapa de la historia corresponde a la actualidad, en la cual el enfoque se centra en la investigación y desarrollo de medicamentos a base de cannabinoides con fines terapéuticos.

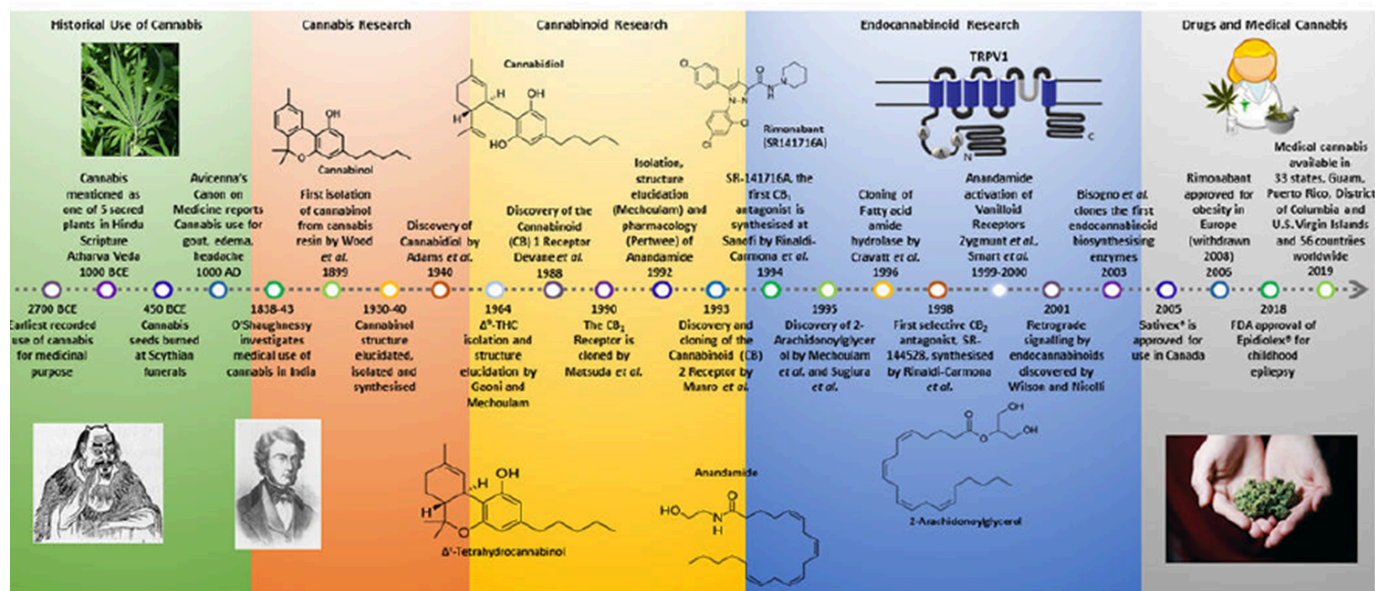


Figura 1: Cronología de las etapas sobre la investigación en Cannabis [1].

1.2. Fitocannabinoides

Hasta el momento, en la planta *Cannabis sativa*, se han identificado más de 550 metabolitos bioactivos, que incluyen los fitocannabinoides, terpenos, flavonoides, estilbenos, lignanamidas, carotenoides y alcaloides, entre otros. A pesar de la amplia diversidad estructural presente en la biblioteca molecular de esta planta, en los últimos años el interés científico se ha centrado especialmente en el primer grupo de moléculas mencionado: los fitocannabinoides, debido a su gran potencial terapéutico [7]. Estas moléculas se encuentran casi exclusivamente en la planta de *Cannabis sativa* y comprenden cerca de 200 compuestos, localizados mayoritariamente en los tricomas glandulares de las inflorescencias femeninas [8].

A diferencia de muchos compuestos de origen vegetal bioactivos, como la cocaína, nicotina o cafeína, los fitocannabinoides son hidrocarburos aromáticos oxigenados que no contienen nitrógeno en su estructura química, por lo que no se clasifican como alcaloides [9]. Su estructura básica consta

de un núcleo principal compuesto por 22 carbonos (21 si se encuentran en su forma neutra), conformando un sistema tricíclico integrado por un anillo fenólico, un pirano central y un ciclohexilo monoinsaturado. Dentro de los fitocannabinoides, los más importantes y más abundantes en la planta son el CBD, Δ^9 -THC y, en menor medida el CBN, los cuales se encuentran en su forma ácida y sus concentraciones relativas dependen de la variedad de *Cannabis* [10]. La presencia de una cadena hidrocarbonada larga unida a un anillo bencénico en la estructura de los fitocannabinoides confiere a estas moléculas una alta lipofilicidad, baja solubilidad acuosa y en consecuencia comprometen su biodisponibilidad, siendo este aspecto de relevancia para su uso terapéutico [11].

El principal responsable de las propiedades psicotrópicas del *Cannabis* es el Δ^9 -THC (*Figura 2*). La presencia de un núcleo de tipo dihidrobenzopirano en su estructura le permite adoptar una configuración tridimensional que determina su interacción con alta afinidad con el receptor CBR1. Su producto de degradación, el CBN, también posee efectos psicotrópicos, aunque con una potencia 10 veces menor. Por otro lado, el CBD (*Figura 2*) es el principal fitocannabinoides no psicotrópico y presenta una estructura bicíclica debido a una escisión en el anillo del tetrahidropirano. Esta característica estructural es considerada la principal razón de la ausencia de efectos psicotrópicos de CBD. [10,12]

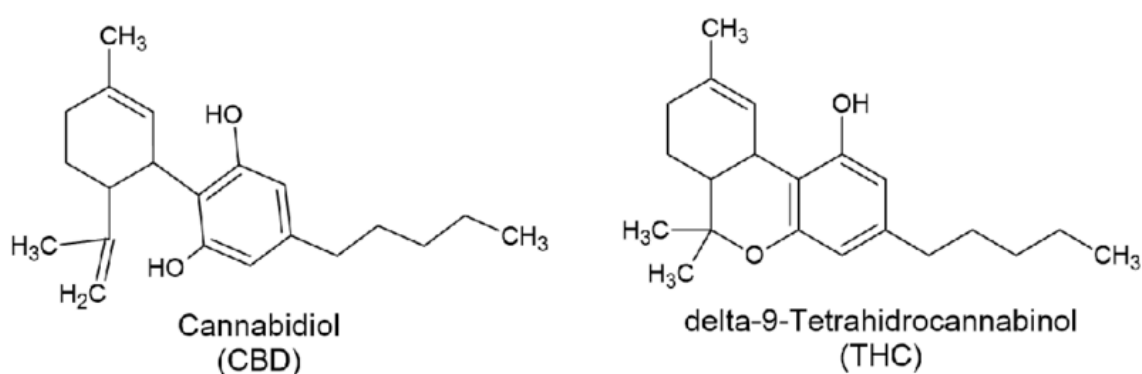


Figura 2: Estructura química de los principales fitocannabinoides: CBD y THC.

1.3. Sistema Endocannabinoide

La elucidación del SEcB durante la década de 1990 representó un avance importante en la comprensión del mecanismo de acción de los fitocannabinoides. Este sistema se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC) con un rol fundamental en funciones neuronales, procesos de neuroplasticidad, y modulación de neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico, glutamato y serotonina, entre otros. Participa en varios procesos fisiológicos como son la regulación de apetito, la percepción de dolor, procesos cognitivos y modulación de los estados de ánimo [6]. Este sistema se encuentra compuesto principalmente por los endocannabinoides AEA y 2-Araquidonilglicerol (2-AG), y aquellas enzimas encargadas de su síntesis y degradación. Además, comprende los receptores CBR1 y CBR2 previamente mencionados, proteínas transportadoras, así como el receptor *G protein-coupled receptor 55* (GPR55) y el receptor vaniloide 1 de potencial transitorio (TRPV1), que en algunos estudios han sido considerados parte de un sistema endocannabinoide extendido [13].

Los receptores CBR1 y CBR2 son receptores metabotrópicos acoplados a proteína G que presentan selectividad funcional, donde diferentes ligandos pueden activar vías de señalización específicas. Al estar acoplados principalmente a proteínas G inhibitorias, estos receptores participan de la inhibición de la adenil ciclasa y de algunos canales de calcio dependientes del voltaje, así como en la activación de canales rectificadores de calcio, el reclutamiento de arrestinas y la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, entre otras muchas funciones [14]

Dada su importancia en tantos procesos fisiológicos, el SEcB se ha considerado como un blanco terapéutico de interés de muchos compuestos con actividad biológica específica. En el marco de la neuroprotección, los efectos beneficiosos se relacionan con la limitación del daño neuronal por reducción de la internalización de calcio, disminución de la neuroinflamación, la excitotoxicidad, así como del estrés oxidativo. En este sentido, los cannabinoides están emergiendo como potenciales agentes terapéuticos para patologías neurodegenerativas progresivas [13]

1.4. Neuroprotección y sistema endocannabinoide

Las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple, tienen una naturaleza progresiva y crónica, llevando a un empeoramiento de los síntomas con el tiempo. Estas enfermedades presentan una alta prevalencia en adultos mayores, convirtiéndolas en un desafío prioritario en la salud pública mundial debido al envejecimiento global de la población. Además, demandan altos costos económicos y emocionales para el paciente y para su entorno cercano, afectando significativamente su calidad de vida. Las terapias disponibles son sintomáticas y no detienen o retrasan el proceso degenerativo [15]. Si bien estas enfermedades difieren en sus características clínicas y neuropatológicas, todas se caracterizan por un proceso progresivo de degeneración y muerte neuronal en el SNC o periférico [16].

El desarrollo de estas enfermedades es un proceso multifactorial, resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales, metabólicos y celulares (*Figura 3*). Durante el envejecimiento, múltiples sistemas, incluidos el inmune y el metabólico, sufren alteraciones que incrementan la vulnerabilidad neuronal [17–21]. Neuronas y glías coexisten en microambientes complejos que, al alterarse, pueden desencadenar mecanismos patológicos como la acumulación de proteínas mal plegadas, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, generando ciclos de daño celular que se retroalimentan [22, 23]. Además, debido a su elevada demanda energética y alto contenido mitocondrial, las neuronas son células particularmente sensibles al desequilibrio redox, lo que incrementa aún más su vulnerabilidad [24].

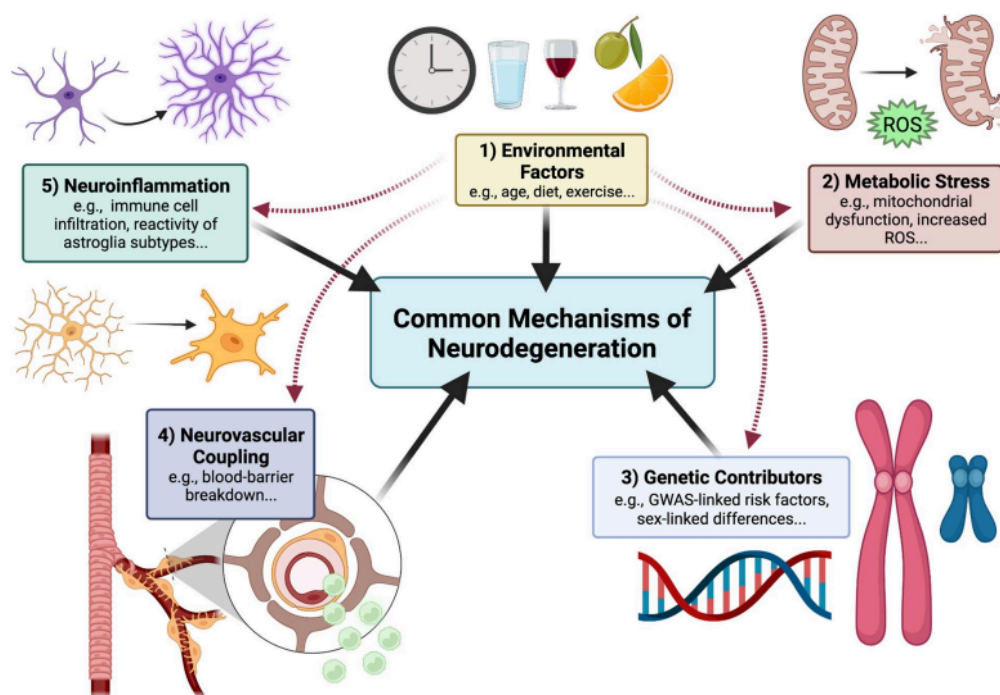


Figura 3: Mecanismos comunes de neurodegeneración [26].

El conjunto de estos procesos interconectados, que sostienen y amplifican el daño neuronal, explican en parte la dificultad de desarrollar terapias efectivas. En este contexto, surge un creciente interés en la identificación de estrategias neuroprotectoras capaces de modular dichos mecanismos patológicos y, al mismo tiempo, favorecer la supervivencia neuronal. Entre las aproximaciones más prometedoras se encuentra la investigación sobre el papel del SecB en la neuroprotección. En algunos modelos celulares de enfermedad de Parkinson, por ejemplo, la co-expresión y activación de CBR1 y GPR55 en la línea celular humana derivada de neuroblastoma, SH-SY5Y, mostró efectos neuroprotectores frente a la toxina MPP+ [27], mientras que la AEA previno la apoptosis celular en la línea celular PC12, expuesta a la toxina 6-hidroxidopamina [28].

Estos efectos neuroprotectores están asociados a la modulación de procesos excitotóxicos, inflamatorios y apoptóticos a través de la activación de receptores como CBR1, CBR2, GPR55 y TRPV1 [13]. Ha sido descrito que la activación de CBR1 expresado en las terminales glutamatérgicas reduce la liberación de glutamato, limitando de esta manera su excitotoxicidad, proceso que ha sido asociado al daño neuronal característico observado en estas patologías [29]. Además, la activación de CBR1 y

CBR2 modula los niveles de neurotrofinas y mediadores inflamatorios, promoviendo un ambiente antiinflamatorio. En estudios *in vivo* en ratones se ha descrito la disminución de los niveles de las citoquinas TNF- α e interleucina-12 y el aumento de interleucina-10, una citoquina clásicamente descrita como antiinflamatoria [30]. Otros estudios también demuestran que la activación de estos receptores atenúan vías de muerte celular dependientes de calcio, incluyendo la inhibición de receptores glutamatérgicos de tipo N-metil-D-aspartato, responsables de la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje [31].

En conjunto, la evidencia sugiere que el SEcB participa en la regulación de diversos mecanismos neuroprotectores. Dada esta implicancia, resulta de particular interés el estudio de moléculas exógenas capaces de influir sobre este sistema. Entre ellas, los fitocannabinoides surgen como agentes con potencial terapéutico para la neuroprotección, destacándose el CBD como un compuesto prometedor por su carácter no psicotrópico.

1.5. CBD como agente neuroprotector

Dada la ausencia de acción psicotrópica del CBD (a diferencia del THC), este ha emergido como el principal candidato como cannabinoide medicinal para enfermedades que afectan al SNC. La investigación en torno al posible impacto del CBD en enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas comenzó en la década del 70, mostrando un claro aumento en los últimos 20 años (*Figura 4*).

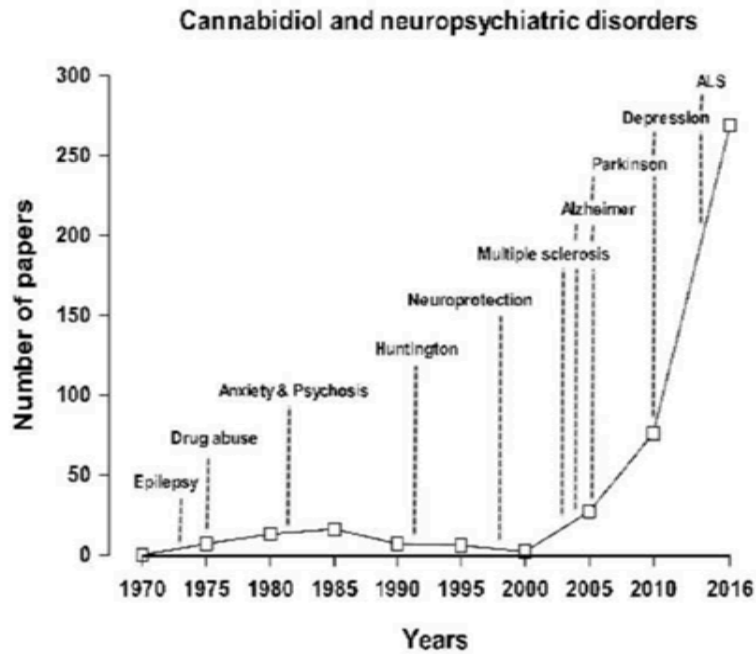


Figura 4: Número de publicaciones en PubMed describiendo posibles efectos terapéuticos del CBD en enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas desde 1970 [32].

Los efectos neuroprotectores observados para el CBD, así como para otros fitocannabinoides, se han demostrado a través de su acción sobre múltiples blancos moleculares, tanto asociados al SEcB como independientes de este (Figura 5). Dentro de los mecanismos dependientes del SEcB, el CBD es capaz de aumentar los niveles de AEA a través de la inhibición de su degradación intracelular por la amida hidrolasa de ácidos grasos (enzima encargada de la degradación de endocannabinoides), brindando neuroprotección al aumentar los efectos de los endocannabinoides mediados por la activación de CBR1 y CBR2. Estudios *in vivo* en ratones de 4 semanas, evidenció que el CBD aumenta la neurogénesis en el hipocampo por medio de la facilitación de AEA por CBR1, mientras que los ratones *knockout* de CBR1 mostraron ausencia de neurogénesis [33, 34]. En estudios *in vitro*, el CBD redujo la activación microglial por el péptido beta amiloide actuando por medio de los receptores CBR1 y CBR2, ya que se perdió el efecto al pretratar con un antagonista de estos receptores [32].

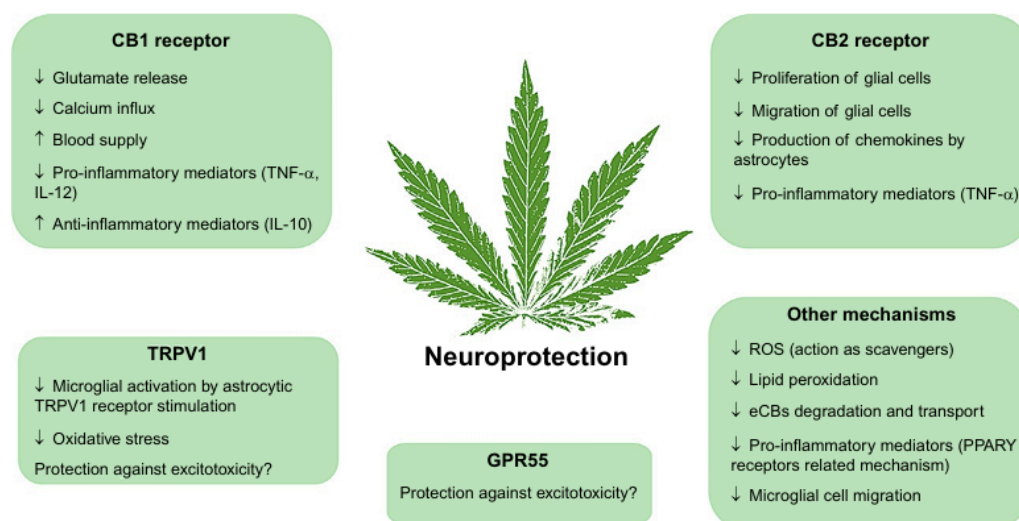


Figura 5: Resumen de los diferentes mecanismos propuestos para la neuroprotección por cannabinoides [27].

Además, se han descrito mecanismos neuroprotectores por CBD independientes del SEcB. Entre ellos, se destacan aquellos relacionados con la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR- γ), así como del receptor serotoninérgico 1A (5HT1A), los cuales se asocian principalmente a la restauración de cambios redox e inflamatorios alterados durante los procesos neurodegenerativos [13]. Por ejemplo, ha demostrado ser neuroprotector en distintos modelos experimentales de neurodegeneración. Se ha documentado la capacidad del CBD para reducir el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células progenitoras de oligodendrocitos, mediante la disminución de la producción de ROS por su acción antioxidante directa (*scavenger*) [35]. Asimismo, se ha observado un aumento de la expresión del ARNm de la enzima antioxidante superóxido dismutasa en la sustancia *nigra* en un modelo de enfermedad de Parkinson inducido por 6-OHDA en ratas [36]. También, CBD ha mostrado capacidad de modular mediadores inflamatorios a través de PPAR- γ , inhibiendo la transcripción de genes proinflamatorios mediados por la vía de señalización NF- κ B. [37]. A su vez, CBD reduce la migración y activación de las células microgliales a los sitios de lesión, cuyo rol es clave en la propagación de la respuesta neuroinflamatoria [37].

Por otro lado, parte de los efectos neuroprotectores de CBD pueden atribuirse a interacciones alostéricas con el sitio activo del receptor serotoninérgico 5HT1A [38], y/o interferencias con algunas vías intracelulares de señalización [32]. Se ha descrito que CBD promueve un aumento de la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, una proteína esencial para el desarrollo, mantenimiento y plasticidad del sistema nervioso por medio de la activación de 5HT1A-R.

A pesar de la creciente evidencia preclínica que respalda las acciones neuroprotectoras del CBD, su traslación a la práctica clínica ha sido limitada. Actualmente, las formulaciones aprobadas se enfocan principalmente en patologías de origen epiléptico, sin que existan aún medicamentos basados en CBD específicamente indicados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El *Epidiolex*, es el único medicamento en base a CBD purificado aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. Este medicamento está indicado como tratamiento complementario para convulsiones asociadas a algunas patologías como son el síndrome de Dravet o el síndrome de Lennox-Gastaut [39]. Existen también otras formulaciones farmacéuticas a base de cannabinoides como *Sativex* que combina THC y CBD en proporciones definidas para el tratamiento de la espasticidad relacionada a la esclerosis múltiple [40]. En Uruguay existen cuatro medicamentos con CBD de administración oral aprobados por el Ministerio de Salud Pública: *Epifractan* (extracto de *Cannabis*), *Xalex* y *Xannadiol* (ambos con CBD purificado), utilizados para el tratamiento de epilepsia refractaria en niños y adolescentes [41]. El cuarto medicamento corresponde al *Xpectra 10* (extracto de *Cannabis*), indicado para la epilepsia refractaria en niños y adolescentes, pero también como tratamiento complementario para las crisis asociadas con el complejo de esclerosis tuberculosa [42]. El uso de todos estos medicamentos está indicado exclusivamente por vía oral.

A pesar de los prometedores efectos neuroprotectores observados en modelos preclínicos, todavía se requiere evidencia científica más sólida que permita comprender en detalle los mecanismos de acción del CBD. Resulta necesario optimizar las formulaciones para su uso clínico,

establecer pautas de dosificación adecuadas y explorar vías de administración alternativas que puedan potenciar su biodisponibilidad y eficacia. Este conocimiento permitirá no solo ampliar su uso terapéutico más allá de las patologías epilépticas, sino también evaluar su potencial en distintas enfermedades del SNC, incluyendo trastornos neurodegenerativos.

En este sentido, un aspecto fundamental a considerar es la biodisponibilidad del CBD, la cual determina la fracción del compuesto que efectivamente llega a la circulación sistémica y, en última instancia, al SNC. Comprender sus limitaciones y factores moduladores resulta esencial para optimizar la aplicación terapéutica de este compuesto.

1.7. Biodisponibilidad de CBD

Según la farmacocinética, la biodisponibilidad se define como el grado y la velocidad con la que un principio activo o su fracción inalterada alcanzan la circulación sistémica. Sin embargo, este valor no equivale a la fracción del principio activo que efectivamente alcanza el sitio de acción para ejercer su efecto farmacológico debido a que existen transferencias de masa entre el compartimiento donde se calcula la biodisponibilidad formalmente (el plasma) y el compartimiento donde ocurre el efecto deseado. Esta segunda definición corresponde a la biodisponibilidad efectiva según la farmacodinamia [43]. La farmacocinética y los efectos farmacológicos de este proceso dependen en gran medida de las propiedades fisicoquímicas y de la forma farmacológica en la que se encuentra incluido el compuesto [44]. La biodisponibilidad de un compuesto también depende en gran medida de su ruta de administración [45]. En el caso de CBD, la mayoría de las formulaciones de uso terapéutico se administran por la vía oral lo que implica su pasaje hepático y metabolización comprometiendo su acceso al cerebro [46]. El CBD es en una primera etapa oxidado por varias isoenzimas del citocromo p450, principalmente CYP3A4 y CYP2C19, siendo metabolizando a 7-hydroxyl-CBD y posteriormente en su forma inactiva 7-carboxy-CBD. Posteriormente, estos metabolitos son conjugados mediante glucuronidación por la enzima UGT1A9, permitiendo su posterior excreción [46-48]. Los estudios existentes reportan una biodisponibilidad sistémica del 6%

en condiciones de ayuno. Estos bajos valores se deberían a factores tales como una absorción irregular por su alta lipofilidad, inestabilidad en el ambiente ácido estomacal y elevado metabolismo del primer pasaje hepático [49]. En consecuencia, la eficiencia terapéutica de este compuesto se encuentra limitada, siendo necesaria una mayor dosis para alcanzar concentraciones efectivas, incrementando también los riesgos de toxicidad y potenciales efectos secundarios no deseados [46]. Sin embargo, resulta interesante que, al ser administrado por vía oral consumido junto a una comida con elevado contenido lipídico, su biodisponibilidad incrementa al 19%, demostrando la relevancia de los lípidos (y vehículos lipídicos) para mejorar estos valores [49, 50]. Este aumento de la biodisponibilidad de CBD cuando se consume junto a comidas ricas en lípidos puede atribuirse a la mayor solubilidad del compuesto en la matriz lipídica, viéndose favorecida por la formulación de emulsiones y micelas por acción de las sales biliares y enzimas pancreáticas. Asimismo, gran parte de los lípidos son absorbidos a través del sistema linfático, lo que permite evadir el metabolismo del primer pasaje hepático antes de alcanzar la circulación sistémica. A su vez, las comidas con elevado contenido lipídico retrasan el tránsito gastrointestinal, favoreciendo una absorción más prolongada y eficiente del compuesto hacia el torrente sanguíneo [51]. Actualmente, los estudios sobre su biodisponibilidad cerebral son limitados [48, 52-54].

Al momento de pensar en el desarrollo de terapias de uso de CBD como neuroprotector es imprescindible considerar su capacidad de alcanzar de manera efectiva el cerebro. En este sentido, vehículos de formulación, así como vías de administración son factores relevantes para lograr este objetivo. Así, la vía intranasal, aparece como una vía de administración prometedora para su uso terapéutico.

1.8. Administración intranasal

La vía de administración intranasal representa una estrategia no invasiva y eficaz para la entrega de compuestos al cerebro, permitiendo su acceso de forma rápida y directa. A diferencia de otras vías de administración sistémicas, la vía intranasal permite *bypasear* la barrera

hematoencefálica disminuyendo el metabolismo del primer pasaje hepático, además de reducir posibles efectos sistémicos secundarios no deseados [46, 55]. La llegada al cerebro por esta vía tiene lugar mediante varios mecanismos (Figura 6A) siendo la vía directa la más relevante. Esta vía implica el pasaje del fármaco directamente al cerebro desde la nariz, algo que se conoce como *nose-to-brain delivery* a través de los nervios olfatorio y trigeminal encargados de inervar la cavidad nasal y conectarla con el SNC [56]. Dentro de la vía directa, la ruta extraneuronal es la que tiene mayor contribución en el transporte al cerebro (Figura 6A), demorando el compuesto hasta 30 minutos en alcanzar las zonas más distales [52, 56]. En esta ruta los compuestos acceden a la lámina propia a través de las uniones estrechas celulares del epitelio nasal para posteriormente traslocarse al espacio perineuronal y acceder al SNC. Además, los compuestos pueden acceder al cerebro mediante internalización por parte de las neuronas olfatorias, con el subsecuente transporte axonal y exocitosis en el bulbo olfatorio y posterior distribución a las diferentes regiones cerebrales. Sin embargo, este proceso puede llevar varias horas o incluso días [57].

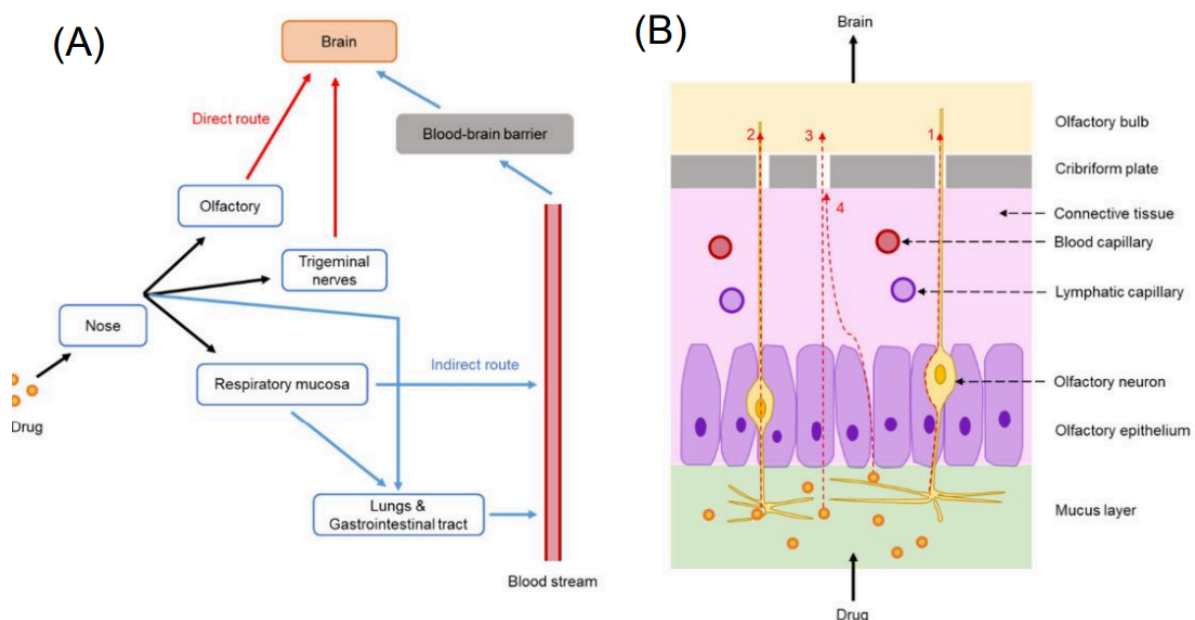


Figura 6: Vías para el *nose-to-brain* delivery de formulaciones intranasales. **A)** Transporte de drogas desde la nariz al cerebro por la vía directa (nervios olfatorio y trigeminales) e indirecta (entrando a

circulación sistémica y cruzando la barrera hematoencefálica). **B)** Vía olfatoria del *nose-to-brain delivery* de drogas: **(1)** ruta extraneuronal, **(2)** ruta intraneuronal, **(3)** a través de las células de soporte, **(4)** a lo largo de las células de soporte. [56]

Basado en estudios preliminares en roedores, se ha observado que drogas administradas por vía intranasal pueden acceder al SNC en tan solo 5 minutos, alcanzando regiones más distales del cerebro en un rango de entre 30 y 120 minutos post-administración [57]. En particular, investigaciones utilizando albúmina como marcador han mostrado que, tras su administración intranasal, las concentraciones máximas se alcanzan a los 10 minutos en el bulbo olfatorio, mientras que, en regiones más mediales, como el cuerpo estriado, el pico máximo se registra alrededor de los 30 minutos [58]. Estas variaciones en los tiempos de distribución sugieren que la cinética de llegada al cerebro depende de la región evaluada y del compuesto administrado [57]. Gracias a su inocuidad, su acceso rápido y directo al cerebro, su menor absorción plasmática y subsecuente metabolismo hepático, la administración intranasal representa una vía prometedora para mejorar la eficacia terapéutica en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas y/o neurodegenerativas del SNC.

1.6. Antecedentes particulares

Con el fin de avanzar en la comprensión de los mecanismos que subyacen a la propiedad neuroprotectora de compuestos naturales, en el Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección del IIBCE, se llevan a cabo estudios orientados a analizar el potencial neuroprotector de los cannabinoides y los mecanismos involucrados [59, 60]. En particular, utilizando un modelo *in vitro* de cultivo primario de neuronas granulares del cerebelo expuestos a rotenona, hemos desarrollado estudios de neuroprotección y neurotoxicidad [59]. La rotenona es una neurotoxina natural utilizada para inducir neurodegeneración ya que mimetiza algunos de los efectos celulares que ocurren en las enfermedades neurodegenerativas como la inhibición de la cadena de transporte de electrones, la activación de la cascada de apoptosis y muerte celular. En este contexto,

se evaluó la neuroprotección de CBD utilizando tres formulaciones distintas: CBD purificado disuelto en DMSO-medio (concentración final de DMSO <1,5% en medio de cultivo); *Xalex* (formulación farmacéutica de CBD purificado); y *Epifractan* (50mg/mL de CBD, <2mg/mL de THC y THCA, además de otros compuestos presentes en la planta como terpenos y flavonoides). Tanto *Epifractan* como *Xalex* utilizan como vehículo de formulación triglicéridos de cadena media (MCT; *Figura 7*) [59].

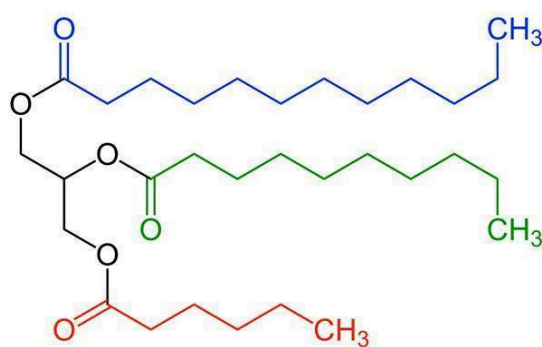


Figura 7: Estructura química del MCT.

Los MCT son un tipo de lípidos encontrados en ciertos aceites naturales y productos lácteos, utilizados frecuentemente como excipientes en productos farmacéuticos. Sus propiedades hidrofóbicas y su inocuidad contribuyen a mejorar la solubilidad, fluidez y estabilidad frente a la oxidación [61, 62]. En el caso de CBD, una molécula lipofílica de baja solubilidad acuosa (12,6 mg/L) y alta permeabilidad ($\log P = 6,3$; clase II según BCS), los MCT representarían un buen vehículo de formulación [63] y han demostrado aumentar su biodisponibilidad, su transporte linfático intestinal en ratas y potenciar su solubilidad micelial [64].

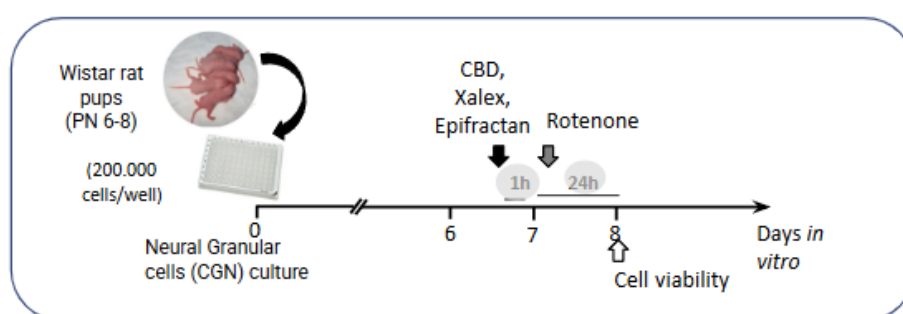


Figura 8: Diseño experimental para evaluar el efecto neuroprotector in vitro en cultivo primario de neuronas granulares del cerebelo de distintas formulaciones de CBD contra rotenona.

Siguiendo el diseño experimental presentado en la *Figura 8*, se comparó la capacidad neuroprotectora de las tres formulaciones, utilizando concentraciones equivalentes de CBD. Para ello, los cultivos primarios de neuronas granulares fueron pretratados con cada formulación una hora antes de la adición de rotenona, y la viabilidad neuronal fue evaluada a las 24 horas mediante el ensayo de MTT (medición de la actividad mitocondrial). Como se observa en la *Figura 9*, la exposición a rotenona indujo una pérdida de viabilidad celular del 40-50% en comparación con el control. Las tres formulaciones mostraron efectos neuroprotectores, aunque con perfiles distintos: Epifractan y Xalex presentaron un perfil de protección similar con un rango de acción amplio (2,5–20 μ M de CBD), mientras que el CBD disuelto en DMSO-medio mostró un rango más estrecho, ya que a concentraciones superiores a 10 μ M se volvió incluso más tóxico que la rotenona sola. Se verificó que el vehículo MCT por sí solo no atenúa el daño inducido por la rotenona. La mayor toxicidad observada para el CBD libre a altas concentraciones podría atribuirse a la exposición neuronal inmediata a picos de concentración del compuesto en el medio [59]. Por otro lado, en las formulaciones basadas en MCT, los triglicéridos podrían actuar como un reservorio lipídico que libera el CBD de forma gradual, evitando las concentraciones locales excesivas y prolongando su disponibilidad efectiva. Cabe aclarar que en dicha investigación se realizaron también ensayos de neurotoxicidad de las distintas formulaciones, observando que ninguno de los dos vehículos, MCT o DMSO-medio, tienen toxicidad *per se* [59, 60].

Estos resultados demuestran la propiedad neuroprotectora de CBD en este modelo y sugieren que las formulaciones con MCT tienen un importante efecto sobre la viabilidad celular, ofreciendo un rango de concentración para la acción neuroprotectora más amplio [59].

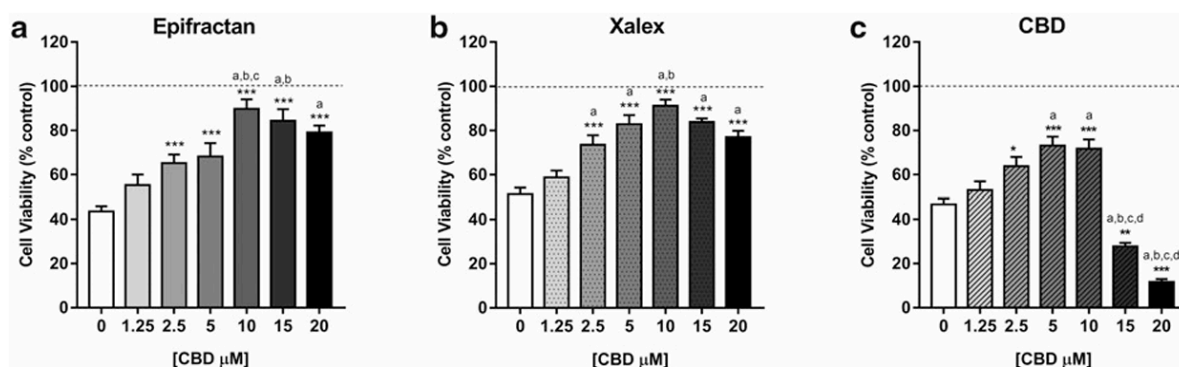


Figura 9: Efecto neuroprotector inducido por 24 hrs de pretratamiento con **a) Epifractan**, **b) Xalex**, y **c) CBD**, contra rotenona. Los datos se expresan como media \pm SEM de la viabilidad celular (% respecto al control) en relación con diferentes concentraciones de CBD. Se utilizó *One-way* ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de *Tukey*. * vs grupo control (0 μ M). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; a, b, c, d y e representan diferencias significativas en comparación con concentraciones de 1.25; 2.5; 5.0; 10 y 15 μ M de CBD, respectivamente. Tomado y modificado de [59].

Además, el perfil similar entre Epifractan y Xalex indica que, en este modelo, la actividad neuroprotectora de extractos de *Cannabis* como el *Epifractan* depende exclusivamente de CBD [59]. En particular, se evidenció que el MCT como excipiente podría ser un factor clave para la eficacia terapéutica de las formulaciones a base de *Cannabis*, ya que permitiría disminuir la citotoxicidad observada con CBD a altas concentraciones. Si bien estos resultados destacan la importancia del vehículo en la eficacia y seguridad del CBD, se requieren estudios *in vivo* y la evaluación de vías de administración más directas para optimizar su biodisponibilidad cerebral y maximizar sus efectos neuroprotectores.

2. Hipótesis

Basados en los antecedentes generales y particulares planteados, la hipótesis de este trabajo es que la administración intranasal de CBD vehiculado en MCT constituye una estrategia eficaz para optimizar su disponibilidad cerebral.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Estudiar la distribución cerebral y el perfil temporal de CBD tras su administración intranasal aguda vehiculado en MCT. De manera complementaria, se evaluarán sus niveles en plasma e hígado.

3.2. Objetivos específicos

1. Optimizar la metodología para identificar y cuantificar los niveles de CBD en tejido cerebral, plasma e hígado mediante cromatografía líquida de alta performance con detección por espectrometría de masa (UHPLC-MS).
2. Determinar el curso temporal de las concentraciones de CBD en diferentes regiones cerebrales luego de su administración intranasal aguda en MCT.
3. Determinar el curso temporal de las concentraciones de CBD en plasma e hígado luego de su administración intranasal aguda en MCT.

4. Materiales y métodos

4.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* adultas de 2-3 meses de edad (350-450 g) provenientes del Bioterio del IIBCE. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y ciclos de luz-oscuridad (7:00 AM - 7:00 PM), alimentación (*LabDiet*®) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos de experimentación animal fueron llevados a cabo siguiendo los

requerimientos del Comité en el Uso de Animales del IIBCE (procedimiento experimental: 005/05/2023) bajo las regulaciones nacionales sobre experimentación animal (Ley Nacional de Experimentación Animal No. 18.611).

4.2. Drogas

CBD y THC (95% pureza) fueron donados por *Phytoplant Research* (www.phytoplantresearch.com/es). MCT donado por *RAMM Pharma Corp* (www.wearerammpharma.com). CBD fue preparado en MCT con una concentración final de 10 mg en 30 μ L. Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su administración y se mantuvieron protegidas de la luz para evitar su degradación.

4.3. Grupos experimentales

Se realizaron cuatro grupos experimentales: un grupo control que recibió solo MCT y fue evaluado a los 30 minutos luego de su administración, y tres grupos que recibieron CBD vehiculizado en MCT, con diferentes tiempos de sacrificio. Se siguió el diseño experimental descrito en la *Figura 10*. Así, los grupos experimentales fueron los siguientes:

1. Grupo 1: Control MCT sacrificados a los 30 minutos (T30).
2. Grupo 2: CBD-MCT sacrificados a los 30 minutos (T30).
3. Grupo 3: CBD-MCT sacrificados a los 60 minutos (T60).
4. Grupo 4: CBD-MCT sacrificados a los 90 minutos (T90).

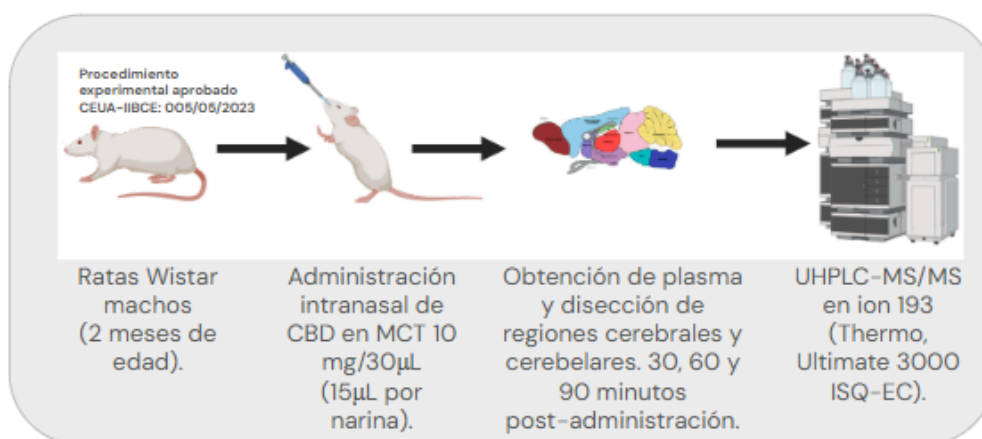


Figura 10: Diseño experimental para estudiar la distribución cerebral de CBD vehiculizado en MCT administrado por vía intranasal.

4.4. Administración intranasal y obtención de muestras

Para la administración intranasal, los animales fueron colocados en posición dorso-ventral reclinados hacia atrás (ángulo de aproximadamente 45°). El CBD en MCT 10 mg/30 µL fue goteado en las narinas con pausas en el goteo para permitir su correcta inhalación antes de la siguiente gota hasta llegar a 15 µL por narina. Para la administración se utilizó una micropipeta de 20 µL evitando el contacto con la mucosa intranasal. El volumen total administrado fue de 30 µL por rata, resultando en una administración de 30mg/Kg de CBD en promedio. La administración intranasal fue realizada siempre entre las 9:00 y 12:00 hrs.

Luego de transcurridos los diferentes tiempos post administración intranasal las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se extrajo la sangre del tronco para la posterior obtención del plasma. El plasma se obtuvo utilizando EDTA (0,1M; pH 8) como anticoagulante y centrifugando durante 15 minutos a 4000 g a 4°C (*Thermo centrifuge RT1*).

Además, se extrajo el cerebro del cual se disecaron las siguientes regiones: bulbo olfatorio, corteza frontal, cuerpo estriado, hipocampo, y cerebelo. También se disecó el hígado. Posteriormente todas las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

4.5. Puesta a punto y cuantificación de CBD en muestras biológicas

4.5.1. Condiciones cromatográficas

La cuantificación de CBD se realizó mediante UHPLC-MS, utilizando un equipo *Thermo Ultimate 3000*, disponible en la Plataforma de Química Analítica del IIBCE. La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna *Kinetex* 2,6 μm ; C18; 100 Å; 100*2,1 mm con pre columna. El análisis se desarrolló en modo isocrático con una fase móvil compuesta por agua (0,1% ácido fórmico) y acetonitrilo (0,1% ácido fórmico) en proporción 30:70, a un flujo de 0,3 mL/min por 10 minutos. La temperatura del horno de columna fue fijada a 45°C, y la del inyector automático se mantuvo en 4°C. El volumen de inyección fue de 70 μL . La detección se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas ISQ-EC Thermo, equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modo de ionización positiva. Se monitorizaron los iones con m/z 315 y 193, con una energía de colisión de 40 eV. Las condiciones de operación fueron: temperatura del vaporizador 350 °C, temperatura del *ion transfer* 300 °C, voltaje de la fuente de iones positivos 3000 V, presión del gas auxiliar 5,7 psig, presión de gas envolvente 49,9 psig y presión del gas de barrido 0,5 psig.

4.5.2. Curvas de calibración

Se construyeron curvas de calibración para CBD y THC, este último empleado como estándar interno. Dado que estos cannabinoides comparten no solo su fórmula química ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$) y su peso molecular (314,464 g/mol), sino que varias otras propiedades fisicoquímicas [65], fue posible realizar el análisis cuantitativo siguiendo sus iones característicos principales: ion precursor m/z 315 y la señal de transición m/z 193. La diferenciación de las moléculas fue posible gracias a sus distintos tiempos de retención en el sistema cromatográfico UHPLC-MS. Las curvas se generaron utilizando soluciones estándar de

CBD y THC disueltas en una mezcla acetonitrilo:agua (40:60, v/v), abarcando un rango de concentraciones adecuado para el análisis de muestras biológicas.

4.5.3. Preparación de las muestras

Las muestras fueron procesadas mediante una combinación de precipitación proteica y extracción líquido-líquido [48, 66]. Los tejidos fueron pesados utilizando una balanza analítica de alta precisión (*KERN ABT 220-4NM*). Para el hígado y cerebelo se masaron entre 300-400 mg de tejido, mientras que para las regiones más pequeñas del cerebro (hipocampo, bulbo olfatorio, cuerpo estriado y corteza frontal) se masaron entre 50-100 mg, siendo esta la totalidad de los respectivos tejidos.

Para la precipitación proteica, primero se añadió acetonitrilo (ACN) frío a -20°C (300 o 600 µL, según el peso del tejido) junto con 15 µL de THC 0,004 mM y se agitó en *vortex* durante 1 minuto. Posteriormente se agregaron las mismas cantidades de H₂O bidestilada, seguido de 1 minuto de agitación en *vortex*. Las muestras fueron sonicadas (*VC 505*, amplitud 40%, 30 sec on/off, duración 2:30 min) con el objetivo de lograr una adecuada disgregación tisular, favorecer la precipitación proteica y dar inicio al proceso de extracción líquido-líquido. Luego, las muestras siguieron un proceso de homogeneización y equilibración durante 1 hora utilizando un agitador recíproco de tubos a una temperatura controlada de 4°C. Para aislar el sobrenadante, fracción que contiene los analitos de interés, las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 1160 g y 10°C (*Thermo centrifuge RT1*). Para la fase final de la extracción líquido-líquido se utilizó n-hexano como solvente orgánico, dada su capacidad lipofílica para solubilizar compuestos como los cannabinoides. Según el peso de los tejidos, se utilizaron 1,5 o 3 mL de solvente n-hexano. Los tubos fueron agitados en *vortex* durante 5 minutos, posteriormente centrifugados durante 15 minutos a 1160 g a 10°C. La fase orgánica superior fue cuidadosamente extraída utilizando pipetas Pasteur de vidrio.

Finalmente, las muestras fueron llevadas a sequedad mediante la eliminación del solvente utilizando *speedvac* a 35°C (*Labconco CentriVap Concentrator*).

Para la preparación de las muestras de plasma, se utilizó el mismo protocolo que para los tejidos, con algunas modificaciones. A 150 µL de plasma se le añadieron 600 µL de ACN, 15µL de THC 0,004 mM y 600 µL de misma cantidad de H₂O bidestilada. Posteriormente se procedió directamente a la extracción líquido-líquido, utilizando 3 mL de n-hexano, seguido de 5 minutos de agitación en *vortex*. Las muestras fueron luego centrifugadas (15 minutos a 1160 g, 10°C) y la fase orgánica fue separada y finalmente, el solvente fue eliminado mediante evaporación en *speedvac* a 35°C.

Para su análisis cromatográfico, todas las muestras fueron resuspendidas en 150 µL de una solución ACN:H₂O (60:40). De este volumen, se inyectaron 70 µL en el UHPLC-MS.

4.5.4. Validación del método de extracción

Para validar el protocolo de extracción de CBD de las muestras y optimizar las condiciones cromatográficas se realizaron pruebas de recuperación en matrices biológicas (plasma, hígado, cerebro) no tratadas, a las cuales se les adicionaron concentraciones conocidas de CBD y THC (10 µg/mL, 15 µL de 0,004 mM). Se procesaron como se describe en el numeral 4.5.3 del índice, incluyendo controles negativos, permitiendo verificar la eficiencia de extracción y la ausencia de interferencias de matriz.

4.6. Análisis de datos

Las concentraciones de CBD en las distintas muestras biológicas fueron calculadas teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación del THC en cada muestra individual. Para el análisis estadístico de los datos y su correspondiente graficación, se utilizó el programa *GraphPad Prism 10* (GraphPad Prism versión 10.4.1 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com). Las concentraciones cerebrales, plasmáticas y hepáticas de CBD están

presentadas como media \pm SEM. Los datos se analizaron utilizando análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiple *Tukey*.

5. Resultados

5.1. Puesta a punto

5.1.1. Curvas de calibración

Las Figuras 11 y 12 muestran las curvas de calibración para CBD y THC obtenidas mediante el monitoreo de sus iones característicos: ion precursor m/z 315 y su señal de transición m/z 315 \rightarrow 193, respectivamente. Las Figuras 13 y 14 muestran los cromatogramas característicos y sus respectivos espectros de masa para los estándares 0,4 μ M de CBD y THC para el ion precursor m/z 315 y su transición m/z 315 \rightarrow 193, respectivamente. Los tiempos de retención (TR) fueron 3,1 para el CBD y 4,9 para el THC, siendo posible cuantificarlos simultáneamente. En ambos casos se obtuvo una excelente linealidad en el rango de concentraciones evaluado (0,025 a 1,5 μ M para CBD y 0,032 a 2 μ M para THC), con coeficientes de correlación (R^2) iguales a 1, lo que confirma la robustez y precisión del método analítico.

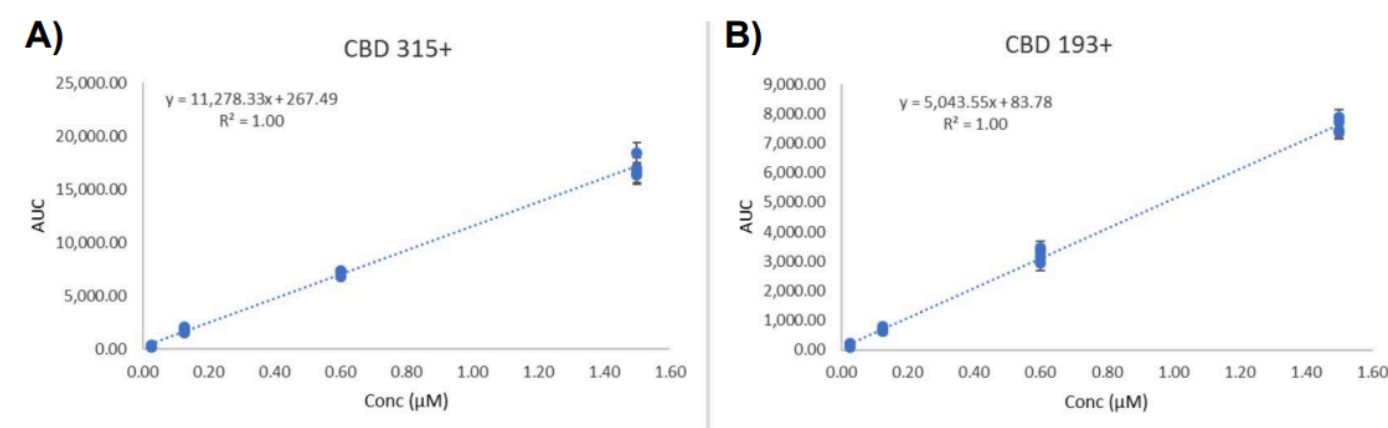


Figura 11: Curvas de calibración del CBD correspondientes al ion precursor m/z 315 (A) y su señal de transición m/z 315 \rightarrow 193 (B).

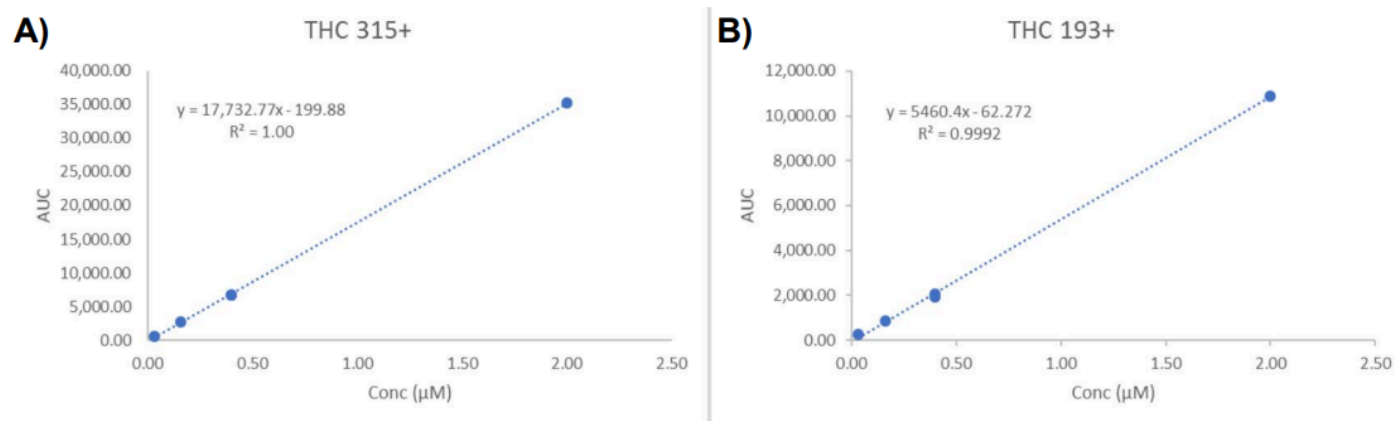


Figura 12: Curvas de calibración de THC correspondientes al ion precursor m/z 315 **(A)** y su señal de transición m/z 315 → 193 **(B)**.

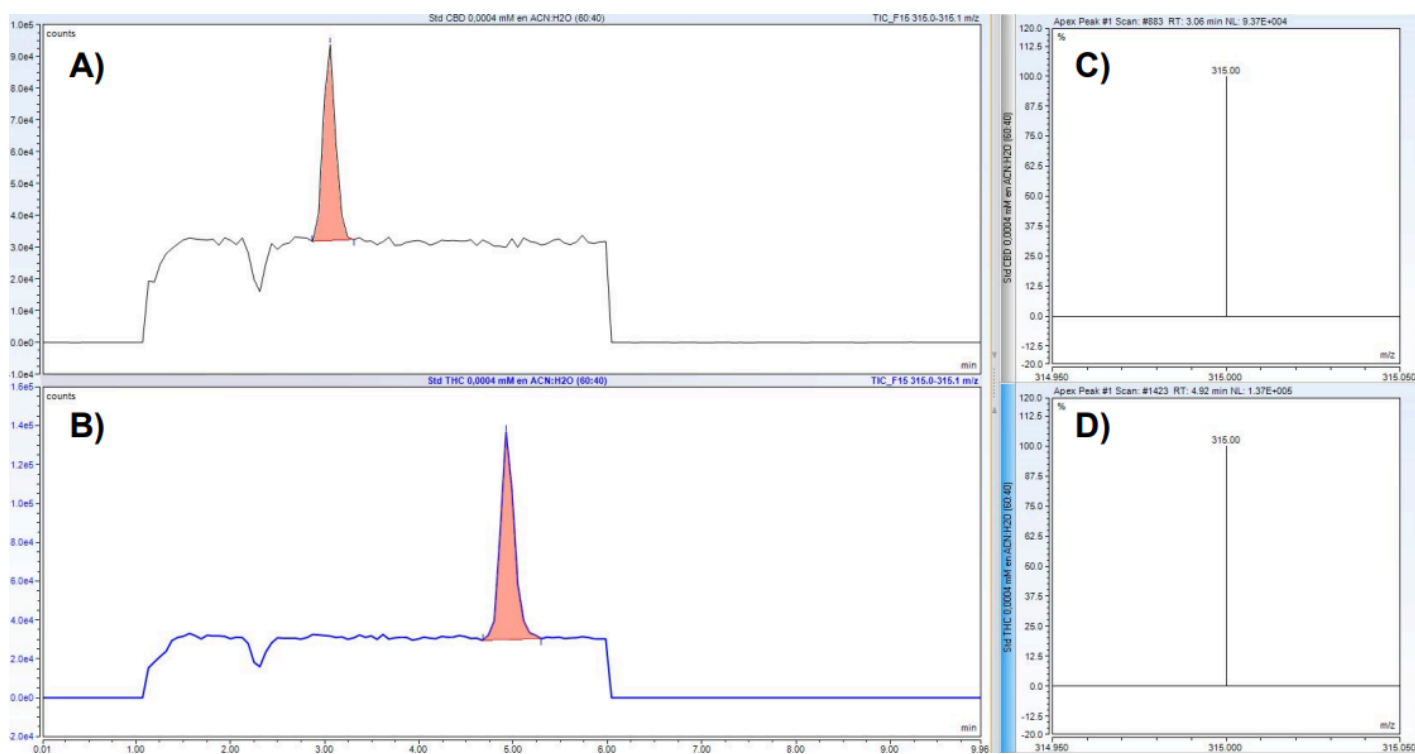


Figura 13: Cromatogramas **(A y B)** y espectros de masa en el ion precursor m/z 315 **(C y D)** de estándares 0,4 μM de CBD **(A y C)** y de THC **(B y D)**.

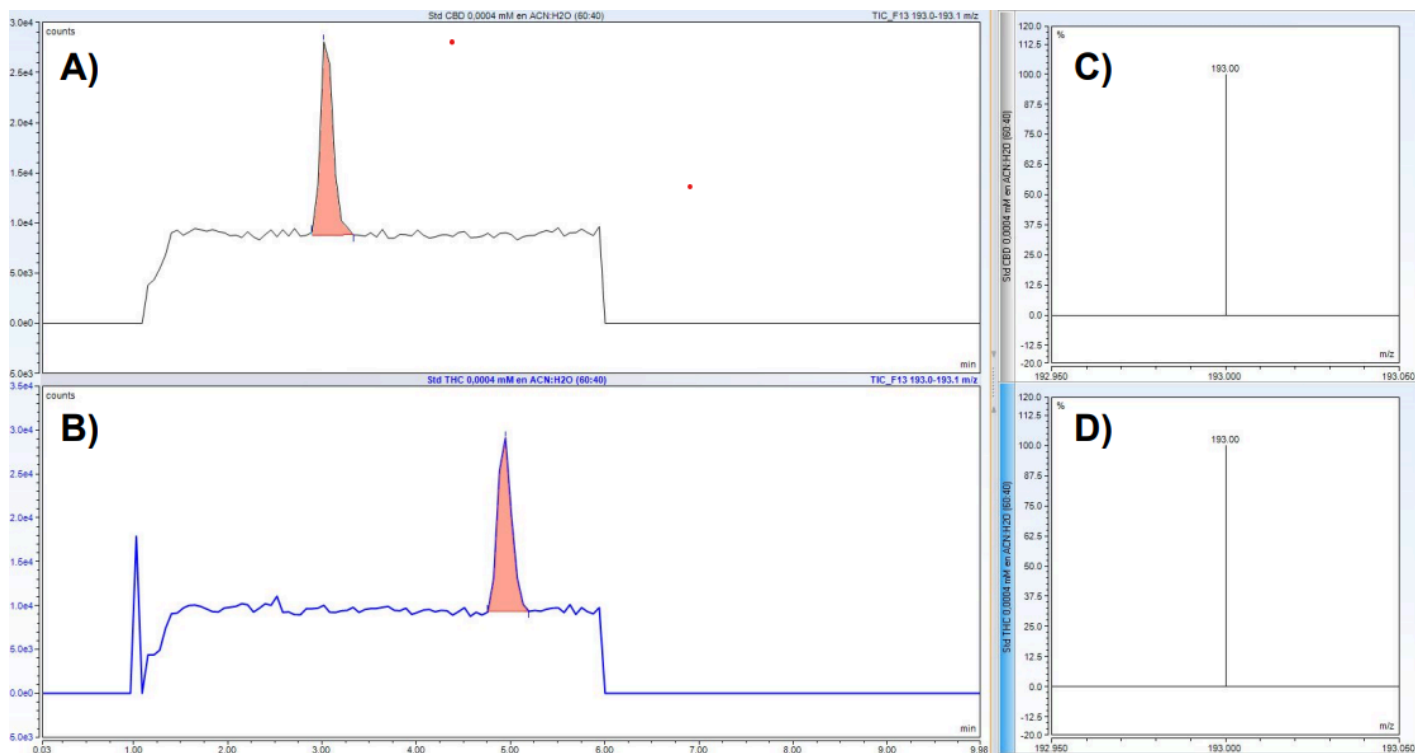


Figura 14: Cromatogramas (**A y B**) y espectros de masa de la transición m/z 315 \rightarrow 193 (**C y D**) de estándares 0,4 μ M de CBD (**A y C**) y de THC (**B y D**).

5.1.2. Validación del método de extracción

Durante la validación del método de extracción de CBD en muestras biológicas, se identificó en las muestras controles (administradas únicamente con MCT), una interferencia en el canal correspondiente al ion precursor m/z 315 en el mismo TR que CBD (*Figura 15, B y D*). En cambio, en el canal correspondiente a la transición m/z 315 \rightarrow 193, no se observó interferencia alguna en el TR de CBD para estas mismas muestras (*Figura 16, B y D*). Las *Figuras 15 y 16* muestran, a modo representativo, una comparación de cromatogramas y espectros de masa en el ion precursor m/z 315 y su señal de transición m/z 315 \rightarrow 193, respectivamente, de una muestra T30 de bulbo olfatorio A) de una rata tratada con CBD y B) de una rata control. En función de estos resultados, se decidió cuantificar los niveles de CBD en los diferentes grupos experimentales únicamente en el canal de la

transición m/z 315 \rightarrow 193. Para el THC, utilizado como estándar interno, se decidió realizar su cuantificación mediante el ion precursor m/z 315, ya que en la señal de transición m/z 315 \rightarrow 193 se obtenía un porcentaje de recuperación superior al 100%.

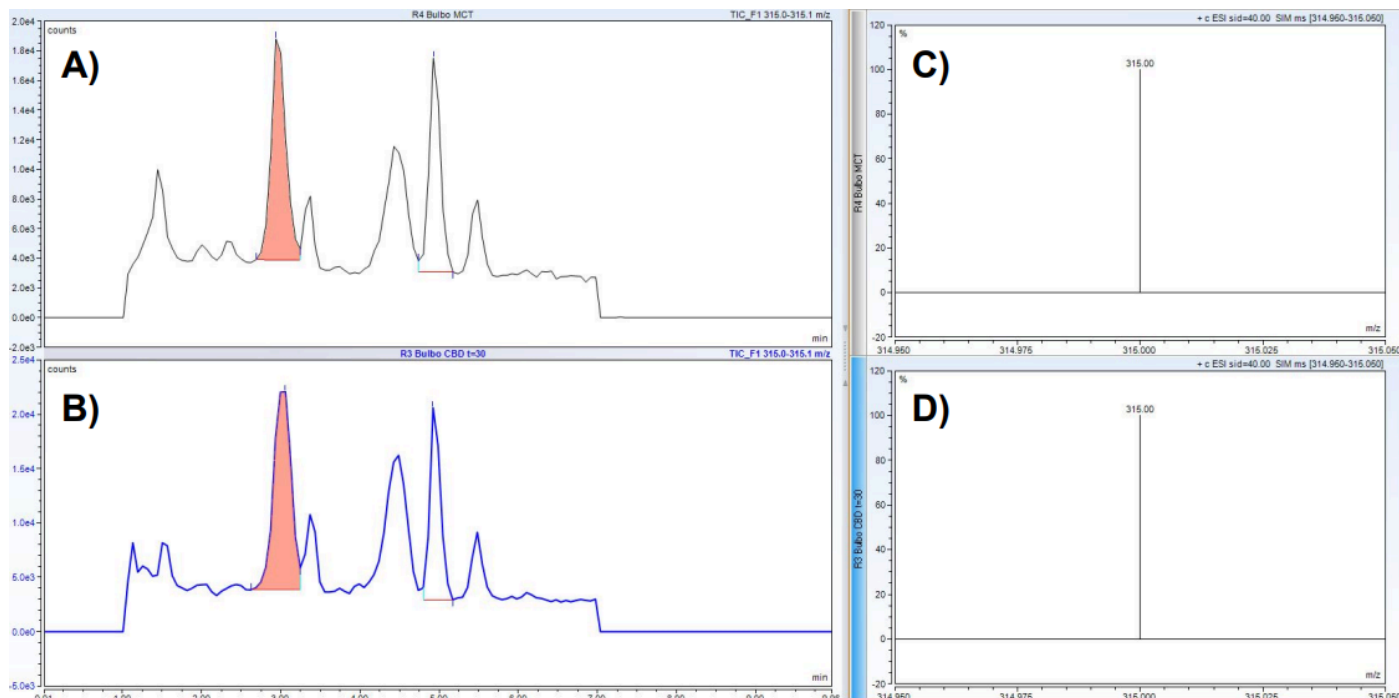


Figura 15: Cromatogramas (**A y B**) y espectros de masa en el ion precursor m/z 315 (**C y D**) de una muestra de bulbo olfatorio de: (**A y C**) una rata control y (**B y D**) del grupo experimental T30 de una rata tratada con CBD (pico coloreado).

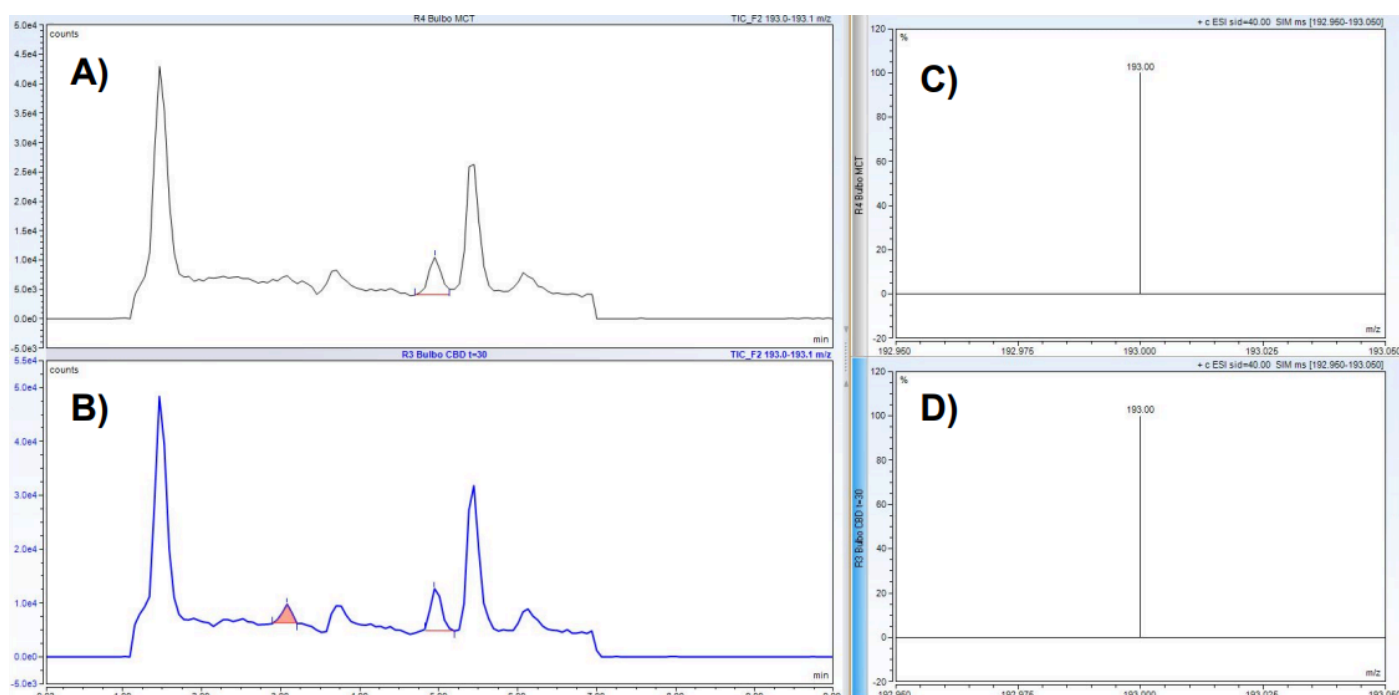


Figura 16: Cromatogramas **(A y B)** y espectros de masa en la transición m/z 315 \rightarrow 193 **(C y D)** de una muestra de bulbo olfatorio de: **(A y C)** una rata control y **(B y D)** del grupo experimental T30 de una rata tratada con CBD (pico coloreado).

5.2. Niveles de CBD en cerebro

La *Figura 17* muestra las concentraciones de CBD cuantificadas a los diferentes tiempos luego de su administración aguda intranasal para cada una de las regiones encefálicas analizadas. Las gráficas están organizadas desde las regiones más anteriores hasta las más posteriores: (A) bulbo olfatorio, (B) corteza frontal (C), cuerpo estriado, (D) hipocampo y (E) cerebelo. La *Figura 18* y *19* muestran un cromatograma y espectro de masa de CBD de la transición m/z 315 \rightarrow 193 representativo en una muestra de bulbo olfatorio del grupo experimental T30 y de una muestra control, respectivamente.

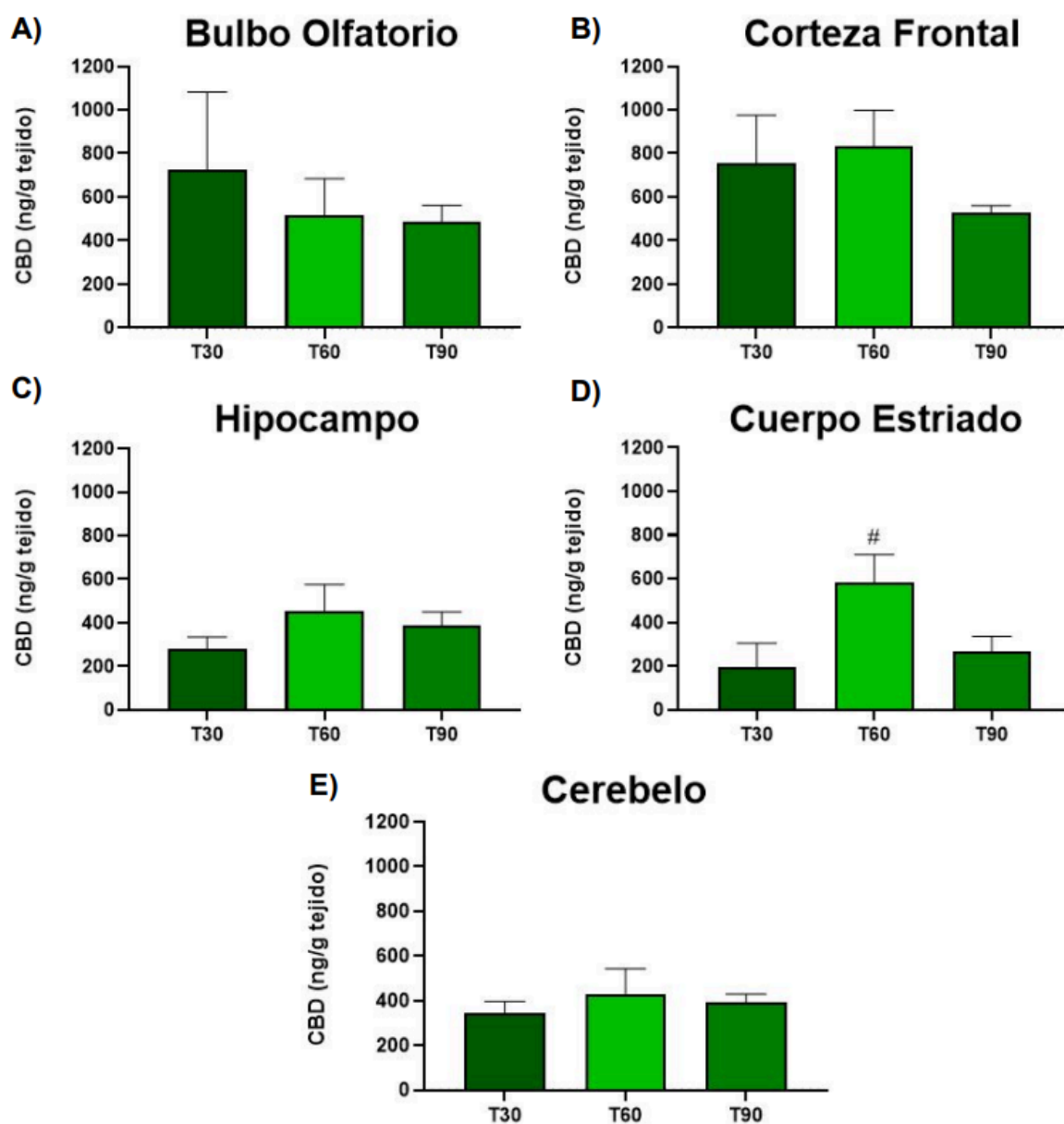


Figura 17: A) - E) Concentración de CBD en ng / mg en las regiones encefálicas evaluadas a los 30 (T30), 60 (T60) y 90 (T90) minutos luego de su administración intranasal aguda. Media \pm SEM. # $p < 0.05$. *One-way ANOVA* seguido del test de comparaciones múltiple *Tukey*. # vs T30.

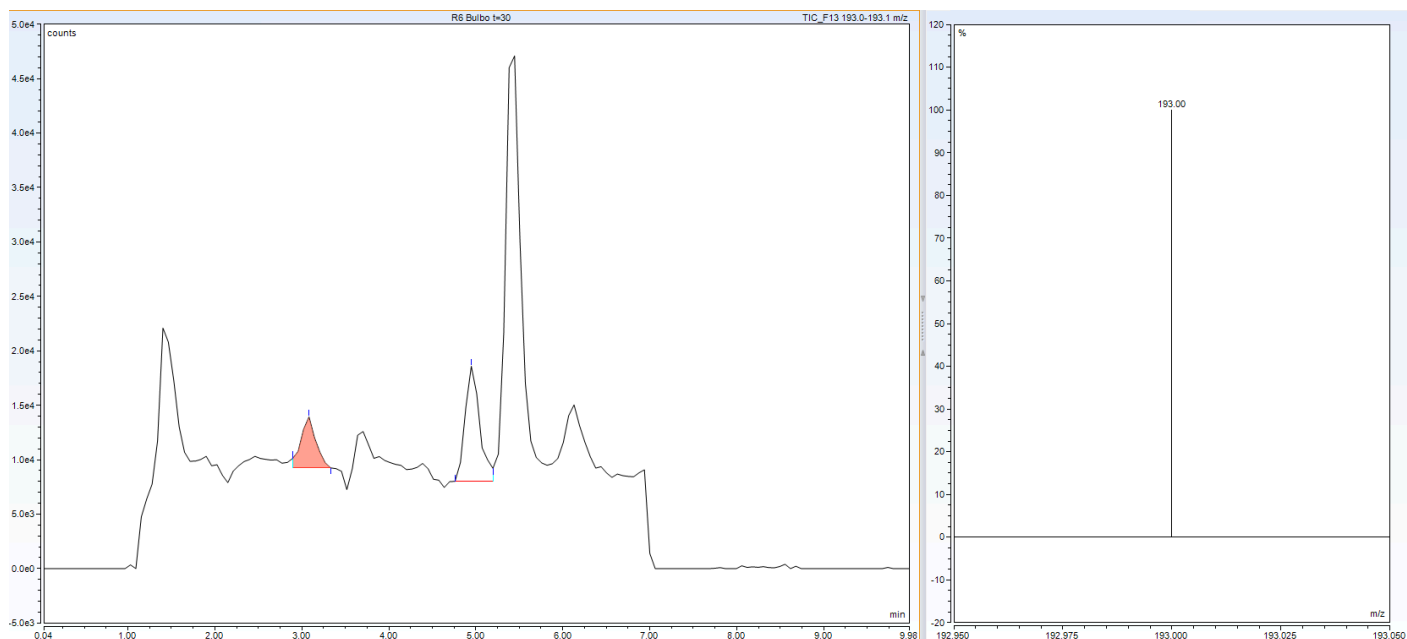


Figura 18: Cromatograma representativo y espectro de masa de CBD (pico coloreado) de la transición m/z 315 \rightarrow 193 de muestra de bulbo olfatorio del grupo experimental T60.

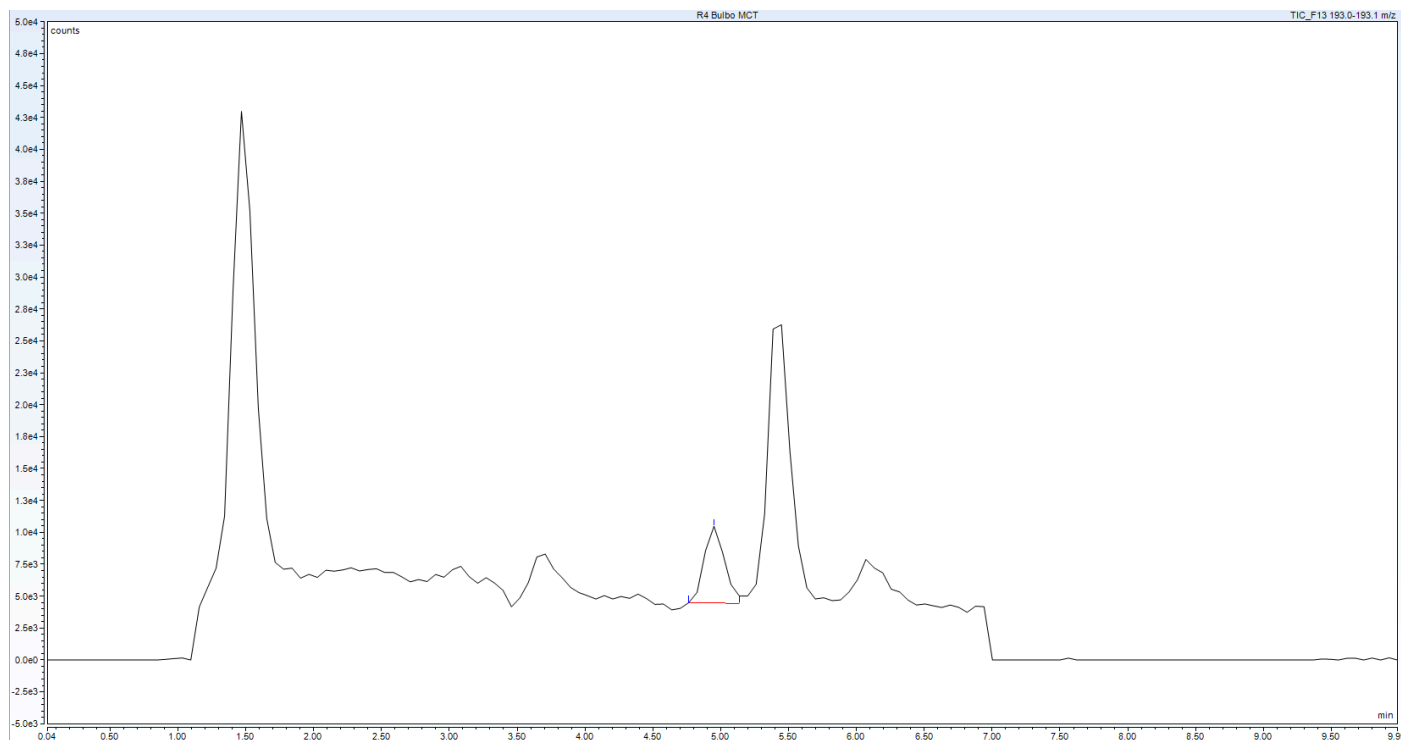


Figura 19: Cromatograma representativo de CBD de la transición m/z 315 \rightarrow 193 de muestra de bulbo olfatorio del grupo experimental control.

En el grupo control tratado únicamente con MCT, no se detectaron niveles de CBD (*Figura 19*), mientras que en los grupos experimentales tratados con CBD se detectaron niveles cuantificables de CBD en todas las regiones y tiempos ensayados. Las concentraciones más elevadas se registraron en las regiones anteriores del encéfalo, disminuyendo progresivamente hacia las regiones más posteriores a lo largo del eje anteroposterior.

En el bulbo olfatorio (*Figura 17A*) se registró la concentración máxima (Cmax) de CBD a los 30 minutos post-administración (T30), con un valor de 726 ng/g de tejido. Las concentraciones disminuyeron progresivamente en los tiempos posteriores, alcanzando un valor mínimo de 486 ng/g en T90, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos evaluados. En la corteza frontal (*Figura 17B*), se observó una Cmax de 833 ng/g de tejido a los 60 min post administración (T60). Si bien la concentración de CBD disminuyó en T90, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tiempos evaluados.

En el cuerpo estriado (*Figura 17C*), la Cmax también se alcanzó a los T60, con un valor de 581 ng/g de tejido. En esta región se observó una diferencia significativa entre los tiempos de ensayo T60 y T30, siendo la concentración del último de 195 ng/g de tejido. La concentración volvió a disminuir en el tiempo de ensayo T90. El hipocampo (*Figura 17D*) presentó su Cmax en el tiempo de ensayo T60, con un valor de 456 ng/g de tejido. No se registraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos evaluados. Finalmente, en el cerebelo (*Figura 17E*), la Cmax también se observó en el tiempo de ensayo T60, con un valor de 431 ng/g de tejido. Las concentraciones en esta región fueron muy similares entre los diferentes tiempos de ensayo, sin diferencias significativas entre ellas.

5.3. Niveles de CBD en plasma

En el caso del plasma (*Figura 20*), la Cmax de CBD se registró al T30, con un valor de 423 ng/g de tejido. Las concentraciones de CBD disminuyeron progresivamente con el tiempo, observándose una diferencia significativa únicamente entre los tiempos T30 y T90. Un ejemplo representativo de

cromatograma y espectro de masa de CBD de la transición m/z 315 \rightarrow 193 en una muestra de plasma del grupo experimental T30 se muestran en la *Figura 21*.

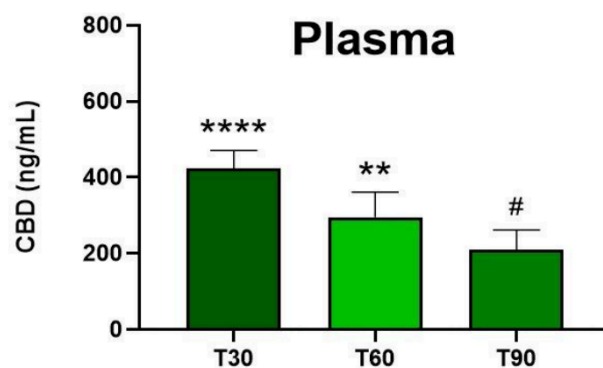


Figura 20: Concentración de CBD en ng / mL de plasma evaluada 30 (T30), 60 (T60) y 90 (T90) minutos luego de su administración intranasal aguda. Media \pm SEM. # $p < 0.05$. *One-way ANOVA* seguido del test de comparaciones múltiple *Tukey*. # vs T30.

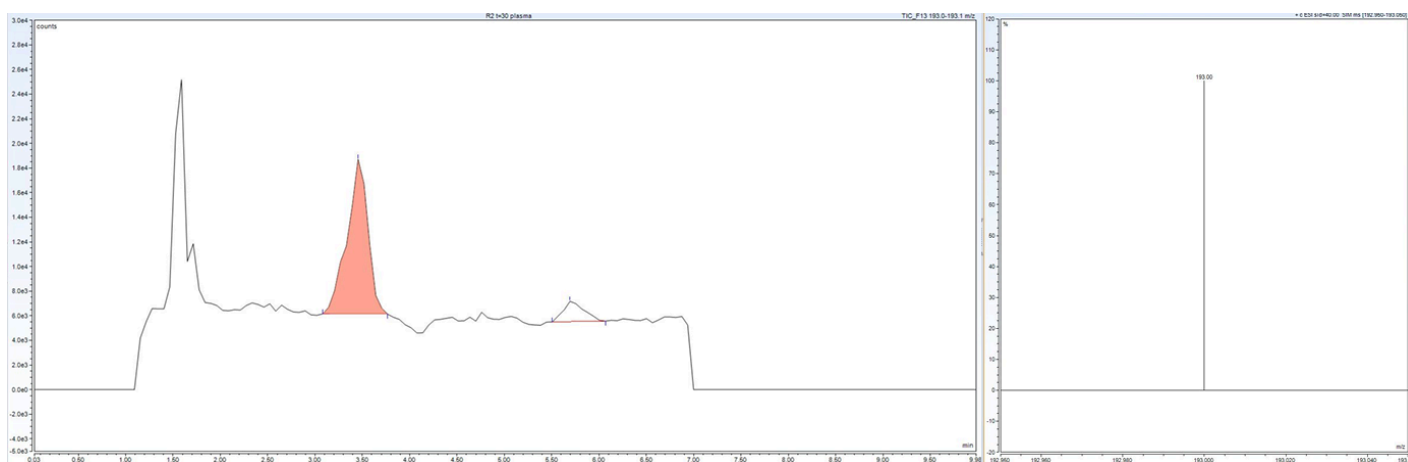


Figura 21: Cromatograma y espectro de masa de CBD (pico coloreado) de la transición m/z 315 \rightarrow 193 de muestra de plasma del grupo experimental T30.

5.4. Niveles de CBD en hígado

En el caso de las muestras de hígado (*Figura 22*), la Cmax de CBD se registró al T60, con un valor de 5141 ng/g de tejido. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones correspondientes a los distintos tiempos de ensayo. Un ejemplo representativo del cromatograma y espectro de masa de CBD de la transición m/z 315 \rightarrow 193 en una muestra de hígado del grupo experimental T60 se presenta en la *Figura 23*.

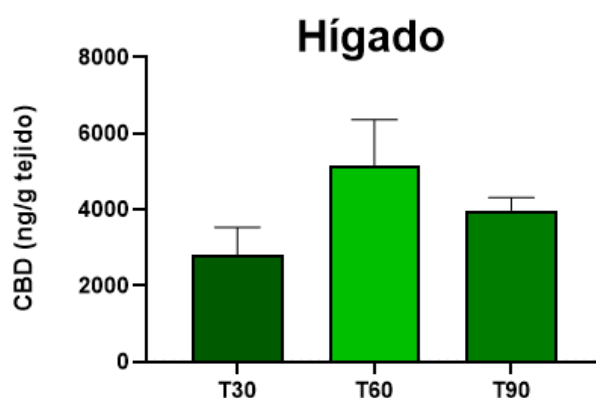


Figura 22: Concentración de CBD en ng / mg de hígado evaluado 30 (T30), 60 (T60) y 90 (T90) minutos luego de su administración intranasal aguda. Media \pm SEM. # $p < 0.05$. *One-way ANOVA* seguido del test de comparaciones múltiple *Tukey*. # vs T30.

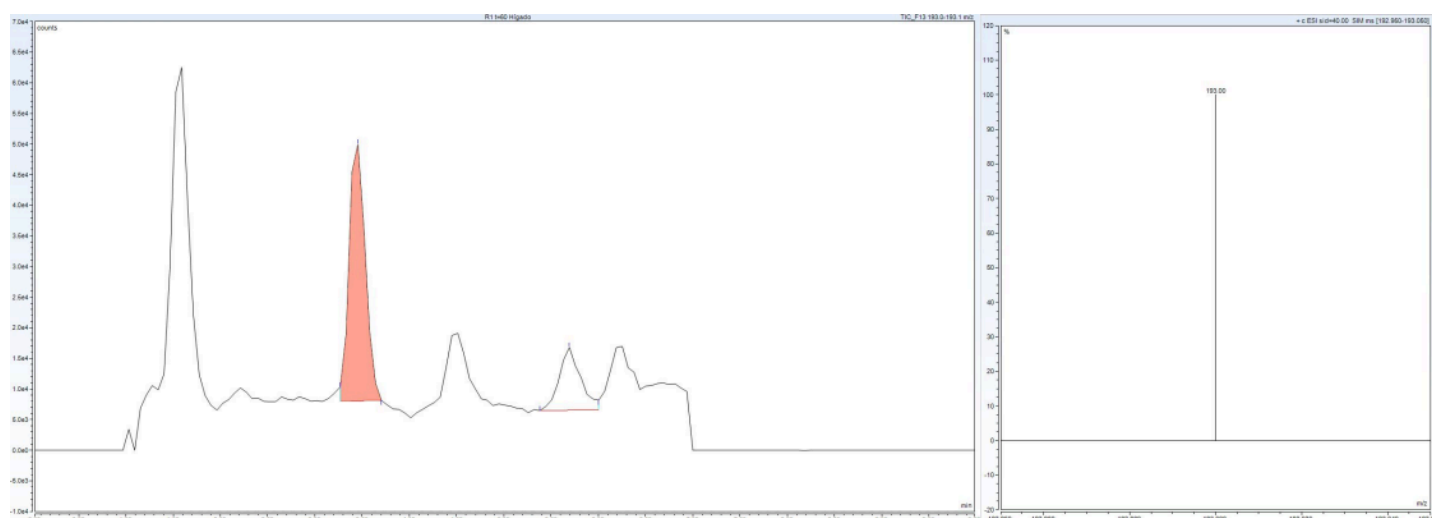


Figura 23: Cromatograma y espectro de masa de CBD (pico coloreado) de la transición m/z 315 \rightarrow 193 de muestra de hígado del grupo experimental T60.

6. Discusión

En este trabajo se logró optimizar un procedimiento reproducible y de fácil implementación en laboratorios de rutina para la cuantificación de CBD en tejido cerebral mediante UHPLC-MS. Mediante este procedimiento basado en precipitación proteica seguido de extracción líquido-líquido hemos podido realizar un análisis de los niveles de CBD y de su perfil temporal en diferentes regiones cerebrales, así como también en plasma e hígado [48, 66].

En el proceso de optimización, la complejidad de la matriz cerebral determinó que en la señal del ión precursor de mayor abundancia del CBD (m/z 315) observáramos interferencias de matriz que impedían su uso fiable para su cuantificación. Debido a ello, la cuantificación se realizó empleando la señal del ion de transición m/z 315 \rightarrow 193, que mostró no tener interferencia y permitió obtener respuestas cuantificables en las muestras cerebrales analizadas. Si bien utilizar una sola transición puede implicar menor especificidad que confirmar con múltiples iones, en nuestro caso fue suficiente para discriminar la señal de CBD frente a los blancos de matriz y para cuantificar de forma fiable sus concentraciones en las muestras analizadas. Este aspecto es especialmente relevante, ya que el objetivo principal era confirmar la llegada de CBD al tejido cerebral y contar con una herramienta para comparar niveles entre grupos experimentales. Si bien existen trabajos recientes que han cuantificado CBD en cerebro de ratón utilizando protocolos de extracción similares, en dichos estudios no se detallan las condiciones analíticas empleadas para la cuantificación, lo que limita la posibilidad de establecer comparaciones directas [53, 54].

El análisis de las concentraciones de CBD en cerebro mostró un patrón de perfil temporal distinto en las diferentes regiones cerebrales. En farmacocinética, la evolución temporal de la concentración de un fármaco en un tejido determinado suele seguir un perfil clásico que incluye tres fases principales: absorción, distribución y eliminación. La fase de absorción corresponde al ingreso

del compuesto desde su sitio de administración a los compartimentos biológicos. Luego, en la fase de distribución, el fármaco se dispersa a sus tejidos diana a través de la circulación plasmática, linfática o cefalorraquídea. Finalmente, la fase de eliminación refleja la disminución de la concentración del compuesto debido a procesos metabólicos y excretores [67]. La caracterización de estas fases en las diferentes regiones encefálicas permite comprender mejor la dinámica de disponibilidad cerebral de CBD tras su administración intranasal. En el bulbo olfatorio, región más cercana al sitio de administración intranasal, la C_{max} de CBD se alcanzó a T30, sin que fuera posible registrar la fase inicial de absorción. Estudios previos en modelos animales han descrito un ascenso rápido en regiones perinasales, con concentraciones detectables en el SNC en tan solo 5 minutos post administración intranasal [56]. En particular, investigaciones utilizando albúmina como marcador han mostrado que, tras su administración intranasal, las concentraciones máximas se alcanzan a los 10 minutos en el bulbo olfatorio [58]. En nuestros resultados, la disminución progresiva a tiempos posteriores sugiere que a T30 la absorción ya estaba completa en esta región, predominando las fases de distribución y eliminación.

En la corteza frontal, las concentraciones máximas se alcanzaron entre los 30 y 60 minutos con valores apenas superiores a los de T30, lo que indica que en esta región se estaba completando la fase de absorción. Este retraso respecto al bulbo olfatorio coincide con la idea de una progresión de CBD a través de rutas perineurales y vasculares desde el sitio de aplicación hacia áreas corticales, fenómeno también descrito en otros compuestos lipofílicos administrados por vía intranasal [68, 69]. Estos resultados sugieren que, dado el comportamiento observado, resultaría interesante incluir un tiempo de muestreo más temprano, como por ejemplo a los 15 minutos, para caracterizar mejor la fase inicial de absorción en estas regiones y obtener una descripción más completa del perfil farmacocinético de CBD intranasal.

A diferencia de lo observado en las regiones anteriores, en las regiones mediales como cuerpo estriado e hipocampo, la curva farmacocinética adoptó una forma más clásica: fase de absorción evidente en T30, incremento de concentraciones hasta T60 (C_{max}, 2–3 veces mayor) y

posterior disminución en T90 atribuible a la eliminación y redistribución tisular. En el cerebelo, la región más posterior analizada, las concentraciones siguieron la tendencia de alcanzar la Cmax en T60, aunque las diferencias entre tiempos fueron menos marcadas.

Otro resultado a destacar de esta investigación fue la disminución progresiva de las concentraciones de CBD desde regiones anteriores hacia posteriores, evidenciando un gradiente desde la zona de administración hasta las áreas distales. En las regiones anteriores, las Cmax superaron los 800 ng/g de tejido, mientras que en regiones mediales (como el hipocampo) y posteriores (como el cerebelo) los valores se situaron entre 400 y 500 ng/g de tejido. Este patrón coincide con lo descrito en la literatura para la administración intranasal de otros compuestos, donde la combinación de las vías directa e indirecta de acceso al cerebro determina la distribución observada (*Figura 6A*). La vía indirecta implica que el fármaco pase a la circulación a través del epitelio respiratorio nasal o pulmonar antes de ingresar al SNC lo cual puede conllevar metabolismo sistémico y la necesidad de atravesar la barrera hematoencefálica [56, 61]. En contraste, la vía directa permite un acceso rápido al bulbo olfatorio a través de la región olfatoria, independientemente del mecanismo de internalización del compuesto, lo que explica las concentraciones elevadas registradas a pocos minutos de la administración. En regiones más distales, la llegada del compuesto puede demorarse entre 30–120 minutos, lo que explica que las concentraciones medidas hayan sido menores debido a la retención en zonas anteriores o a la redistribución sistémica de CBD.

En la bibliografía consultada, se encontró un único estudio que evaluó la disponibilidad de CBD en diferentes regiones cerebrales. Upadhyay et al. (2025) analizaron una nanorformulación de CBD administrada intranasalmente en ratones (182 mg/kg), observando concentraciones máximas en regiones anteriores como el bulbo olfatorio y un descenso progresivo hacia regiones posteriores, en concordancia con nuestros resultados [54]. Sin embargo, las concentraciones reportadas fueron significativamente mayores (3445 ± 977 ng/mg en el bulbo olfatorio) que las obtenidas en nuestro estudio, lo que probablemente se explique por la dosis empleada, aproximadamente seis veces superior a la utilizada por nosotros. Además, aunque confirmaron el mismo gradiente de

concentración anterior-posterior, reportaron un T_{max} relativamente prolongado (2 horas en el bulbo olfatorio) pese a la vía intranasal, lo que podría atribuirse a la formulación empleada, capaz de favorecer una liberación más controlada del compuesto. [54]. Estos hallazgos resaltan la influencia de la dosis y la formulación en los perfiles de distribución, al tiempo que confirman la reproducibilidad del gradiente de concentración tras la administración intranasal de CBD en diferentes contextos.

Por otro lado, existen estudios que reportan concentraciones de CBD a nivel de cerebro total, mostrando resultados en línea con los nuestros. Por ejemplo, Pang et al. (2021) informaron una C_{max} en cerebro de 647 ng/mL tras administración intranasal de CBD vehiculizado en hidrogeles en ratones (30 mg/kg, misma dosis utilizada en nuestro estudio) con un T_{max} similar al observado en nuestro trabajo (≈38 min). Dicho estudio mostró además que la administración por vía oral alcanzó sólo una C_{max} de 273 ng/mL y un T_{max} de 1h, destacando así la ventaja de la vía intranasal para la entrega directa del compuesto al encéfalo a través de rutas *nose-to-brain* [52]. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la vía intranasal ofrece una estrategia más eficiente para optimizar la distribución cerebral de CBD.

Un aspecto crítico también a considerar en la disponibilidad de CBD es el vehículo de formulación, ya que este puede influir significativamente en su absorción y distribución. Bartkowiak-Wieczorek et al. (2023) estudiaron cómo distintos vehículos (*Rapae Oleum* o *Cremophor*) afectan la biodisponibilidad de CBD oral (30 mg/kg), analizando el cerebro completo. La C_{max} con *Rapae Oleum* fue 301.388 ± 155.739 ng/g a las 2 h, mientras que con *Cremophor* fue 274.994 ± 103.691 ng/g a los 30 min [48]. En comparación, los valores obtenidos en nuestro trabajo fueron más elevados (400–800 ng/g según la región). Esta diferencia refuerza el potencial del MCT como vehículo para la distribución cerebral de CBD. No obstante, debe tenerse en cuenta que se trata de diferentes vías de administración, lo que hace necesarios futuros estudios de disponibilidad cerebral con MCT por vía oral.

Por último, en nuestro estudio, los niveles y el perfil temporal de CBD en plasma e hígado mostraron una absorción rápida y una eliminación progresiva. En plasma, la Cmax se alcanzó a los 30 min, mostrando un perfil típico de eliminación progresiva. Los valores obtenidos fueron comparables a los descritos para biodisponibilidad oral a igual dosis [48], aunque Pang et al. (2021) registraron niveles plasmáticos más altos tras administración intranasal en hidrogeles (1205 ± 471 ng/mL a 30 min) [52], posiblemente debido a la liberación controlada conferida por ese vehículo. En hígado, la curva mostró un perfil clásico, con concentraciones altas en comparación con otros tejidos, reflejando su papel en metabolismo y acumulación. Se observó una fase de absorción en T30, con valores casi duplicados en T60, y un descenso a T90 hasta ~ 4000 ng/g, atribuible al metabolismo hepático. Existen pocos estudios de biodisponibilidad hepática por vía intranasal. Pang et al. (2021) reportaron que el CBD intranasal en hidrogeles alcanzó 2088 ± 815 ng/g a 2,25 h, valores más bajos que los obtenidos en nuestro estudio [52]. El Tmax más tardío observado con hidrogeles podría explicarse por las características fisicoquímicas de este sistema mencionadas anteriormente, que favorecen una liberación controlada.

En conjunto, nuestros resultados aportan evidencia sobre la disponibilidad diferencial de CBD en distintas regiones cerebrales y destacan tanto al vehículo MCT como a la vía intranasal como factores clave para optimizar su llegada al sistema nervioso central.

7. Conclusiones

En esta tesis se optimizaron técnicas analíticas para cuantificar CBD en distintas regiones cerebrales, en plasma e hígado mediante UHPLC-MS, lo que permitió realizar un análisis temporal de sus concentraciones tras la administración intranasal. Se detectaron concentraciones relevantes en todas las regiones encefálicas, con una distribución diferencial que mostró mayores niveles en áreas anteriores como bulbo olfatorio y corteza frontal, sugiriendo una participación predominante de la vía directa hacia el sistema nervioso central.

Los resultados sugieren que el vehículo MCT podría favorecer la biodisponibilidad cerebral de CBD y respaldan el potencial de la vía intranasal como estrategia eficaz para optimizar su acceso al encéfalo en comparación con otras vías de administración. En conjunto, estos hallazgos aportan evidencia preclínica de relevancia para el diseño de aplicaciones terapéuticas de cannabinoides en patologías neurológicas.

8. Perspectivas

- Analizar tiempos más tempranos tras la administración intranasal para precisar con mayor detalle la fase de absorción.
- Comparar la biodisponibilidad de CBD vehiculizado en MCT por otras vías de administración (oral, intraperitoneal), a fin de profundizar en el rol de la vía de administración como factor crítico en la disponibilidad cerebral.
- Comparar la biodisponibilidad de CBD utilizando otros vehículos de formulación, para evaluar el impacto del MCT como factor clave en la disponibilidad cerebral.
- Evaluar la biodisponibilidad en hembras.

Referencias

- [1] Finn, D. P., Haroutounian, S., Hohmann, A. G., Krane, E., Soliman, N., & Rice, A. S. C. (2021). Cannabinoids, the endocannabinoid system, and pain: a review of preclinical studies. *Pain*, 162(Suppl 1), S5–S25. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002268>
- [2] Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & el Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. In *Plants* (Vol. 12, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>
- [3] Crocq, M. A. (2020). History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223–228. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/MCROCQ>
- [4] Appendino, G. (2020). The early history of cannabinoid research. *Rendiconti Lincei*, 31(4), 919–929. <https://doi.org/10.1007/s12210-020-00956-0>
- [5] Netzahualcoyotzi-Piedra, C., Muñoz-Arenas, G., Martínez-García, I., Florán-Garduño, B., & Limón-Pérez De León, D. (2009). La marihuana y el sistema endocanabinoide: De sus efectos recreativos a la terapéutica. In *Revista Biomédica* (Vol. 20, pp. 128-153)
- [6] Cristina Felipe Palencia. (2019). Potencial terapéutico del efecto neuroprotector del cannabidiol en el tratamiento de enfermedades neurológicas.
- [7] Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & el Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. In *Plants* (Vol. 12, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12061245>

- [8] Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: A unified critical inventory. In *Natural Product Reports* (Vol. 33, Issue 12, pp. 1357–1392). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6np00074f>
- [9] Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. In *Cannabinoids* (Vol. 1, Issue 1). www.cannabis-med.org
- [10] Suero-García, C., Martín-Banderas, L., Ángeles Holgado, M^a. (2015). Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades. In *Ars Pharm* (vol. 56). <https://dx.doi.org/10.4321/S2340-98942015000200002>
- [11] Hossain K.R., Alghalayini A., Valenzuela S.M. (2023). Current Challenges and Opportunities for Improved Cannabidiol Solubility. In *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms241914514.
- [12] Atance, J.A., & Ruiz, J.F. (2000). Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. In *Monografía Cannabis* (vol. 12).
- [13] Antonazzo, M., Botta, M., Bengoetxea, H., Ruiz-Ortega, J. Á., & Morera-Herreras, T. (2019). Therapeutic potential of cannabinoids as neuroprotective agents for damaged cells conducing to movement disorders. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 146, pp. 229–257). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.06.012>
- [14] Lu, H. C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. In *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* (Vol. 6, Issue 6, pp. 607–615). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- [15] Caro Delgado, M. E. (2025). Factores sociales y ambientales que influyen en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas en adultos mayores. In *Reincisol.*, 4(7), 1662–1688. [https://doi.org/10.59282/reincisol.v4\(7\)1662-1688](https://doi.org/10.59282/reincisol.v4(7)1662-1688)

[16] Guillermo, J., Paredes, V., Rodríguez Díaz, M., & Santiago, D. (2022). FITOCANNABINOIDES Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: UNA MIRADA HACIA EL FUTURO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

[17] Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908, 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>

[18] Pattabiraman, G., Palasiewicz, K., Galvin, J. P., & Ucker, D. S. (2017). Aging-associated dysregulation of homeostatic immune response termination (and not initiation). *Aging cell*, 16(3), 585–593. <https://doi.org/10.1111/accel.12589>

[19] Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>

[20] Boisvert, M. M., Erikson, G. A., Shokhirev, M. N., & Allen, N. J. (2018). The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell reports*, 22(1), 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.039>

[21] López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

[22] Onyango, I. G., Jauregui, G. V., Čarná, M., Bennett, J. P., Jr, & Stokin, G. B. (2021). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biomedicines*, 9(5), 524. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050524>

[23] Sinyor, B., Mineo, J., & Ochner, C. (2020). Alzheimer's Disease, Inflammation, and the Role of Antioxidants. *Journal of Alzheimer's disease reports*, 4(1), 175–183. <https://doi.org/10.3233/ADR-200171>

[24] Hayashi, M. (2009). Oxidative stress in developmental brain disorders. In *Neuropathology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2008.00888.x>

[25] Wang, W., Zhao, F., Ma, X., Perry, G., & Zhu, X. (2020). Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Molecular neurodegeneration*, 15(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00376-6>

[26] Wareham, L. K., Liddelow, S. A., Temple, S., Benowitz, L. I., Di Polo, A., Wellington, C., Goldberg, J. L., He, Z., Duan, X., Bu, G., Davis, A. A., Shekhar, K., Torre, A., Chan, D. C., Canto-Soler, M. V., Flanagan, J. G., Subramanian, P., Rossi, S., Brunner, T., Bovenkamp, D. E., ... Calkins, D. J. (2022). Solving neurodegeneration: common mechanisms and strategies for new treatments. *Molecular neurodegeneration*, 17(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00524-0>

[27] Martínez-Pinilla, E., Aguinaga, D., Navarro, G., Rico, A. J., Oyarzábal, J., Sánchez-Arias J. A., Lanciego, J. L., Franco, R. (2019). Targeting CB1 and GPR55 endocannabinoid receptors as a potential neuroprotective approach for Parkinson's disease. In *Mol Neurobiol* 56(8):5900-5910. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1495-4>

[28] Mnich, K., Finn, D. P., Dowd, E., Gorman, A. M. (2010) Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. In *International Journal of Cell Biology* (Vol. 2010). <https://doi.org/10.1155/2010/818497>

[29] Martínez-Torres, A. M., & Morán, J. (2024). CB1 Receptor Activation Provides Neuroprotection in an Animal Model of Glutamate-Induced Excitotoxicity Through a Reduction of NOX-2 Activity and Oxidative Stress. In *CNS neuroscience & therapeutics*, 30(11), e70099. <https://doi.org/10.1111/cns.70099>

[30] Smith, S. R., Terminelli, C., & Denhardt, G. (2000). Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. In

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics (Vol. 293(1), 136–150).
[https://doi.org/10.1016/S0022-3565\(24\)39213-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3565(24)39213-4)

[31] Liu, Q., Bhat, M., Bowen, W. D., & Cheng, J. (2009). Signaling pathways from cannabinoid receptor-1 activation to inhibition of N-methyl-D-aspartic acid mediated calcium influx and neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. In *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* (Vol. 331(3), 1062–1070).
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.156216>

[32] Campos, A. C., Fogaça, M. v., Sonogo, A. B., & Guimarães, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. In *Pharmacological Research* (Vol. 112, pp. 119–127). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>

[33] Wolf, S. A., Bick-Sander, A., Fabel, K., Leal-Galicia, P., Tauber, S., Ramirez-Rodriguez, G., Müller, A., Melnik, A., Waltinger, T. P., Ullrich, O., & Kempermann, G. (2010). Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. In *Cell communication and signaling* (Vol. 8, 12). <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-12>

[34] Campos, A. C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., Díaz-Alonso, J., Ortega-Gutiérrez, S., Vázquez-Villa, H., Moreira, F. A., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., & Guimarães, F. S. (2013). The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. In *The international journal of neuropsychopharmacology* (Vol. 16(6), 1407–1419).
<https://doi.org/10.1017/S1461145712001502>

[35] Mecha, M., Torrao, A. S., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F. J., Mechoulam, R., & Guaza, C. (2012). Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. In *Cell death & disease* (Vol. 3(6), e331). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.71>

[36] García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J. A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of

antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. In *Brain research* (Vol. 1134(1), 162–170).
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.063>

[37] Kozela, E., Pietr, M., Juknat, A., Rimmerman, N., Levy, R., & Vogel, Z. (2010). Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(3), 1616–1626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069294>

[38] O’Sullivan, S. E., Jensen, S. S., Nikolajsen, G. N., Bruun, H. Z., Bhuller, R., & Hoeng, J. (2023). The therapeutic potential of purified cannabidiol. In *Journal of Cannabis Research* (Vol. 5, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s42238-023-00186-9>

[39] U.S. Food and Drug Administration. (s.f.). *FDA regulation of cannabis and cannabis-derived products, including cannabidiol (CBD)*.
<https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd#approved>

[40] Rubin, R. (2018). The Path to the First FDA-Approved Cannabis-Derived Treatment and What Comes Next. In *Medical News & Perspectives* (Vol. 320(12), 1227-1229). doi:10.1001/jama.2018.11914

[41] Alvarez, E., Queirolo, R., & Sotto, B. (2023). Conflicting forces in the implementation of medicinal cannabis regulation in Uruguay. In *Journal of Cannabis Research* (Vol. 5(1)). <https://doi.org/10.1186/s42238-023-00189-6>

[42] GreenMed. (s.f.). Xpectra 10. GreenMed. <https://greenmed.uy/xpectra10/>

[43] Ernstmeyer, K., & Christman, E. (Eds.). (2023). *Farmacología de enfermería* (2.ª ed.). Chippewa Valley Technical College. Capítulo 1: Farmacocinética y farmacodinamia. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK595006/>

[44] Merck & Co., Inc. (2024). *Biodisponibilidad de los fármacos*. In *MSD Manual Profesional*. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/biodisponibilidad-de-los-f%C3%A1rmacos>

[45] Lucas, C. J., Galettis, P., & Schneider, J. (2018). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. In *British Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 84, Issue 11, pp. 2477–2482). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>

[46] Yau, G. T. Y., Tai, W., Arnold, J. C., Chan, H. K., & Kwok, P. C. L. (2023). Cannabidiol for the Treatment of Brain Disorders: Therapeutic Potential and Routes of Administration. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 40, Issue 5, pp. 1087–1114). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03469-1>

[47] Grifoni, L., Vanti, G., Donato, R., Sacco, C., & Bilia, A. R. (2022). Promising Nanocarriers to Enhance Solubility and Bioavailability of Cannabidiol for a Plethora of Therapeutic Opportunities. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27186070>

[48] Bartkowiak-Wieczorek, J., Mądry, E., Książkiewicz, M., Winkler-Galicki, J., Szalata, M., Szalata, M., Jiménez, U. E., Wielgus, K., Grześkowiak, E., Słomski, R., & Bienert, A. (2023). THC-Reduced *Cannabis sativa* L.—How Does the Solvent Determine the Bioavailability of Cannabinoids Given Orally? In *Nutrients* (Vol. 15(12), 2646). <https://doi.org/10.3390/nu15122646>

[49] Gingrich, J., Choudhuri, S., Cournoyer, P., Downey, J., & Muldoon Jacobs, K. (2023). Review of the oral toxicity of cannabidiol (CBD). In *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* (Vol. 176, 113799). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113799>

[50] Perucca, E., & Bialer, M. (2020). Critical Aspects Affecting Cannabidiol Oral Bioavailability and Metabolic Elimination, and Related Clinical Implications. In *CNS Drugs* (Vol. 34(8), 795–800). <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00741-5>

- [51] Preeti, Sambhakar, S., Saharan, R., Narwal, S., Malik, R., Gahlot, V., Khalid, A., Najmi, A., Zoghebi, K., Halawi, M. A., Albratty, M., & Mohan, S. (2023). Exploring LIPIDs for their potential to improves bioavailability of lipophilic drugs candidates: A review. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 31(12), 101870. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101870>
- [52] Pang, L., Zhu, S., Ma, J., Zhu, L., Liu, Y., Ou, G., Li, R., Wang, Y., Liang, Y., Jin, X., Du, L., & Jin, Y. (2021). Intranasal temperature-sensitive hydrogels of cannabidiol inclusion complex for the treatment of post-traumatic stress disorder. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 11(7), 2031–2047). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.01.014>
- [53] Binova, Z., Kucerova, E., Nejedly, T., Viktorova, J., Cahova, M., Benes, F., Maly, M., Maly, M., Stupak, M., Kastanek, P., Hajslova, J., & Stranska, M. (2025). Unlocking the resorption potential of cannabidiolic acid: A comprehensive in vitro and in vivo bioavailability study. *International journal of pharmaceutics*, 684, 126110. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.126110>
- [54] Upadhyay, G., Fihurka, O., Patel, P., & Sanchez-Ramos, J. (2025). Quantitation of Cannabidiol (CBD) in brain regions and plasma following intranasal administration of a CBD nanoformulation. *Journal of cannabis research*, 7(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s42238-025-00308-5>
- [55] Calapai, F., Cardia, L., Sorbara, E. E., Navarra, M., Gangemi, S., Calapai, G., & Mannucci, C. (2020). Cannabinoids, blood–brain barrier, and brain disposition. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030265>
- [56] Nguyen, T. T. L., & Maeng, H. J. (2022). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intranasal Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Nose-to-Brain Delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030572>
- [57] Crowe, T. P., & Hsu, W. H. (2022). Evaluation of Recent Intranasal Drug Delivery Systems to the Central Nervous System. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030629>

[58] Falcone, J. A., Salameh, T. S., Yi, X., Cordy, B. J., Mortell, W. G., Kabanov, A. v., & Banks, W. A. (2014). Intranasal administration as a route for drug delivery to the brain: Evidence for a unique pathway for albumin. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Vol. 351(1), 54–60). <https://doi.org/10.1124/jpet.114.216705>

[59] Echeverry, C., Richeri, A., Fagetti, J., Martínez, G. F., Vignolo, F., Prunell, G., Cuñetti, L., Martínez Busi, M., Pérez, S., de Medina, V. S., Ferreiro, C., & Scorza, C. (2024). Neuroprotective Effect of a Pharmaceutical Extract of Cannabis with High Content on CBD Against Rotenone in Primary Cerebellar Granule Cell Cultures and the Relevance of Formulations. *Cannabis and cannabinoid research*, 9(3), e907–e916. <https://doi.org/10.1089/can.2022.0289>

[60] Echeverry, C., Prunell, G., Narbondo, C., de Medina, V. S., Nadal, X., Reyes-Parada, M., & Scorza, C. (2021). A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT_{1A} Receptors. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 39(2), 335–348). <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00277-y>

[61] Traul, K. A., Driedger, A., Inlge, D. L., & Nakhai, D. (2000). Review of the Toxicologic Properties of Medium-chain Triglycerides. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 38, 79–98). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00106-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00106-4)

[62] Salawi A. (2022). Self-emulsifying drug delivery systems: a novel approach to deliver drugs. In *Drug delivery* (Vol. 29(1), 1811–1823). <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2083724>

[63] Izgelov, D., Shmoeli, E., Domb, A. J., & Hoffman, A. (2020). The effect of medium chain and long chain triglycerides incorporated in self-nano emulsifying drug delivery systems on oral absorption of cannabinoids in rats. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol.580). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119201>

- [64] Feng, W., Qin, C., Cipolla, E., Lee, J. B., Zgair, A., Chu, Y., Ortori, C. A., Stocks, M. J., Constantinescu, C. S., Barrett, D. A., Fischer, P. M., & Gershkovich, P. (2021). Inclusion of medium-chain triglyceride in lipid-based formulation of cannabidiol facilitates micellar solubilization in vitro, but in vivo performance remains superior with pure sesame oil vehicle. In *Pharmaceutics* (Vol. 13(9)). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091349>
- [65] Martinez Naya, N., Kelly, J., Corna, G., Golino, M., Polizio, A. H., Abbate, A., Toldo, S., & Mezzaroma, E. (2024). An Overview of Cannabidiol as a Multifunctional Drug: Pharmacokinetics and Cellular Effects. In *Molecules (Basel, Switzerland)*, (Vol. 29(2), 473). <https://doi.org/10.3390/molecules29020473>
- [66] Zgair, A., Wong, J. C. M., Sabri, A., Fischer, P. M., Barrett, D. A., Constantinescu, C. S., & Gershkovich, P. (2015). Development of a simple and sensitive HPLC-UV method for the simultaneous determination of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rat plasma. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 114, 145–151). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.019>
- [67] Loucks, J., Yost, S., & Kaplan, B. (2015). An introduction to basic pharmacokinetics. *Transplantation*, 99(5), 903–907. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000754>
- [68] Dhuria, S. V., Hanson, L. R., & Frey, W. H., 2nd (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(4), 1654–1673. <https://doi.org/10.1002/jps.21924>
- [69] Lochhead, J. J., & Thorne, R. G. (2012). Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, 64(7), 614–628. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>