

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Orgánica I**



**ESTUDIO DEL PROCESO DE RECAPTACIÓN DE  
ANANDAMIDA MEDIANTE LA SÍNTESIS DE  
INHIBIDORES Y EVALUACIÓN DE SU APLICABILIDAD  
TERAPÉUTICA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Silvia Ortega Gutiérrez

Bajo la dirección de las Doctoras:

María Luz López Rodríguez  
Alma Bisó Beronda

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2666-6**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



*ESTUDIO DEL PROCESO DE RECAPTACIÓN DE  
ANANDAMIDA MEDIANTE LA SÍNTESIS DE INHIBIDORES Y  
EVALUACIÓN DE SU APLICABILIDAD TERAPÉUTICA*

TESIS DOCTORAL

SILVIA ORTEGA GUTIÉRREZ

Madrid 2004

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



*ESTUDIO DEL PROCESO DE RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA  
MEDIANTE LA SÍNTESIS DE INHIBIDORES Y EVALUACIÓN DE SU  
APLICABILIDAD TERAPÉUTICA*

Memoria que para optar al grado de

DOCTORA

presenta

**Silvia Ortega Gutiérrez**

MADRID

Abril 2004

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos comunes en química orgánica siguiendo las recomendaciones de "Guidelines for Authors", *J. Org. Chem.* **2004**, *69(1)*, 13A. Además se han empleado los indicados a continuación:

|                  |  |
|------------------|--|
| ac.              | Acuoso   |
| AC               | Adenilil ciclasa   |
| AEA              | Anandamida   |
| APC              | Célula presentadora de antígeno ( <i>antigen presenting cell</i> )   |
| ATP              | Trifosfato de adenosina ( <i>adenosine triphosphate</i> )  |
| BSA              | Albúmina de suero bovino ( <i>bovine serum albumin</i> )   |
| CAV1             | Caveolina-1  |
| CB <sub>1</sub>  | Receptor de cannabinoides de tipo 1  |
| CB <sub>2</sub>  | Receptor de cannabinoides de tipo 2  |
| c.c.f.           | Cromatografía analítica en capa fina   |
| CDTA             | Transacilasa dependiente de calcio ( <i>calcium dependent transacylase</i> )   |
| CE <sub>50</sub> | Concentración que produce el 50% del efecto objeto de estudio  |
| CI <sub>50</sub> | Concentración que inhibe el 50% del efecto objeto de estudio   |
| COSY             | Correlación homonuclear por el desplazamiento químico ( <i>chemical shift correlated spectroscopy</i> )                            |
| COX-2            | Ciclooxigenasa de tipo 2 (ciclooxigenasa inducible)  |
| CREAE            | Encefalomiелitis autoinmune experimental recurrente crónica ( <i>chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis</i> ) |
| DAB              | Clorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina   |
| DCC              | <i>N,N</i> -Diciclohexilcarbodiimida   |
| DEPT             | Aumento sin distorsión por transferencia de polarización ( <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> )            |
| DGL              | Lipasa de diacilglicerol ( <i>diacylglycerol lipase</i> )  |
| DMAP             | <i>N,N</i> -Dimetil-4-aminopiridina  |
| DMF              | <i>N,N</i> -Dimetilformamida   |
| DRG              | Ganglios de la raíz dorsal ( <i>dorsal root ganglion</i> )   |
| EAE              | Encefalomiелitis autoinmune experimental ( <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i> )                                      |

|                  |   |
|------------------|---|
| EDTA             | Ácido etilendiaminotetraacético   |
| EGTA             | Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)- <i>N,N,N,N</i> -tetraacético   |
| ELISA            | Enzimoimmunoensayo ( <i>enzyme linked immunosorbed assay</i> )  |
| eNOS             | Sintasa endotelial de óxido nítrico ( <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )  |
| ESI              | Ionización por electrospray ( <i>electrospray ionization</i> )  |
| FAAH             | Amidohidrolasa de ácidos grasos ( <i>fatty acid amide hydrolase</i> )   |
| FAPA             | Amida primaria de ácido graso ( <i>fatty acid primary amide</i> )   |
| FAA              | Amida de ácido graso ( <i>fatty acid amide</i> )  |
| FRET             | Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ( <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )  |
| GPI              | Glicosilfosfatidilinositol  |
| HEPES            | Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietyl)piperazina- <i>N</i> -2-etanosulfónico   |
| IL               | Interleuquina   |
| Inh. Máx.        | Inhibición máxima   |
| iNOS             | Sintasa inducible de óxido nítrico ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )   |
| IR               | Infrarrojo  |
| i.p.             | Intraperitoneal   |
| $K_D$            | Constante de disociación  |
| $K_i$            | Constante de afinidad   |
| $K_m$            | Constante de Michaelis  |
| LPS              | Lipopolisacárido  |
| LT               | Leucotrieno   |
| MGL              | Lipasa de monoglicéridos ( <i>monoglyceride lipase</i> )  |
| MAPKs            | Proteínas quinasas activadas por mitógenos ( <i>mitogen activated protein kinases</i> )   |
| MHC              | Complejo principal de histocompatibilidad ( <i>major histocompatibility complex</i> )   |
| NAE              | <i>N</i> -aciletanolamina   |
| NO               | Óxido nítrico ( <i>nitric oxide</i> )   |
| NOS              | Sintasa de óxido nítrico ( <i>nitric oxide synthase</i> )   |
| PAGE-SDS         | Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de docecilsulfato sódico ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecylsulphate</i> ) |
| PB               | Tampón fosfato ( <i>phosphate buffer</i> )  |
| PG               | Prostaglandina  |
| PLA <sub>2</sub> | Fosfolipasa A <sub>2</sub> ( <i>phospholipase A<sub>2</sub></i> )   |
| PLC              | Fosfolipasa C ( <i>phospholipase C</i> )  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| PLD             | Fosfolipasa D ( <i>phospholipase D</i> )  |
| PMA             | Ácido fosfomolibdico ( <i>phosphomolybdic acid</i> )  |
| PMSF            | Fluoruro de fenilmetanosulfonilo ( <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> )  |
| PPAR- $\alpha$  | Receptor activador de la proliferación del peroxisoma tipo $\alpha$ ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i> )                                 |
| ppm             | Partes por millón   |
| psi             | Libras/pulgadas <sup>2</sup> ( <i>pound square inch</i> )   |
| RMN             | Resonancia magnética nuclear  |
| r.p.m.          | Revoluciones (vueltas) por minuto   |
| Rto.            | Rendimiento   |
| RTX             | Resiniferatoxina  |
| SAR             | Relación estructura-actividad ( <i>structure-activity relationship</i> )  |
| SAFIR           | Relación estructura-afinidad ( <i>structure-affinity relationship</i> )   |
| SCE             | Sistema cannabinoide endógeno   |
| SDS             | Docecilsulfato sódico ( <i>sodium dodecylsulphate</i> )   |
| SNC             | Sistema nervioso central  |
| SNP             | Nitroprusiato sódico ( <i>sodium nitroprusside</i> )  |
| SR1             | SR141716A (antagonista del receptor CB <sub>1</sub> )   |
| SR2             | SR144528 (antagonista del receptor CB <sub>2</sub> )  |
| TBS             | Tampón Tris-NaCl ( <i>tris buffered saline</i> )  |
| TBS-T           | Tampón Tris-NaCl con tritón X-100 al 0,1%   |
| $\Delta^9$ -THC | (-)- $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol   |
| Th1             | Células T colaboradoras de tipo 1 CD4 <sup>+</sup>  |
| THF             | Tetrahidrofurano  |
| TMEV-IDD        | Enfermedad desmielinizante inducida por el virus de la encefalomielititis murina de Theiler ( <i>Theiler's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease</i> ) |
| Tris-HCl        | Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano  |
| TRP             | Receptor de potencial transitorio ( <i>transient receptor potential</i> )   |
| TX              | Tromboxano  |
| $V_{max}$       | Velocidad máxima  |
| VR <sub>1</sub> | Receptor de vanilloides de tipo 1   |

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 2. OBJETIVOS.....  | 17 |
| 3. ANTECEDENTES.....   | 21 |
| 3.1. EL PROCESO DE RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA.....  | 23 |
| 3.1.1. Inhibidores de la recaptación de anandamida.....  | 24 |
| 3.1.2. Distribución tisular.....   | 26 |
| 3.1.3. Caracterización bioquímica.....   | 27 |
| 3.1.4. Naturaleza del transporte de anandamida.....  | 28 |
| 3.2. EL TRANSPORTE DE ENDOCANNABINOIDES Y EL RECEPTOR DE VANILLOIDES VR <sub>1</sub> .....   | 35 |
| 3.3. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS DE LOS INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA.....   | 38 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 41 |
| 4.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS I (1-38).....  | 43 |
| 4.1.1. Síntesis de ésteres y tioésteres.....   | 43 |
| 4.1.2. Síntesis de amidas.....   | 44 |
| 4.1.3. Síntesis de (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(fur-3-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenilamina 9.....  | 47 |
| 4.2. PERFIL IN VITRO DE LOS DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS I.....  | 48 |
| 4.2.1. Estudio cualitativo de la relación entre la estructura de los compuestos sintetizados y su actividad como inhibidores de la recaptación de anandamida ..... | 48 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.2. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la actividad enzimática de la enzima FAAH.....                        | 54 |
| 4.2.3. Determinación de la afinidad receptorial.....   | 56 |
| 4.3. INFLUENCIA DE LA ENZIMA FAAH EN LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA.....   | 58 |
| 4.3.1. Caracterización de un componente no celular en la recaptación de anandamida .....                                     | 58 |
| 4.3.2. Eliminación del componente no celular de la recaptación de anandamida.....  | 59 |
| 4.3.3. Recaptación de anandamida en neuronas FAAH <sup>+/+</sup> y FAAH <sup>-/-</sup> .....                                 | 60 |
| 4.3.4. Inhibición de la recaptación de anandamida por el UCM707 en neuronas FAAH <sup>+/+</sup> y FAAH <sup>-/-</sup> .....  | 61 |
| 4.4. APLICABILIDAD TERAPÉUTICA DEL INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA UCM707 EN UN MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE..... | 64 |
| 4.4.1. Análisis de las deficiencias neurológicas asociadas a la funcionalidad motora.....                                    | 65 |
| 4.4.2. Activación microglial.....  | 66 |
| 4.4.3. Efecto del UCM707 en la producción de factores proinflamatorios en células microgliales en cultivo.....               | 68 |
| 5. PARTE EXPERIMENTAL.....   | 73 |
| 5.1. QUÍMICA.....  | 75 |
| 5.1.1. Síntesis de alcoholes.....  | 75 |
| 5.1.2. Síntesis de aminas.....   | 77 |
| 5.1.3. Síntesis de ésteres, tioésteres y amidas I. Procedimiento general (1-8, 10-38).....                                   | 82 |
| 5.1.4. Síntesis de aminas I.....   | 95 |
| 5.2. PERFIL IN VITRO DE LOS DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS I.....  | 96 |
| 5.2.1. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida.....                                     | 96 |

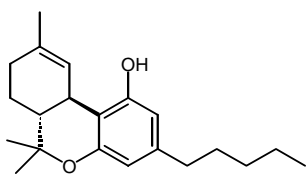


|  |     |
|--|-----|
| 5.2.2. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la actividad hidrolítica de la enzima FAAH.....   | 97  |
| 5.2.3. Determinación de la afinidad receptoral.....  | 97  |
| 5.3. RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA EN NEURONAS FAAH <sup>+/+</sup> Y FAAH <sup>-/-</sup> .....               | 99  |
| 5.3.1. Cultivos neuronales.....  | 99  |
| 5.3.2. Análisis de la expresión de FAAH.....   | 99  |
| 5.3.3. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida.....                 | 100 |
| 5.4. MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DEL VIRUS DE THEILER.....   | 100 |
| 5.4.1. Animales e inoculación del virus.....   | 101 |
| 5.4.2. Evaluación de la funcionalidad motora.....  | 101 |
| 5.4.3. Tratamiento.....  | 101 |
| 5.4.4. Histología.....   | 101 |
| 5.4.5. Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos de fluorescencia.....                   | 103 |
| 5.4.6. Cultivos de microglía e inmunocitoquímica.....  | 103 |
| 5.4.7. Determinación de los niveles de NO y de IL-1 $\beta$ e IL-6.....                                  | 103 |
| 5.4.8. Análisis de la expresión de proteínas: inmunodetección de proteínas transferidas a membranas..... | 104 |
| 6. CONCLUSIONES.....   | 105 |



## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema cannabinoide endógeno (SCE) representa en la actualidad uno de los más novedosos hallazgos en el contexto de los sistemas endógenos implicados en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. El inicio de su estudio puede establecerse a mediados de los años sesenta, con el aislamiento y caracterización estructural del principio activo de la planta *Cannabis sativa*, el (-)- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC),<sup>1</sup> pero, sin embargo, no ha sido hasta esta última década cuando ha experimentado su máximo desarrollo. Así, durante los últimos años, la investigación en el área de los cannabinoides ha constituido uno de los objetivos prioritarios de numerosos grupos de investigación, siendo objeto de un abordaje multidisciplinar que ha permitido establecer las bases fundamentales del funcionamiento del SCE en un relativamente corto espacio de tiempo.



(-)- $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)

Cronológicamente, la identificación del  $\Delta^9$ -THC como la molécula responsable de los efectos asociados a la administración de cannabinoides supuso el primer hito de importancia en el área de los cannabinoides, impulsando el desarrollo de numerosos estudios con el objetivo de elucidar sus mecanismos de actuación a nivel molecular. Sin embargo, la naturaleza altamente lipofílica del propio  $\Delta^9$ -THC y otros compuestos relacionados, a los que se denominó genéricamente cannabinoides, dificultó enormemente el desarrollo experimental en este área y, por tanto, la obtención de conclusiones inequívocas. De

hecho, inicialmente, los resultados obtenidos parecían indicar un mecanismo de actuación inespecífico, atribuyéndose los efectos observados a una simple alteración de las membranas celulares.<sup>2</sup>

Sin embargo, pronto surgieron los primeros resultados incompatibles con esta inespecificidad de acción, describiéndose grandes diferencias de actividad entre sustratos estructuralmente muy parecidos e incluso estereoisómeros. Así, progresivamente, un número cada vez mayor de evidencias experimentales parecían apoyar con fuerza la hipótesis de la existencia de un sitio de acción específico de estas moléculas, es decir, la existencia de un receptor de cannabinoides.<sup>3</sup>

La primera prueba definitiva acerca de la presencia de receptores de cannabinoides fue obtenida al demostrar la relación entre la administración de cannabinoides y la inhibición de la vía de la adenilil ciclasa (AC).<sup>4</sup> Por otro lado, la existencia de receptores para cannabinoides en el organismo implica la presencia de ligandos endógenos para dichos receptores, de modo que a finales de los años ochenta se desencadenó una exhaustiva búsqueda con el objetivo de localizar e identificar todos estos elementos.

Así, el inicio de la década de los noventa supuso uno de los períodos más estimulantes en lo que al estudio de los cannabinoides respecta, bastando únicamente los cuatro primeros años para describir la caracterización molecular del primer receptor de cannabinoides al que se llamó CB<sub>1</sub>,<sup>5</sup> aislar y elucidar estructuralmente el primer ligando endógeno o endocannabinoide al que se

<sup>2</sup> Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 131.

<sup>3</sup> (a) Glaser, R.; Adin, I.; Mechoulam, R.; Hanuš, L. *Heterocycles* **1995**, *39*, 867. (b) Howlett, A. C.; Champion, T. M.; Wilken, G. H.; Mechoulam, R. *Neuropharmacology* **1990**, *29*, 161. (c) Mechoulam, R.; Lander, N.; Breuer, A.; Zahalka, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 315.

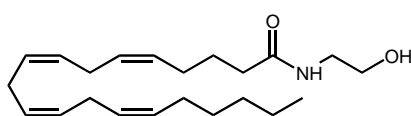
<sup>4</sup> (a) Howlett, A. C. *Mol. Pharmacol.* **1985**, *27*, 429. (b) Devane, W. A.; Dysarz, F. A. III, Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *34*, 605.

<sup>5</sup> Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. *Nature* **1990**, *346*, 561.

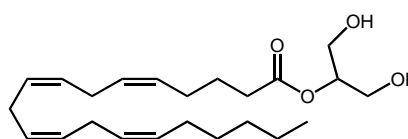
<sup>1</sup> Gaoni, Y.; Mechoulam, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1646.

denominó anandamida (*N*-araquidoniletanolamina)<sup>6</sup> e identificar el segundo receptor de cannabinoides CB<sub>2</sub>.<sup>7</sup>

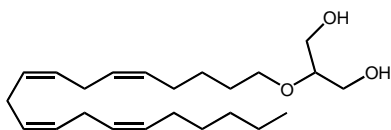
Durante los años siguientes, caracterizados por un ambiente altamente dinámico que sigue hasta la actualidad, se continúa profundizando en el conocimiento de los receptores de cannabinoides, de sus mecanismos de transducción, de sus ligandos endógenos y de los procesos de biosíntesis y de inactivación de éstos.



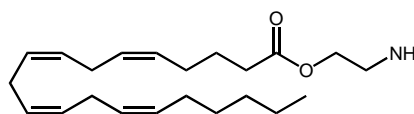
Anandamida



2-Araquidonilglicerol



Araquidil 2-gliceril éter



Virodhamina

Así, se establece la localización de CB<sub>1</sub> de forma predominante en el sistema nervioso central (SNC)<sup>8</sup> y también, aunque en menor extensión, en ciertos tejidos periféricos.<sup>9</sup> Por otro lado, CB<sub>2</sub> se encuentra restringido a

una distribución periférica, preferentemente en el sistema inmune,<sup>10</sup> aún cuando la existencia de otras localizaciones no se puede descartar de forma absoluta, y de hecho, recientemente se ha descrito la primera localización de CB<sub>2</sub> en el SNC de humanos.<sup>11</sup>

Ambos receptores de cannabinoides presentan la estructura característica de siete hélices transmembrana, perteneciendo a la superfamilia de receptores acoplados

a proteínas G. En particular, entre los efectos asociados a su activación, mediados por proteínas G pertenecientes al tipo G<sub>i/o</sub>, destacan la inhibición de la AC, la regulación de canales iónicos (inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, N y P/Q y regulación de los canales rectificadores de potasio, los denominados K<sub>ir</sub>), la activación de las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la estimulación de la

<sup>6</sup> Devane, W. A.; Hanuš, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. *Science* **1992**, *258*, 1946.

<sup>7</sup> Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. *Nature* **1993**, *365*, 61.

<sup>8</sup> (a) Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Little, M. D.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; de Costa, B. R.; Rice, K. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1932. (b) Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; de Costa, B. R.; Rice, K. C. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 563. (c) Glass, M.; Dragunow, M.; Faull, R. L. *Neuroscience* **1997**, *77*, 299.

<sup>9</sup> (a) Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Elrick, D. B.; Mechoulam, R.; Corbett, A. D. *Br. J. Pharmacol.* **1992**, *105*, 980. (b) Gérard, C. M.; Mollereau, C.; Vassart, G.; Parmentier, M. *Biochem. J.* **1991**, *279*, 129. (c) Bouaboula, M.; Rinaldi, M.; Carayon, P.; Carillon, C.; Delpech, B.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 173. (d) Gallègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.;

Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 54.

<sup>10</sup> (a) Véase nota 9(c). (b) Véase nota 9(d). (c) Facci, L.; Dal Toso, R.; Romanello, S.; Buriani, A.; Skaper, S. D.; Leon, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3376. (d) Pettit, D. A.; Anders, D. L.; Harrison, M. P.; Cabral, G. A. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *402*, 119.

<sup>11</sup> Benito, C.; Núñez, E.; Tolón, R. M.; Carrier, E. J.; Rábano, A.; Hillard, C. J.; Romero, J. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 11136.

enzima sintasa de óxido nítrico (NOS).<sup>12</sup> A la caracterización de la anandamida como primer ligando endocannabinoide le siguió la identificación del éster 2-araquidonilglicerol,<sup>13</sup> y, más recientemente, la adición de dos nuevos compuestos, el araquidil 2-gliceril éter<sup>14</sup> (éter de noladina) y la virodhamina,<sup>15</sup> que representan el tercer y cuarto endocannabinoide, respectivamente, todos ellos derivados del ácido araquidónico. Hasta la fecha, sólo estos receptores y ligandos endógenos constituyen las bases firmemente establecidas y comúnmente aceptadas de lo que se consideran endocannabinoides y receptores de cannabinoides. Sin embargo, en la actualidad existen aún numerosos puntos de controversia y de aspectos pendientes de clarificar, no pudiéndose descartar la existencia de una mayor complejidad de estos elementos.<sup>16</sup> En este sentido, diversos estudios apuntan hacia la presencia de nuevos receptores de cannabinoides distintos de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, de otros ligandos endógenos diferentes de los descritos hasta ahora así como de la existencia de otros efectos producidos por los endocannabinoides anteriormente citados pero no mediados por receptores de cannabinoides. Así, un número creciente de evidencias apoyan la existencia de posibles receptores de cannabinoides (CB<sub>x</sub>) relacionados con las acciones de la anandamida en el endotelio

vascular,<sup>17</sup> en el cerebro de ratones que carecen del receptor CB<sub>1</sub> (ratones *knockout* CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup>)<sup>18</sup> o en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal<sup>19</sup> y del 2-araquidonilglicerol en la regulación de la migración microglial.<sup>20</sup>

Con respecto a los ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides, actualmente se considera la posibilidad de que distintas amidas primarias y/o etanolamidas de ácidos grasos (denominadas genéricamente como FAPAs o FAAs, respectivamente), estructuralmente próximas a la anandamida, pudieran comportarse también, al menos en determinadas condiciones, como endocannabinoides. Dentro de este grupo de moléculas, las más estudiadas, debido a su mayor abundancia fisiológica relativa, son la oleamida, la *N*-oleoiletanolamina y la *N*-palmitoiletanolamina.

La oleamida se ha caracterizado como un lípido inductor de sueño fisiológico<sup>21</sup> pero su diana molecular no se ha determinado aún con claridad, aunque sí se ha sugerido que sus efectos se deben a una modulación sobre la neurotransmisión serotoninérgica y gabaérgica.<sup>22</sup> Estos efectos de inducción del sueño pueden ser bloqueados por antagonistas del receptor CB<sub>1</sub><sup>23</sup> aún cuando *in vitro* se ha descartado la afinidad de la

<sup>12</sup> (a) Howlett, A. C.; Mukhopadhyay, S. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 53. (b) Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 161.

<sup>13</sup> (a) Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanuš, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B. R.; Compton, D. R.; Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 83. (b) Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 89.

<sup>14</sup> Hanuš, L.; Abu-Lafi, S.; Frída, E.; Breuer, A.; Vogel, Z.; Shalev, D. E.; Kustanovich, I.; Mechoulam, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3662.

<sup>15</sup> Porter, A. C.; Sauer, J. M.; Knierman, M. D.; Becker, G. W.; Berna, M. J.; Bao, J.; Nomikos, G. G.; Carter, P.; Bymaster, F. P.; Leese, A. B.; Felder, C. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 1020.

<sup>16</sup> Onaivi, E. S.; Leonard, C. M.; Ishiguro, H.; Zhang, P. W.; Lin, Z.; Akinshola, B. E.; Uhl, G. R. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *66*, 307.

<sup>17</sup> (a) Járαι, Z.; Wagner, J. A.; Varga, K.; Lake, K. D.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Zimmer, A. M.; Bonner, T. I.; Buckley, N. E.; Mezey, E.; Razdan, R. K.; Zimmer, A.; Kunos, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14136. (b) Wagner, J. A.; Varga, K.; Járαι, Z.; Kunos, G. *Hypertension* **1999**, *33*, 429. (c) Kunos, G.; Járαι, Z.; Bátkai, S.; Goparaju, S. K.; Ishac, E. J.; Liu, J.; Wang, L.; Wagner, J. A. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 159.

<sup>18</sup> (a) Di Marzo, V.; Breivogel, C. S.; Tao, Q.; Bridgen, D. T.; Razdan, R. K.; Zimmer, A. M.; Zimmer, A.; Martin, B. R. *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 2434. (b) Breivogel, C. S.; Griffin, G.; Di Marzo, V.; Martin, B. R. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 155. (c) Hájos, N.; Ledent, C.; Freund, T. F. *Neuroscience* **2001**, *106*, 1. (d) Frída, E.; Foox, A.; Rosenberg, E.; Faigenboim, M.; Cohen, V.; Barda, L.; Blau, H.; Mechoulam, R. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *461*, 27.

<sup>19</sup> Wenger, T.; Ledent, C.; Tramu, G. *Neuroendocrinology* **2003**, *78*, 294.

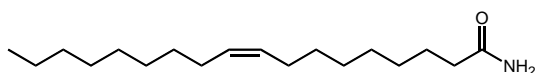
<sup>20</sup> Walter, L.; Franklin, A.; Witting, A.; Wade, C.; Xie, Y.; Kunos, G.; Mackie, K.; Stella, N. J. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 1398.

<sup>21</sup> Cravatt, B. F.; Próspero-García, O.; Siuzdak, G.; Gilula, N. B.; Henriksen, S. J.; Boger, D. L.; Lerner, R. A. *Science* **1995**, *268*, 1506.

<sup>22</sup> Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. *Vitam. Horm.* **2001**, *62*, 95.

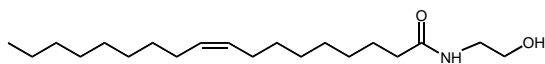
<sup>23</sup> Mendelson, W. B.; Basile, A. S. *NeuroReport* **1999**, *10*, 3237.

oleamida por el receptor CB<sub>1</sub>. Sin embargo estos resultados no dejan de encontrarse todavía en una fase muy controvertida. Así, recientes estudios parecen indicar un cierto carácter agonista de la oleamida, aunque notablemente inferior al de la anandamida, sobre los receptores CB<sub>1</sub>,<sup>24</sup> mientras que otros descartan esta acción.<sup>25</sup>



Oleamida

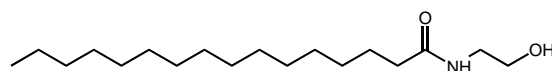
En el caso de la *N*-oleoiletanolamina, a diferencia de la anterior, parece claro que sus efectos no están mediados por los receptores de cannabinoides, sobre los que no presenta afinidad. Así, se ha descrito la implicación de este lípido en la regulación fisiológica de la saciedad y del peso corporal,<sup>26</sup> atribuyéndose estos efectos a la activación de los receptores nucleares PPAR- $\alpha$  (receptor activador de la proliferación del peroxisoma tipo  $\alpha$ ).<sup>27</sup>



*N*-Oleoiletanolamina

La *N*-palmitoiletanolamina muestra potentes propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias, aunque

su mecanismo de acción no está claro. No parece presentar afinidad por los receptores de cannabinoides, pero, sin embargo, sus efectos antiinflamatorios son bloqueados por antagonistas del receptor CB<sub>2</sub>.<sup>28</sup> Estos resultados apoyan la existencia de otro receptor de cannabinoides distinto de los identificados hasta la fecha al que se ha denominado *CB<sub>2</sub>-like* ya que comparte ciertas similitudes estructurales con el propio receptor CB<sub>2</sub> como es la sensibilidad a su antagonista. Este receptor *CB<sub>2</sub>-like* mediaría los efectos inducidos por la *N*-palmitoiletanolamina.<sup>29</sup> Adicionalmente, también se ha propuesto la existencia de receptores de *N*-palmitoiletanolamina totalmente distintos a cualquiera de los anteriores, ya que sus efectos no son bloqueados por el antagonista del receptor CB<sub>2</sub>.<sup>30</sup>



*N*-Palmitoiletanolamina

Por último, sólo muy recientemente, se ha añadido a esta lista la *N*-araquidonildopamina, aunque en este caso no está aún claro si debe ser clasificada como ligando endógeno de los receptores de vanilloides o de cannabinoides, ya que se ha descrito su capacidad para activar ambos tipos de receptores.<sup>31</sup>

<sup>24</sup> Leggett, J. D.; Aspley, S.; Beckett, S. R.; D'Antona, A. M.; Kendall, D. A.; Kendall, D. A. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 253.

<sup>25</sup> Lees, G.; Dougalis, A. *Brain Res.* **2004**, *997*, 1.

<sup>26</sup> (a) Rodríguez de Fonseca, F.; Navarro, M.; Gómez, R.; Escuredo, L.; Nava, F.; Fu, J.; Murillo-Rodríguez, E.; Giuffrida, A.; LoVerme, J.; Gaetani, S.; Kathuria, S.; Gall, C.; Piomelli, D. *Nature* **2001**, *414*, 209. (b) Gaetani, S.; Oveisi, F.; Piomelli, D. *Neuropsychopharmacology* **2003**, *28*, 1311.

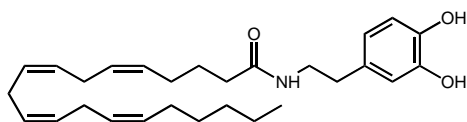
<sup>27</sup> Fu, J.; Gaetani, S.; Oveisi, F.; LoVerme, J.; Serrano, A.; Rodríguez de Fonseca, F.; Rosengarth, A.; Luecke, H.; Di Giacomo, B.; Tarzia, G.; Piomelli, D. *Nature* **2003**, *425*, 90.

<sup>28</sup> Lambert, D. M.; Vandevoorde, S.; Jonsson, K.-O.; Fowler, C. J. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 663.

<sup>29</sup> (a) Calignano, A.; La Rana, G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. *Nature* **1998**, *394*, 277. (b) Calignano, A.; La Rana, G.; Piomelli, D. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *419*, 191.

<sup>30</sup> Franklin, A.; Parmentier-Batteur, S.; Walter, L.; Greenberg, D. A.; Stella, N. J. *Neurosci.* **2003**, *23*, 7767.

<sup>31</sup> (a) Bisogno, T.; Melck, D.; Bobrov, M. Y.; Gretskeya, N. M.; Bezuglov, V. V.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 817. (b) Huang, S. M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.; Geppetti, P.; Walker, J. M.; Di Marzo, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8400. (c) O'Sullivan, S. E.; Kendall, D. A.; Randall, M. D. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 803.



**N-Araquidonildopamina**

Por otro lado, la existencia de otros efectos producidos por los endocannabinoides pero que no son mediados por los receptores de cannabinoides también ha sido descrita. En concreto, se ha demostrado que la anandamida es capaz de unirse y activar los receptores de vanilloides VR<sub>1</sub><sup>32</sup> pero también que la anandamida ejerce otras acciones que son independientes tanto de los receptores de cannabinoides como de vanilloides<sup>33</sup> e incluso acciones que parecen no estar mediadas por la interacción con ninguna proteína.<sup>34</sup>

Todos estos resultados sugieren, por un lado, la existencia adicional de receptores de cannabinoides distintos de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, y, por otro, la presencia de otras dianas moleculares distintas de estos receptores aún por identificar.

Este progresivo estudio de los receptores de cannabinoides, de sus ligandos endógenos y de sus mecanismos de acción, ha permitido confirmar la especificidad de sus acciones poniendo de manifiesto el papel modulador de los endocannabinoides. Así, los endocannabinoides actúan como moléculas señalizadoras y ejercen funciones reguladoras sobre diversos sistemas

fisiológicos en sus distintas localizaciones, habiendo recibido especial atención su capacidad neuromoduladora en el SNC<sup>35</sup> o inmunomoduladora en el sistema inmune.<sup>36</sup> Sin embargo, estas características implican la existencia de mecanismos tanto de biosíntesis como de degradación de estos compuestos, por lo que han surgido diversas líneas de investigación encaminadas a establecer cuáles son estas vías. Estos estudios han permitido la elucidación parcial de los mecanismos que regulan la biosíntesis, liberación y posterior inactivación de los endocannabinoides, aunque en la actualidad es aún mayor el número de incógnitas que de evidencias firmemente establecidas.<sup>37</sup>

Los primeros datos acerca de la formación e inactivación de la anandamida,<sup>38</sup> obtenidos en neuronas, indicaban que la biosíntesis y liberación de anandamida se producía de forma dependiente de calcio a partir de un precursor de membrana. En realidad, la anandamida parece tener el mismo mecanismo general de biosíntesis que el resto de las *N*-acilfátidiletanolaminas (Figura 1). En éste, una enzima con actividad transacilasa dependiente de calcio (CDTA) cataliza la transferencia de un resto de ácido graso (R<sub>1</sub>CO) de la posición sn-1 de un fosfolípido al grupo amino primario de la fosfatidiletanolamina, formando así una *N*-acilfosfatidiletanolamina. Este ácido graso es, en el caso de la anandamida, un resto de ácido araquidónico. En una segunda etapa la *N*-acilfosfatidiletanolamina intermedia sufre una hidrólisis catalizada por una fosfolipasa D (PLD) originando así la *N*-acilfátidiletanolamina correspondiente.<sup>39</sup>

<sup>32</sup> (a) Zygmunt, P. M.; Petersson, J.; Andersson, D. A.; Chuang, H.-h.; Sörgård, M.; Di Marzo, V.; Julius, D.; Högestätt, E. D. *Nature* **1999**, *400*, 452. (b) Szolcsányi, J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 41. (c) Smart, D.; Jerman, J. C. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 134. (d) Szolcsányi, J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 203. (e) Olah, Z.; Karai, L.; Iadarola, M. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31163.

<sup>33</sup> (a) Ruíz, L.; Miguel, A.; Díaz-Laviada, I. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 400. (b) Sancho, R.; Calzado, M. A.; Di Marzo, V.; Appendino, G.; Muñoz, E. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 429. (c) Sarker, K. P.; Maruyama, I. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1200.

<sup>34</sup> Biswas, K. K.; Sarker, K. P.; Abeyama, K.; Kawahara, K.; Iino, S.; Otsubo, Y.; Saigo, K.; Izumi, H.; Hashiguchi, T.; Yamakuchi, M.; Yamaji, K.; Endo, R.; Suzuki, K.; Imaizumi, H.; Maruyama, I. *Hepatology* **2003**, *38*, 1167.

<sup>35</sup> (a) Wilson, R. I.; Nicoll, R. A. *Nature* **2001**, *410*, 588. (b) Wilson, R. I.; Nicoll, R. A. *Science* **2002**, *296*, 678. (c) Losonczy, A.; Biró, A. A.; Nusser, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1362.

<sup>36</sup> (a) Klein, T. W.; Newton, C.; Larsen, K.; Lu, L.; Perkins, I.; Nong, L.; Friedman, H. J. *Leukoc. Biol.* **2003**, *74*, 486. (b) Klein, T. W.; Newton, C.; Larsen, K.; Chou, J.; Perkins, I.; Lu, L.; Nong, L.; Friedman, H. J. *Neuroimmunol.* **2004**, *147*, 91.

<sup>37</sup> Piomelli, D. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 873.

<sup>38</sup> Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.-C.; Piomelli, D. *Nature* **1994**, *372*, 686.

<sup>39</sup> Véase nota 22.

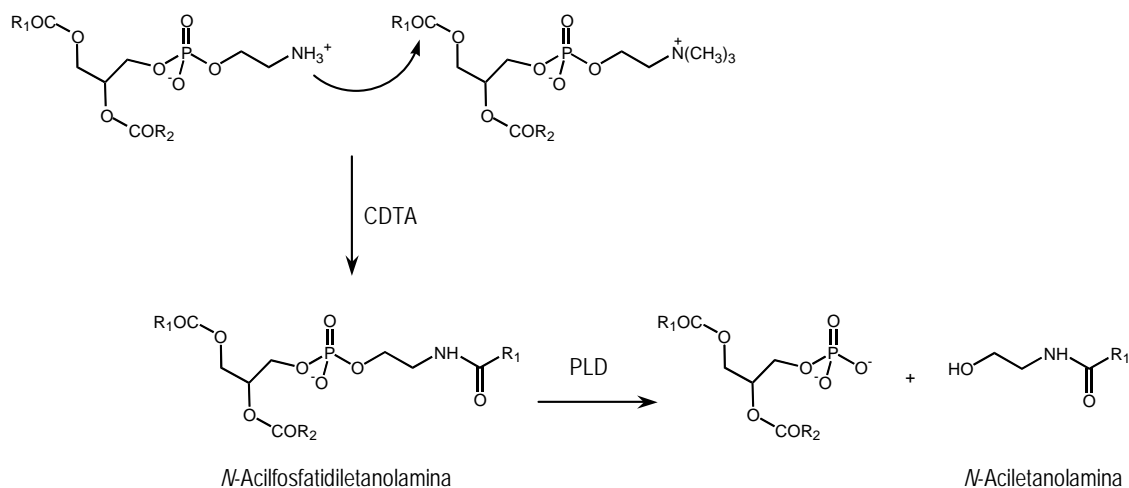


Figura 1. Biosíntesis de las *N*-aciletanolaminas

Muy recientemente se ha descrito la caracterización molecular de una PLD que parece ser la responsable de la biosíntesis de anandamida y otras *N*-aciletanolaminas relacionadas,<sup>40</sup> aunque ninguna CDTA se ha identificado aún inequívocamente, convirtiendo por tanto su caracterización molecular en un objetivo de máximo interés. Sólo así será posible determinar sus localizaciones subcelulares y estudiar los procesos en que intervienen. Además permitirá saber si la acción concertada de unas únicas CDTA y PLD está implicada en la biosíntesis de todas las *N*-aciletanolaminas o si distintas *N*-aciletanolaminas son sintetizadas por diferentes CDTAs y/o PLDs así como diseñar compuestos capaces de interferir con su actividad, posibilitando una regulación farmacológica de los niveles de anandamida. Por otro lado, se ha descrito la existencia de una ruta de biosíntesis de *N*-aciletanolaminas alternativa a la acción de la PLD. Esta ruta se basa en la acción consecutiva de dos enzimas (fosfolipasa A<sub>2</sub>-PLA<sub>2</sub>- y lisofosfolipasa D -lisoPLD-) que hasta ahora sólo se han caracterizado

parcialmente.<sup>41</sup> Se requerirán estudios en mayor profundidad para determinar cuál de estas vías tiene mayor importancia en las distintas localizaciones tisulares. La biosíntesis del resto de los endocannabinoides se ha estudiado en menor profundidad. Así, respecto al 2-araquidonilglicerol, los datos disponibles hasta la fecha indican que su formación es totalmente independiente tanto de la de anandamida como de otros monoacilgliceroles no cannabimiméticos, siendo también estimulada por el aumento de los niveles de calcio.<sup>42</sup> Aunque se han postulado dos vías alternativas por las que se podría generar el 2-araquidonilglicerol, parece que el mecanismo más probable transcurre en dos etapas a partir de fosfatidilinositol (Figura 2). Éste es sustrato de una fosfolipasa C (PLC) generando 1,2-diacilglicerol, el cual es hidrolizado por una lipasa de diacilgliceroles (DGL) formando el 2-araquidonilglicerol. Las evidencias que apoyan esta ruta residen en la reciente identificación de las dos primeras enzimas específicas con función sn1-diacilglicerol lipasa responsables de la formación del 2-

<sup>40</sup> Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 5298.

<sup>41</sup> Sun, Y.-X.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ueda, N. *Biochem. J.* 2004, doi: 10.1042/BJ20040031.

<sup>42</sup> Véase nota 37.



araquidonilglicerol<sup>43</sup> junto con la regulación de esta actividad enzimática por los receptores ionotrópicos purinérgicos tipo P2X<sub>7</sub>.<sup>44</sup>

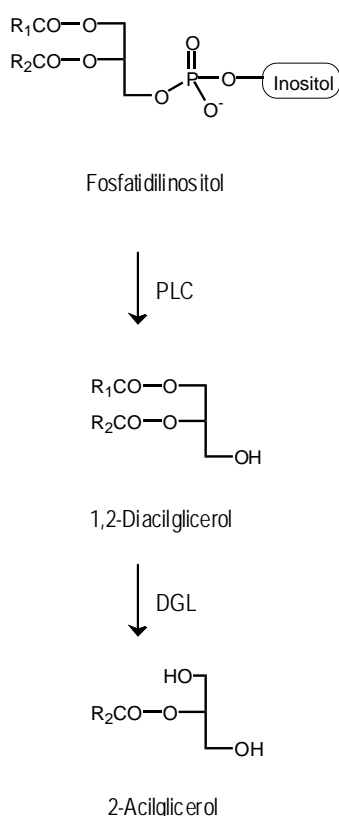


Figura 2. Biosíntesis de los 2-acilglicerol

Sobre el proceso de formación del araquidil 2-gliceril éter no se dispone aún de datos, aunque sí se ha descrito que su presencia parece menos extendida que la de los

otros dos endocannabinoides.<sup>45</sup> Los mecanismos de biosíntesis de la virodhamina tampoco son conocidos e incluso su existencia fisiológica ha sido puesta en duda debido a su inestabilidad química, puesto que la virodhamina se transforma en anandamida en medios acuosos.

Por otro lado, respecto a los mecanismos de degradación, se ha descrito que la inactivación de la anandamida transcurre en dos etapas,<sup>46</sup> un primer paso de recaptación del medio extracelular y transporte al interior celular y una segunda etapa de hidrólisis enzimática, catalizada por la enzima intracelular amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH).<sup>47</sup> Sin embargo, mientras que la FAAH ha sido tanto molecular como estructuralmente caracterizada y su mecanismo catalítico estudiado en profundidad, el estudio del transporte de anandamida presenta aún muchas más incógnitas.

En general se encuentra ampliamente aceptado que el proceso de recaptación y transporte de anandamida parece mediado por una proteína de naturaleza aún desconocida. Aunque las primeras evidencias acerca de la existencia de un transporte facilitado responsable de la recaptación de anandamida datan de mediados de la década de los noventa, no fue hasta varios años más tarde cuando realmente se obtuvieron los resultados iniciales que permitieron caracterizar farmacológicamente por vez primera el fenómeno de recaptación de anandamida y describir sus características más relevantes.<sup>48</sup>

Una vez que la anandamida accede al interior citoplasmático, es sustrato de la FAAH, que se encarga de hidrolizar el enlace amida dando lugar a ácido

<sup>43</sup> Bisogno, T.; Howell, F.; Williams, G.; Minassi, A.; Cascio, M. G.; Ligresti, A.; Matias, I.; Schiano-Moriello, A.; Paul, P.; Williams, E.-J.; Gangadharan, U.; Hobbs, C.; Di Marzo, V.; Doherty, P. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 463.

<sup>44</sup> Witting, A.; Walter, L.; Wacker, J.; Möller, T.; Stella, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3214.

<sup>45</sup> Oka, S.; Tsuchie, A.; Tokumura, A.; Muramatsu, M.; Suhara, Y.; Takayama, H.; Waku, K.; Sugiura, T. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 1374.

<sup>46</sup> Véase nota 38.

<sup>47</sup> Giuffrida, A.; Beltramo, M.; Piomelli, D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 7.

<sup>48</sup> (a) Beltramo, M.; Stella, N.; Calignano, A.; Lin, S. Y.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. *Science* **1997**, *277*, 1094. (b) Hillard, C. J.; Edgemond, W. S.; Jarrarian, A.; Campbell, W. B. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 631.

araquidónico y etanolamina. La FAAH ha sido clonada y secuenciada en diversas especies animales.<sup>49</sup> Se clasifica como perteneciente a un grupo de enzimas hidrolíticas denominado familia de las amidasas, el cual se caracteriza por presentar una secuencia conservada de unos 130 residuos.<sup>50</sup> Su mecanismo catalítico y su localización fisiológica han sido estudiados en detalle,<sup>51</sup> se han desarrollado potentes inhibidores<sup>52</sup> que han permitido el estudio de sus efectos tanto *in vitro* como *in vivo* y recientemente la FAAH ha sido cristalizada, lo que ha permitido la elucidación de su estructura tridimensional mediante el empleo de rayos X.<sup>53</sup>

Diversos estudios han sugerido el acoplamiento funcional entre el proceso de recaptación de anandamida y su hidrólisis por la enzima FAAH,<sup>54</sup> y, en concreto se ha descrito como, en cerebro humano, la unión de anandamida al receptor CB<sub>1</sub> activaría la producción de óxido nítrico (NO), compuesto que a su vez estimularía el transporte de anandamida al interior celular, aumentando así la presencia de sustrato para la propia FAAH.<sup>55</sup> Sin embargo, y a pesar de que tanto el transporte de

anandamida como su relación con la FAAH haya sido descrita y estudiada en un gran número de tipos celulares,<sup>56</sup> los datos disponibles hasta la fecha distan mucho de ser completamente inequívocos, postulándose distintas hipótesis acerca de la naturaleza de este transporte de anandamida.<sup>57</sup> En particular, está siendo objeto de una creciente atención la hipótesis que atribuye el fenómeno de transporte a través de la membrana celular a un simple efecto de difusión dirigido por la acción de la FAAH.<sup>58</sup> En este contexto, la falta de claridad del conjunto de datos generados hasta la fecha, que pueden ser compatibles con distintas explicaciones, junto con las dificultades experimentales inherentes al estudio del transporte de moléculas con un elevado carácter lipídico, hacen del transporte de anandamida uno de los fenómenos más controvertidos en la actualidad en el área de los cannabinoides. Así, este tema constituye uno de los objetivos de mayor interés en un intento de establecer de una forma definitiva si existe o no una proteína con función transportadora de anandamida, si ésta es o no específica de anandamida, cuál es realmente la naturaleza de este transporte (a través de la membrana, extracelular o intracelular) y, a partir de todo ello, finalmente, si realmente constituye o no una nueva diana terapéutica que pueda permitir el desarrollo de nuevos fármacos.

Análogamente a lo que ocurría con la biosíntesis de los endocannabinoides, también ha sido la inactivación de la anandamida el proceso que ha recibido una mayor atención, disponiéndose de menor información sobre la inactivación del resto de los endocannabinoides. Así, el 2-araquidonilglicerol es probablemente recaptado y transportado al interior celular mediante un proceso que

<sup>49</sup> (a) Cravatt, B. F.; Giang, D. K.; Mayfield, S. P.; Boger, D. L.; Lerner, R. A.; Gilula, N. B. *Nature* **1996**, *384*, 83. (b) Ueda, N.; Puffenbarger, R. A.; Yamamoto, S.; Deutsch, D. G. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 107.

<sup>50</sup> Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19177.

<sup>51</sup> (a) Véase nota 22. (b) Egertova, M.; Giang, D. K.; Cravatt, B. F.; Elphick, M. R. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1998**, *265*, 2081.

<sup>52</sup> (a) Boger, D. L.; Sato, H.; Lerner, A. E.; Hedrick, M. P.; Fecik, R. A.; Miyauchi, H.; Wilkie, G. D.; Austin, B. J.; Patricelli, M. P.; Cravatt, B. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5044. (b) Boger, D. L.; Miyauchi, H.; Hedrick, M. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1517. (c) Kathuria, S.; Gaetani, S.; Fegley, D.; Valiño, F.; Duranti, A.; Tontini, A.; Mor, M.; Tarzia, G.; La Rana, G.; Calignano, A.; Giustino, A.; Tattoli, M.; Palmery, M.; Cuomo, V.; Piomelli, D. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 76. (d) Maccarrone, M. *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 13.

<sup>53</sup> Bracey, M. H.; Hanson, M. A.; Masuda, K. R.; Stevens, R. C.; Cravatt, B. F. *Science* **2002**, *298*, 1793.

<sup>54</sup> (a) Deutsch, D. G.; Glaser, S. T.; Howell, J. M.; Kunz, J. S.; Puffenbarger, R. A.; Hillard, C. J.; Abumrad, N. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6967. (b) Day, T. A.; Rakhshan, F.; Deutsch, D. G.; Barker, E. L. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1369.

<sup>55</sup> (a) Maccarrone, M.; Van der Stelt, M.; Rossi, A.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G.; Finazzi-Agrò, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32332. (b) Maccarrone, M.; Bari, M.; Lorenzon, T.; Bisogno, T.; Di Marzo, V.; Finazzi-Agrò, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13484.

<sup>56</sup> (a) Hillard, C. J.; Jarrahian, A. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 123. (b) López-Rodríguez, M. L.; Viso, A.; Ortega-Gutiérrez, S.; Fernández-Ruiz, J.; Ramos, J. A. *Curr. Med. Chem.-Central Nervous System Agents* **2002**, *2*, 129.

<sup>57</sup> (a) Véase nota 22. (b) Hillard, C. J.; Jarrahian, A. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 802.

<sup>58</sup> Glaser, S. T.; Abumrad, N. A.; Fatade, F.; Kaczocha, M.; Studholme, K. M.; Deutsch, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4269.

parece compartir ciertas similitudes con el de la anandamida aunque también se han descrito ciertas diferencias,<sup>59</sup> y es posteriormente hidrolizado por acción de una lipasa de monoglicéridos (MGL) recientemente caracterizada.<sup>60</sup> Respecto al araquidil 2-gliceril éter<sup>61</sup> y la virodhamina,<sup>62</sup> parece que comparten al menos el fenómeno de transporte con la anandamida aunque aún no se dispone de más evidencias con respecto a sus mecanismos de inactivación.

Considerados en conjunto, todos estos datos describen la situación actual del SCE,<sup>63</sup> al menos como se acepta de forma general (Figura 3). Así, aunque la caracterización del SCE se asienta sobre de una serie de conceptos firmemente establecidos, quedan todavía un elevado número de incógnitas pendientes de esclarecer, las más importantes de las cuáles aparecen resumidas en la Tabla 1.

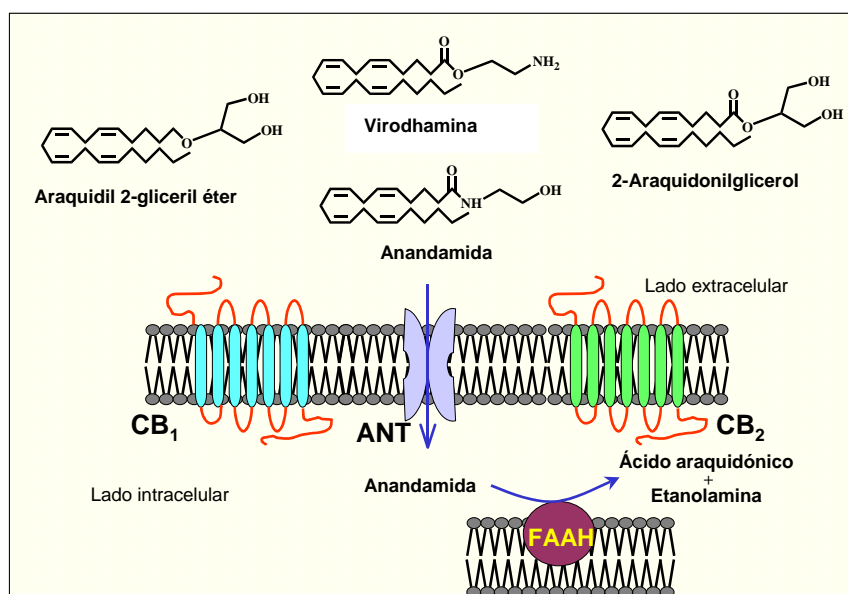


Figura 3. Sistema cannabinoide endógeno

<sup>59</sup> (a) Beltramo, M.; Piomelli, D. *NeuroReport* **2000**, *11*, 1231. (b) Maccarrone, M.; Bari, M.; Menichelli, A.; Giuliani, E.; Del Principe, D.; Finazzi-Agrò, A. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 819. (c) Bisogno, T.; Maccarrone, M.; De Petrocellis, L.; Jarrhian, A.; Finazzi-Agrò, A.; Hillard, C. J.; Di Marzo, V. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1982.

<sup>60</sup> (a) Dinh, T. P.; Carpenter, D.; Leslie, F. M.; Freund, T. F.; Katona, I.; Sensi, S. L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10819. (b) Dinh, T. P.; Freund, T. F.; Piomelli, D. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *121*, 149.

<sup>61</sup> Fezza, F.; Bisogno, T.; Minassi, A.; Appendino, G.; Mechoulam, R.; Di Marzo, V. *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 294.

<sup>62</sup> Véase nota 15.

Un factor que ha intervenido de una forma decisiva en la caracterización del SCE ha sido el desarrollo, durante los últimos años, de compuestos sintéticos cada vez más potentes, selectivos y con acciones farmacológicas definidas, capaces de actuar en las distintas proteínas que constituyen el SCE. Entre estos

<sup>63</sup> De Petrocellis, L.; Cascio, M. G.; Di Marzo, V. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 765.

compuestos<sup>64</sup> destacan los ligandos de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, agonistas y antagonistas, tanto selectivos como mixtos; las sondas covalentes diseñadas para estos mismos receptores, y, por último, los inhibidores de la FAAH.

La disponibilidad de ligandos de los receptores de cannabinoides realmente potentes y selectivos ha posibilitado su posterior marcaje radioactivo, y su empleo como radioligandos, fundamentales tanto en los estudios de unión (*binding*) para determinar la afinidad de nuevos

| Proceso  | Proteína                    | Situación Actual   |
|--|-----------------------------|--|
| Biosíntesis de anandamida                      | CDTA                        | Pendiente de caracterización molecular   |
|  | PLD                         | Caracterizada molecularmente<br>Falta de inhibidores selectivos  |
|  | PLA <sub>2</sub> y lísoPLD  | Caracterizadas parcialmente  |
| Biosíntesis de 2-AG                            | PLC                         | Pendiente de caracterización molecular   |
|  | DGL                         | Caracterizada molecularmente<br>Falta de inhibidores selectivos  |
| Biosíntesis de éter de noladina y virodhamina  | Desconocidas                | -  |
| Inactivación de anandamida                     | Transportador               | Pendiente de caracterización molecular   |
|  | FAAH                        | Caracterizada molecularmente<br>Existen inhibidores selectivos   |
| Inactivación de 2-AG                           | Transportador               | Pendiente de caracterización molecular   |
|  | MGL                         | Caracterizada molecularmente<br>Falta de inhibidores selectivos  |
| Inactivación de éter de noladina y virodhamina | Transportador               | Pendiente de caracterización molecular   |
|  | Enzimas de degradación      | Desconocidas   |
| Transducción de la señal                       | Receptores de cannabinoides | Receptores clonados CB <sub>1</sub> y CB <sub>2</sub> para los que existen agonistas y antagonistas selectivos           |
|  |                             | Evidencias farmacológicas de la existencia de otros receptores CB <sub>x</sub> , pendientes de caracterización molecular |

Tabla 1. Situación actual de las proteínas que constituyen el SCE

En general, todos estos compuestos exhiben elevados grados de potencia y selectividad, con valores de su constante de afinidad en el orden incluso subnanomolar.

compuestos como en los estudios de autorradiografía, para obtener información acerca de la localización receptorial. Funcionalmente, la utilización de agonistas de los receptores de cannabinoides ha permitido mimetizar a voluntad y con mayor potencia tanto in vitro como in vivo los efectos de los cannabinoides naturales, determinando así en qué acciones están implicados. La utilización de antagonistas ha posibilitado determinar qué tipo de efectos son mediados de forma específica por los distintos tipos de receptores, permitiendo su bloqueo

<sup>64</sup> (a) Pertwee, R. G. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1553. (b) Khanolkar, A. D.; Palmer, S. L.; Makriyannis, A. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 37. (c) Palmer, S. L.; Thakur, G. A.; Makriyannis, A. *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *121*, 3. (d) Lange, J. H.; Coolen, H. K.; van Stuijvenberg, H. H.; Dijkman, J. A.; Herremans, A. H.; Ronken, E.; Keizer, H. G.; Tipker, K.; McCreary, A. C.; Veerman, W.; Wals, H. C.; Stork, B.; Verveer, P. C.; den Hartog, A. P.; de Jong, N. M.; Adolfs, T. J.; Hoogendoorn, J.; Kruse, C. G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 627.

selectivo. Por otro lado, mediante el desarrollo de sondas covalentes para los receptores de cannabinoides, es decir, compuestos que se unen de forma irreversible a determinados residuos, se ha obtenido una valiosa información estructural acerca de los receptores, en particular acerca de qué residuos se encuentran en las proximidades del sitio de unión del ligando o incluso son directamente responsables de la unión de éste.

La síntesis de inhibidores potentes de la FAAH, activos tanto *in vitro* como *in vivo*, ha permitido inducir de forma exógena la activación del SCE mediante un aumento de los niveles de anandamida y comprobar sus efectos. Sin embargo, y dentro del contexto de los elementos responsables de la inactivación de los endocannabinoides, dos de ellos en particular adolecen de compuestos capaces de interactuar de forma potente y selectiva, el transporte de anandamida y la enzima MGL.

Todos los compuestos desarrollados hasta el momento han puesto de manifiesto las implicaciones del SCE en numerosos procesos fisiológicos tanto centrales como periféricos. Entre los efectos centrales<sup>65</sup> cabría mencionar la antinocicepción, el desarrollo cerebral, la comunicación neuronal o la regulación de actividades cerebrales como la memoria, mientras que entre los periféricos<sup>66</sup> destaca el control del apetito, la coordinación

motora, la regulación de la proliferación celular, los procesos neuroinflamatorios y su influencia sobre los sistemas inmune y cardiovascular. Este amplio espectro de acción hace del SCE y, en particular, de las proteínas que lo componen, una importante diana terapéutica para el tratamiento de numerosas enfermedades entre las que se incluyen trastornos neurodegenerativos<sup>67</sup> -como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, el corea de Huntington, o la enfermedad de Alzheimer-, procesos tumorales<sup>68</sup> -dentro de los cuales destacan los prometedores resultados obtenidos en el tratamiento de los gliomas malignos- así como otras alteraciones diversas, tales como la isquemia cerebral,<sup>69</sup> el asma, el glaucoma, el dolor o la emesis inducida por tratamientos de quimioterapia.<sup>70</sup>

Este enorme potencial terapéutico del SCE está siendo aprovechado en la actualidad desde dos vertientes. Por un lado, la utilización de agonistas directos permite activar el SCE eficazmente, pero esta activación es general y sostenida en el tiempo y, por tanto, está provista de ciertos efectos colaterales indeseables. Dentro de dichos efectos son especialmente importantes tanto la posible inducción de efectos psicotrópicos mediados por

<sup>65</sup> (a) Véase nota 29(a). (b) Walker, J. M.; Huang, S. M. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *95*, 127. (c) Fernández-Ruiz, J.; Berrendero, F.; Hernández, M. L.; Ramos, J. A. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 14. (d) Véase nota 35(a). (e) Brown, S. P.; Brenowitz, S. D.; Regehr, W. G. *Nat. Neurosci.* **2003**, *6*, 1048. (f) Melis, M.; Pistis, M.; Perra, S.; Muntoni, A. L.; Pillolla, G.; Gessa, G. L. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 53. (g) Marsicano, G.; Wotjak, C. T.; Azad, S. C.; Bisogno, T.; Rammes, G.; Cascio, M. G.; Hermann, H.; Tang, J.; Hofmann, C.; Zieglgänsberger, W.; Di Marzo, V.; Lutz, B. *Nature* **2002**, *418*, 530.

<sup>66</sup> (a) Di Marzo, V.; Goparaju, S. K.; Wang, L.; Liu, J.; Bátkai, S.; Jári, Z.; Fezza, F.; Miura, G. I.; Palmiter, R. D.; Sugiura, T.; Kunos, G. *Nature* **2001**, *410*, 822. (b) Giuffrida, A.; Piomelli, D. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *108*, 151. (c) Bifulco, M.; Di Marzo, V. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 547. (d) Walter, L.; Stella, N. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 775. (e) Hillard, C. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 27. (f) Hiley, C. R.; Ford, W. R. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2004**, *79*, 187. (g) Rayman, N.; Lam, K. H.; Laman, J. D.; Simons, P. J.; Lowenberg, B.; Sonneveld, P.; Delwel, R. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2111.

<sup>67</sup> (a) Véase nota 64(a). (b) Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 195. (c) Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Mechoulam, R.; Offen, D. *Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *93*, 66. (d) Di Marzo, V.; Hill, M. P.; Bisogno, T.; Crossman, A. R.; Brotchie, J. M. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1432. (e) Pertwee, R. G. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *95*, 165. (f) Lastres-Becker, I.; Bizat, N.; Boyer, F.; Hantraye, P.; Brouillet, E.; Fernández-Ruiz, J. *NeuroReport* **2003**, *14*, 813. (g) Glass, M.; Van Dellen, A.; Blakemore, C.; Hannan, A. J.; Faull, R. L. *Neuroscience* **2004**, *123*, 207.

<sup>68</sup> (a) Galve-Roperh, I.; Sánchez, C.; Cortés, M. L.; Gómez del Pulgar, T.; Izquierdo, M.; Guzmán, M. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 313. (b) Guzmán, M. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 745.

<sup>69</sup> (a) Mechoulam, R.; Panikashvili, D.; Shohami, E. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 58. (b) Mauler, F.; Horvath, E.; De Vry, J.; Jager, R.; Schwarz, T.; Sandmann, S.; Weinz, C.; Heinig, R.; Botthcher, M. *CNS Drug Rev.* **2003**, *9*, 343.

<sup>70</sup> (a) Calignano, A.; Kátón, I.; Désarnaud, F.; Giuffrida, A.; La Rana, G.; Mackie, K.; Freund, T. F.; Piomelli, D. *Nature* **2000**, *408*, 96. (b) Jarvinen, T.; Pate, D. W.; Laine, K. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *95*, 203. (c) Véase nota 29(a). (d) Véase nota 65(b). (e) Piomelli, D.; Giuffrida, A.; Calignano, A.; Rodríguez de Fonseca, F. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 218.

la activación directa de los receptores CB<sub>1</sub> cerebrales, como, por otro lado, la generación de efectos opuestos a los originalmente buscados debido a la dualidad de acción que en numerosas ocasiones presenta la activación del SCE. En este sentido se ha descrito cómo a corto plazo o en determinadas zonas la activación del SCE puede producir un cierto efecto mientras que a largo plazo o en otras zonas esta activación puede tener consecuencias diferentes e incluso opuestas a las anteriores.<sup>71</sup>

La forma de restringir la activación del SCE únicamente a sus efectos beneficiosos reside en activar éste de una forma fisiológica, es decir, mediante el empleo de agonistas indirectos, que son compuestos capaces de inhibir la degradación de los endocannabinoides tales como inhibidores de la FAAH o de la recaptación de anandamida.<sup>72</sup> La administración de estos agentes permitirá activar el SCE sólo en aquellas zonas en las que fisiológicamente se encuentre activado y de una forma espacial y temporalmente controladas. Sin embargo, mientras que se han descrito compuestos capaces de inhibir la FAAH de una forma potente y selectiva,<sup>73</sup> apenas se han llevado a cabo estudios completos de relación estructura-actividad dirigidos a la obtención racional de compuestos capaces de inhibir la recaptación de anandamida.<sup>74</sup> Por tanto, la síntesis de este tipo de compuestos constituye un campo que ha suscitado un enorme interés durante los últimos años y que ha supuesto al mismo tiempo un gran reto, debido a la escasez de datos disponibles sobre el transporte de anandamida. Aún hoy, y a pesar del enorme esfuerzo realizado, el transportador no ha sido caracterizado a nivel molecular, a diferencia de lo que ocurre con los

receptores o con la FAAH, por lo que no se conoce su secuencia de aminoácidos ni tampoco su estructura, todo lo cual dificulta enormemente el desarrollo de nuevos compuestos capaces de inhibir la recaptación de anandamida.

A pesar de esta dificultad, la potencial aplicabilidad terapéutica de estos compuestos continúa impulsando la síntesis de este tipo de inhibidores, ya que podrían convertirse en compuestos de enorme utilidad para el tratamiento de patologías asociadas a una hipofunción del SCE y, en general, de todos aquellos desórdenes donde los cannabinoides han demostrado su utilidad evitando, simultáneamente, la aparición de efectos secundarios indeseables, tanto psicotrópicos como derivados de la activación generalizada y sostenida en el tiempo.<sup>75</sup>

En particular, se ha postulado una prometedora aplicabilidad terapéutica de los inhibidores de la recaptación de anandamida en el tratamiento de la nocicepción,<sup>76</sup> de diversos procesos tumorales,<sup>77</sup> de desórdenes motores tales como los que caracterizan al síndrome de Tourette<sup>78</sup> y a otras enfermedades neurodegenerativas de elevada incidencia en la población y que aún carecen de un tratamiento adecuado, entre las que se incluyen la esclerosis múltiple,<sup>79</sup> las enfermedades de Parkinson<sup>80</sup> y Alzheimer<sup>81</sup> y el corea de Huntington.<sup>82</sup>

<sup>71</sup> Mechoulam, R.; Lichtman, A. H. *Science* **2003**, *302*, 65.

<sup>72</sup> (a) Véase nota 70(e). (b) Gaetani, S.; Cuomo, V.; Piomelli, D. *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*, 474.

<sup>73</sup> (a) Véase nota 52. (b) Cravatt, B. F.; Lichtman, A. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 469.

<sup>74</sup> (a) Piomelli, D.; Beltramo, M.; Glasnapp, S.; Lin, S. Y.; Goutopoulos, A.; Xie, X.-Q.; Makriyannis, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5802. (b) Jarrahian, A.; Manna, S.; Edgmond, W. S.; Campbell, W. B.; Hillard, C. J. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 2597.

<sup>75</sup> Véase nota 71.

<sup>76</sup> Véase nota 70(e).

<sup>77</sup> (a) Maccarrone, M.; Lorenzon, T.; Bari, M.; Melino, G.; Finazzi-Agrò, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31938. (b) Jacobsson, S. O. P.; Wallin, T.; Fowler, C. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 951.

<sup>78</sup> Véase nota 70(e).

<sup>79</sup> Baker, D.; Pryce, G.; Croxford, J. L.; Brown, P.; Pertwee, R. G.; Makriyannis, A.; Khanolkar, A.; Layward, L.; Fezza, F.; Bisogno, T.; Di Marzo, V. *FASEB J.* **2001**, *15*, 300.

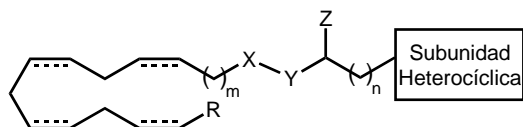
<sup>80</sup> Beltramo, M.; Rodríguez de Fonseca, F.; Navarro, M.; Calignano, A.; Gorriti, M. A.; Grammatikopoulos, G.; Sadile, A. G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 3401.

<sup>81</sup> Véase nota 64(a).

<sup>82</sup> Lastres-Becker, I.; Hansen, H. H.; Berrendero, F.; de Miguel, R.; Pérez-Rosado, A.; Manzanares, J.; Ramos, J. A.; Fernández-Ruiz, J. J. *Synapse* **2002**, *44*, 23.

Dentro de este contexto y con objeto de evaluar los rasgos estructurales óptimos que gobiernan la interacción entre el transportador y sus sustratos se enmarca la realización del presente proyecto de investigación, basado fundamentalmente en el diseño, síntesis y evaluación bioquímica de una serie de derivados de ácidos grasos de fórmula general I derivatizados como ésteres, amidas y compuestos relacionados que contengan un heterociclo en su estructura con el fin de obtener nuevos inhibidores de la recaptación de anandamida más potentes y selectivos.

Estos inhibidores permitirán estudiar y clarificar el actualmente debatido proceso de transporte y recaptación de anandamida, comprobar que la inhibición de la recaptación de anandamida constituye realmente un abordaje terapéutico eficaz para el tratamiento de ciertas patologías y, por último, que la utilización de este tipo de agonistas indirectos es capaz de mimetizar de forma efectiva los efectos terapéuticos exhibidos por agonistas directos y, por tanto, que podrían ser utilizados como fármacos eficaces.







## 2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental del presente trabajo es la síntesis y desarrollo de nuevos inhibidores del proceso de recaptación de anandamida con una elevada potencia y selectividad frente al resto de proteínas que constituyen el SCE que permitan el estudio y clarificación del proceso de recaptación de anandamida así como la evaluación de su potencial terapéutico.

La consecución final de este objetivo implica las siguientes etapas:

1. Síntesis de los nuevos derivados de ácido graso de estructura general I.

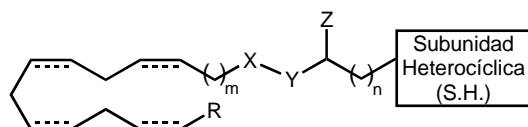
2. Determinación de la capacidad para inhibir la recaptación de anandamida de los compuestos sintetizados.

3. Determinación de la selectividad de los compuestos sintetizados frente a los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, la enzima FAAH y los receptores de vanilloides VR<sub>1</sub>.

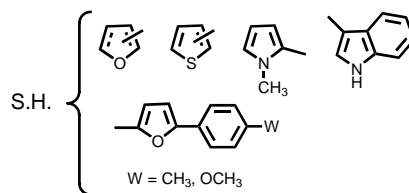
4. Estudio cualitativo de la relación estructura-actividad.

5. Estudio del proceso de recaptación de anandamida utilizando el inhibidor óptimo.

6. Evaluación de la capacidad terapéutica del inhibidor óptimo como fármaco para el tratamiento de la esclerosis múltiple utilizando para ello el modelo de infección con el virus de Theiler.



X = CO, CH<sub>2</sub>  
Y = O, S, NH, N-CH<sub>3</sub>  
Z = H, CH<sub>3</sub>, =O  
R = H, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>  
m = 3, 4; n = 0, 1





### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. EL PROCESO DE RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA

El SCE representa una de las aportaciones más novedosas realizadas en los últimos años a los sistemas de señalización fisiológicos. El hecho de que los ligandos endógenos de este sistema presenten una naturaleza lipídica de derivados de ácidos grasos frente a la estructura característica de aminos biogénicas, aminoácidos o péptidos, mensajeros clásicos de los sistemas tradicionales de señalización, ha generado un creciente interés en la biología de los lípidos. Así, la importancia de éstos como moléculas señalizadoras ha ido en aumento, dejando de ser considerados como biomoléculas con función meramente estructural o de almacenamiento de energía.

Sin embargo, ha sido precisamente esta naturaleza lipídica la que en ocasiones ha incrementado la dificultad en el estudio del SCE, haciendo necesario el desarrollo de nuevas técnicas experimentales y demandando la propuesta de nuevas hipótesis, diferentes a las válidas y aceptadas para las vías clásicas de señalización tradicionalmente conocidas, que permitan explicar y racionalizar el funcionamiento de este nuevo sistema.

Uno de estos puntos fundamentales lo constituye el sistema de inactivación de los endocannabinoides, y, en concreto, el de la anandamida, como el ligando cannabinoide endógeno más representativo. Así, la definición de los endocannabinoides como moléculas señalizadoras y reguladoras de un elevado número de funciones fisiológicas, requiere la existencia de unos mecanismos específicos tanto de biosíntesis como de degradación.

Respecto a los elementos de inactivación, está claro el papel fundamental ejercido por la enzima FAAH, responsable de la hidrólisis final de la anandamida. Sin embargo, la localización intracelular de esta enzima sugiere la existencia de mecanismos que faciliten el

acceso de la anandamida al interior celular. Por otro lado, la presencia de tales mecanismos no resulta extraña, considerando los precedentes ampliamente conocidos sobre la existencia de los transportadores de neurotransmisores tales como la serotonina o la dopamina, entre otros. Sin embargo, la naturaleza lipofílica de la anandamida permite que esta molécula pueda atravesar la membrana citoplasmática mediante un mecanismo de difusión simple y aunque se han descrito transportadores de membrana de moléculas lipídicas<sup>83</sup> tales como diversos ácidos poliinsaturados o prostaglandinas (PGs), estas evidencias no son aún aceptadas de forma completamente concluyente.<sup>84</sup>

En el caso concreto de la anandamida, distintos estudios han descrito la existencia de una proteína con función transportadora de anandamida, aunque siempre basados únicamente en evidencias farmacológicas indirectas tales como la saturabilidad del proceso, su dependencia con la temperatura y su especificidad estructural.<sup>85</sup> Sin embargo, estas evidencias distan mucho de ser concluyentes, habiéndose descrito diferentes hipótesis alternativas.<sup>86</sup> En un intento de clarificar este panorama, el desarrollo de inhibidores selectivos de la recaptación de anandamida ha generado un enorme interés, con el doble objetivo de obtener información acerca del funcionamiento y localización del hipotético transportador así como de obtener compuestos con una potencial aplicabilidad terapéutica.

---

<sup>83</sup> (a) Schaffer, J. E.; Lodish, H. F. *Cell* **1994**, *79*, 427. (b) Kanai, N.; Lu, R.; Satriano, J. A.; Bao, Y.; Wolkoff, A. W.; Schuster, V. L. *Science* **1995**, *268*, 866.

<sup>84</sup> (a) Véase nota 22. (b) Hamilton, J. A. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 467. (c) Abumrad, N.; Coburn, C.; Ibrahim, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1441*, 4. (d) McArthur, M. J.; Atshaves, B. P.; Frolov, A.; Foxworth, W. D.; Kier, A. B.; Schroeder, F. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1371.

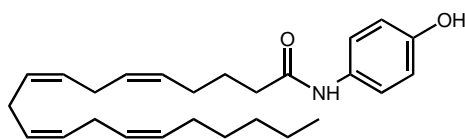
<sup>85</sup> (a) Véase nota 38. (b) Véase nota 48.

<sup>86</sup> Véase nota 57.

### 3.1.1. Inhibidores de la recaptación de anandamida

El primer paso en el estudio de un proceso mediado por una proteína de la cual no se dispone de información a nivel molecular reside en encontrar inhibidores potentes y selectivos del proceso objeto de estudio. La disponibilidad de este tipo de compuestos permitirá obtener información acerca del funcionamiento, localización e implicaciones fisiológicas de la proteína en cuestión.

De entre los compuestos capaces de inhibir el transporte de anandamida ha sido el AM404,<sup>87</sup> descrito por vez primera en 1997, el que ha permanecido prácticamente hasta nuestros días como el más potente y representativo. Sin embargo, y debido al creciente interés despertado por el sistema de recaptación, numerosos grupos de investigación han tratado de desarrollar nuevos inhibidores de mayor potencia y selectividad.



AM404

Con el fin de esclarecer los requisitos estructurales necesarios para inhibir la recaptación de anandamida, durante los últimos años se han llevado a cabo diversas modificaciones y analizado los efectos que estas variaciones producen en la capacidad inhibitoria de los compuestos obtenidos, dando lugar a varios estudios de relación estructura-actividad (SAR).<sup>88</sup>

Tanto en la estructura de la anandamida como en la del 2-araquidonilglicerol se han definido tres puntos farmacofóricos potenciales (Figura 4): i) la cadena

hidrocarbonada, ii) el grupo carboxamido/carboxilato y iii) el grupo polar situado en el extremo de la molécula. Estos puntos han sido objeto de diversas modificaciones estructurales originando nuevos compuestos con diferentes capacidades inhibitorias.<sup>89</sup>

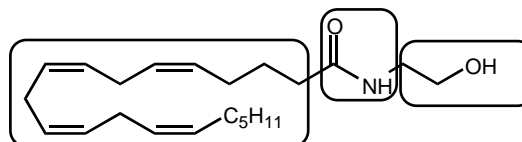


Figura 4. Puntos farmacofóricos de la anandamida

Así, las modificaciones llevadas a cabo en la cadena lateral hidrocarbonada, han puesto de manifiesto que para inhibir eficazmente la recaptación de anandamida, las moléculas deben tener al menos una insaturación de estereoquímica *cis* situada en el centro de la cadena. Cadenas laterales completamente saturadas, de once a veinte átomos de carbono, o con insaturaciones *trans*, no son reconocidas. Además, existen requerimientos adicionales para permitir la translocación, de modo que sólo compuestos cuya cadena lateral presenta cuatro insaturaciones *cis* son óptimamente transportados al interior celular; moléculas con un menor número de insaturaciones son reconocidas pero no transportadas o son transportadas muy lentamente. Este hecho ha sido explicado por la existencia de diferencias conformacionales impuestas por la longitud de la cadena y por la estereoquímica y número de dobles enlaces.<sup>90</sup>

En relación al grupo amida, su sustitución por los ésteres isómeros correspondientes conduce, en la mayoría de los casos, a compuestos con una capacidad inhibitoria similar. Por otro lado, el efecto de la sustitución en el nitrógeno amídico ha sido también evaluado, observándose que amidas primarias, secundarias e

<sup>87</sup> Véase nota 48(a).

<sup>88</sup> (a) Véase nota 74. (b) De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Davis, J. B.; Pertwee, R. G.; Di Marzo, V. *FEBS Lett.* 2000, 483, 52.

<sup>89</sup> Véase nota 56(b).

<sup>90</sup> (a) Véase nota 74(a). (b) Reggio, P. H.; Traore, H. *Chem. Phys. Lipids* 2000, 108, 15.

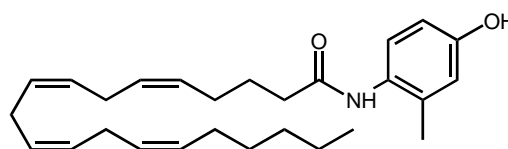
incluso terciarias son capaces de inhibir el transporte de anandamida, aunque con distinta potencia.<sup>91</sup>

Por último, las modificaciones realizadas en el extremo polar de la molécula, donde se ha sustituido el fragmento de etanolamina de la anandamida por distintos grupos, incluyendo una enorme variedad de sustituyentes alifáticos, cíclicos, aromáticos y heteroaromáticos, han permitido extraer una serie de conclusiones. Así, entre las consideraciones más relevantes, destaca el hecho de que la presencia de un grupo polar en el extremo, aunque no necesariamente dador de enlace de hidrógeno, favorece la capacidad inhibitoria de los sustratos. Además, la presencia en esta posición de grupos voluminosos o aromáticos contribuye también a disminuir la internalización de anandamida. Por otro lado, la existencia de grupos electrodonadores en el extremo favorece las interacciones con el hipotético transportador, aunque esta interacción es extremadamente sensible a la orientación y posición de dicho grupo, exhibiendo una enorme regioselectividad. También se ha evaluado el efecto de la estereoquímica de los compuestos en aquellas moléculas que presentan centros quirales, observándose una discriminación entre diferentes configuraciones absolutas y encontrando que los enantiómeros *S* son más potentes que los correspondientes de la serie *R* y que la preferencia enantiomérica es la misma que la mostrada por la FAAH pero contraria a la exhibida por los receptores de cannabinoides.<sup>92</sup>

Entre la amplia variedad estructural de compuestos cuya capacidad para inhibir la recaptación de anandamida ha sido estudiada, destacan cuatro inhibidores que pueden considerarse como los más representativos. Así, junto con el AM404, merecen especial atención los compuestos VDM11, SKM4451 y *N*-(3-piridil)araquidonamida.

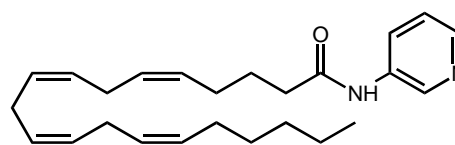
El AM404 (página 24) muestra una gran potencia para inhibir la recaptación de anandamida ( $CI_{50} = 2,2 \pm 0,2 \mu M$ ) al mismo tiempo que una relativa selectividad, ya que este compuesto presenta muy baja afinidad por los receptores de cannabinoides.<sup>93</sup> Sin embargo, diversos estudios indican que es capaz de inhibir la enzima FAAH así como activar los receptores de vanilloides VR<sub>1</sub>.<sup>94</sup>

El VDM11 ha sido también caracterizado como un inhibidor del transporte de anandamida ( $CI_{50} = 10,2 \pm 1,3 \mu M$ ) que carece de afinidad sobre los receptores CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub> y VR<sub>1</sub>.<sup>95</sup>



VDM11

A su vez, la *N*-(3-piridil)araquidonamida ha demostrado también una elevada capacidad para inhibir la recaptación de anandamida ( $CI_{50} = 4,8 \pm 1,1 \mu M$ ) siendo inactiva sobre el receptor CB<sub>1</sub> aunque no totalmente selectiva con respecto a la FAAH, sobre la que ejerce un efecto inhibitorio ( $CI_{50} = 1,2 \mu M$ ).<sup>96</sup>

*N*-(3-Piridil)araquidonamida

<sup>91</sup> Véase nota 74(a).

<sup>92</sup> (a) Véase nota 74. (b) Khanolkar, A. D.; Makriyannis, A. *Life Sci.* **1999**, *65*, 607.

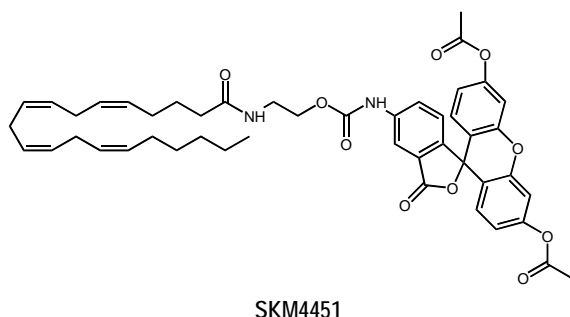
<sup>93</sup> (a) Véase nota 48(a). (b) Véase nota 74(a).

<sup>94</sup> (a) Véase nota 58. (b) Véase nota 88(b). (c) Zygmunt, P. M.; Chuang, H.-h.; Movahed, P.; Julius, D.; Högestätt, E. D. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *396*, 39. (d) Véase nota 32(c).

<sup>95</sup> Véase nota 88(b).

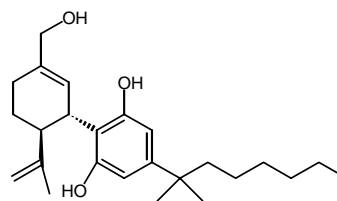
<sup>96</sup> Véase nota 74(b).

El SKM4451, además de mostrar unas interesantes características [ $CI_{50}$  (Recaptación de anandamida) =  $7,8 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ,  $CI_{50}$  (FAAH) >  $10 \mu\text{M}$ ,  $K_i$  ( $CB_1$ ) >  $3000 \text{ nM}$ ] tiene la ventaja adicional de presentar fluorescencia,<sup>97</sup> lo que podría abrir un campo de potenciales aplicaciones experimentales.



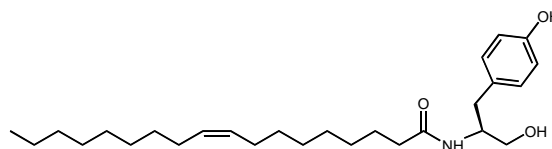
Posteriormente se han evaluado como inhibidores de la recaptación de anandamida diversos compuestos con estructuras de *N*-acildopamina o derivados del cannabidiol. Sin embargo, ninguno de ellos ha mostrado mayor potencia y/o selectividad que los compuestos anteriormente descritos. Así, la *N*-acildopamina más potente, la *N*-araquidonildopamina (página 7), sólo es capaz de inhibir la recaptación de anandamida con una modesta potencia ( $CI_{50} = 17,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ) y baja selectividad [ $CI_{50}$  (FAAH) =  $22 \pm 5 \mu\text{M}$ ,  $K_i$  ( $CB_1$ ) >  $800 \text{ nM}$ ].<sup>98</sup>

Respecto a los derivados del cannabidiol estudiados, el más potente resultó ser el (+)-7-hidroxi-5'-dimetilheptilcannabidiol ( $CI_{50} = 7,0 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ), aunque este compuesto presentaba una alta afinidad por los receptores de cannabinoides [ $K_i$  ( $CB_1$ ) =  $2,5 \text{ nM}$ ;  $K_i$  ( $CB_2$ ) =  $44 \text{ nM}$ ].<sup>99</sup>



(+)-7-Hidroxi-5'-dimetilheptilcannabidiol

Por último, sólo muy recientemente, se ha descrito una nueva serie de derivados del ácido oleico que son capaces de inhibir la recaptación de anandamida con elevada potencia y selectividad. Dentro de este grupo de compuestos destaca el OMDM1 como el más potente ( $CI_{50} = 2,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) y selectivo frente a la enzima FAAH ( $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ ) y los receptores  $CB_1$  ( $K_i = 12,1 \pm 1,3 \mu\text{M}$ ) y  $VR_1$  ( $CE_{50} > 10 \mu\text{M}$ ).<sup>100</sup>



OMDM1

### 3.1.2. Distribución tisular

El transporte de anandamida ha sido estudiado y caracterizado en una gran diversidad de líneas celulares y tejidos, tanto centrales como periféricos.

Así, dentro del SNC, el transporte de anandamida se ha caracterizado en neuronas corticales y cerebelares,<sup>101</sup> en cultivos primarios de astrocitos<sup>102</sup> y también en las líneas celulares C6<sup>103</sup> (glioma de rata),

<sup>97</sup> Muthian, S.; Nithipatikom, K.; Campbell, W. B.; Hillard, C. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 289.

<sup>98</sup> Bisogno, T.; Melck, D.; Bobrov, M. Y.; Gretskey, N. M.; Bezuglov, V. V.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 817.

<sup>99</sup> Bisogno, T.; Hanuš, L.; De Petrocellis, L.; Tchilibon, S.; Ponde, D. A.; Brandl, I.; Schiano-Moriello, A.; Davis, J. B.; Mechoulam, R.; Di Marzo, V. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 845.

<sup>100</sup> Ortar, G.; Ligresti, A.; De Petrocellis, L.; Morera, E.; Di Marzo, V. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1473.

<sup>101</sup> Véase nota 48.

<sup>102</sup> Véase nota 48(a).

<sup>103</sup> Véase nota 59(c).

N18TG2<sup>104</sup> y CHP100<sup>105</sup> (neuroblastoma de ratón y humano, respectivamente) así como CCF-STTG1<sup>106</sup> (astrocitoma humano).

Por otro lado, en tejidos periféricos, el transporte de anandamida se ha estudiado en células endoteliales<sup>107</sup> y también en el sistema inmune. Dentro de éste, ha sido caracterizado en plaquetas humanas<sup>108</sup> (aunque, sorprendentemente, parece estar ausente en plaquetas de conejo<sup>109</sup>) y en distintas líneas celulares, tales como la línea celular de rata RBL-2H3<sup>110</sup> y en la de linfoma humano U937<sup>111</sup> así como en macrófagos pertenecientes a la línea celular J774.<sup>112</sup>

Aunque las propiedades cinéticas y farmacológicas del sistema de recaptación de endocannabinoides son similares en las distintas subpoblaciones celulares, existen ciertas diferencias en los valores de sus parámetros cinéticos. Así, los valores de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) y de la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) difieren en función del tejido considerado. Este cierto grado de variabilidad podría deberse a la existencia de diversos subtipos de proteínas transportadoras dependiendo de su localización en el organismo.

### 3.1.3. Caracterización bioquímica

La existencia de un transportador específico para anandamida fue sugerida por vez primera en 1994,<sup>113</sup> aunque no fue hasta 1997 cuando se obtuvieron las primeras evidencias experimentales claras acerca de su presencia. Así, se describió la existencia de un fenómeno de transporte de anandamida tanto en neuronas como en astrocitos que verificaba las principales características de un transporte facilitado. Es decir, se trataba de un transporte rápido, saturable, específico, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio y de ATP.<sup>114</sup>

La especificidad del transportador, uno de los criterios clave que caracteriza un proceso de transporte facilitado, fue determinada estudiando la capacidad de otros sustratos estructuralmente similares a la anandamida para ser recaptados por este transportador. En concreto, la falta de capacidad de otras *N*-acetilcolaminas (NAEs) para inhibir la recaptación de anandamida, puso de manifiesto la especificidad de dicho proceso por la anandamida. De la misma manera, sustratos alternativos tales como el ácido araquidónico o metabolitos derivados -ácidos hidroxi- o epoxyicosatetraenoicos- u otros icosanoides -como PGs, leucotrienos (LTs) o tromboxanos (TXs)- o incluso derivados hidroxilados de la propia anandamida, no resultaron tampoco capaces de competir con el proceso de recaptación de anandamida.<sup>115</sup>

La siguiente etapa en la caracterización del transportador consistía en determinar sus condiciones de inhibición. Si es cierto que existe una proteína que media de forma específica el transporte de anandamida a través de la membrana, debe ser posible inhibir esta recaptación mediante el uso de agentes concretos, los cuales, además de confirmar la existencia de dicha proteína transportadora, servirían para obtener más información sobre su naturaleza. Sucesivos estudios determinaron

---

<sup>104</sup> Deutsch, D. G.; Chin, S. A. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 791.

<sup>105</sup> Véase nota 55(a).

<sup>106</sup> Véase nota 59(a).

<sup>107</sup> Véase nota 55(b).

<sup>108</sup> Véase nota 59(b).

<sup>109</sup> Fasía, L.; Karava, V.; Sifaká-Kapadai, A. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 3498.

<sup>110</sup> (a) Rakhshan, F.; Day, T. A.; Blakely, R. D.; Barker, E. L. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 960. (b) Jacobsson, S. O. P.; Fowler, C. J. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 1743.

<sup>111</sup> Véase nota 55(a).

<sup>112</sup> Bisogno, T.; Maurelli, S.; Melck, D.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3315.

---

<sup>113</sup> Véase nota 38.

<sup>114</sup> Véase nota 48.

<sup>115</sup> (a) Véase nota 48. (b) Véase nota 56(a).

que el transporte de anandamida era insensible a agentes capaces de inhibir otros transportadores de moléculas de naturaleza lipídica, siendo sensible, sin embargo, a la acción del NO así como de agentes alquilantes. Así, el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), agente alquilante no específico, era capaz de bloquear parcialmente el transporte de anandamida, mientras que el tratamiento con donadores de NO tales como el nitroprusiato sódico (SNP) producía su estimulación. El efecto de ambos compuestos, SNP y PMSF, se justificó basándose en la existencia de una interacción específica de estos derivados con un residuo clave de cisteína situado en el sitio activo del transportador.<sup>116</sup> Por otro lado, recientemente se ha descrito la capacidad del etanol para modificar la recaptación de anandamida. Así, en neuronas granulares de cerebelo, la administración de etanol, tanto crónica como aguda, ejerce un efecto inhibitorio sobre la recaptación de anandamida.<sup>117</sup>

Sin embargo, la descripción del acoplamiento entre los procesos de recaptación de anandamida y su hidrólisis subsiguiente por la FAAH,<sup>118</sup> hace surgir alguna duda en la interpretación de los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta que el PMSF es un inhibidor de la FAAH, el efecto producido por el PMSF en la recaptación podría deberse realmente a una inactivación directa de la proteína transportadora o bien a un efecto indirecto, consecuencia de la capacidad inhibitoria del PMSF sobre la FAAH. Sin embargo, en el caso del etanol, éste parece afectar selectivamente a la recaptación de anandamida, sin ejercer ningún efecto apreciable en la actividad de la FAAH.

En cualquier caso, el fenómeno de acoplamiento entre el transporte de anandamida y la FAAH puede revestir especial importancia y por tanto su contribución debe ser analizada cuidadosamente. Es importante

establecer si el efecto de aumento de anandamida extracelular inducido por un compuesto determinado se debe a su acción específica de inhibición del transportador o debe realmente atribuirse a su interacción con la enzima. En este sentido, un inhibidor de la FAAH produciría un aumento en la concentración de anandamida intracelular, puesto que ésta será recaptada pero no hidrolizada, de modo que el gradiente de anandamida tenderá a desaparecer y, por tanto, el efecto neto observado será el aumento de anandamida extracelular, que también sería producido por un inhibidor selectivo de la recaptación de anandamida. De aquí surge el interés en conocer la selectividad de los inhibidores del transportador frente a la enzima, para así poder asegurar de forma inequívoca que el efecto observado se debe de forma exclusiva a una interacción directa sobre el transporte de anandamida y no está siendo afectado por procesos indirectos.

#### 3.1.4. Naturaleza del transporte de anandamida

Basándonos en todos los datos anteriores, la existencia del transportador de anandamida ha permanecido aceptada de forma general hasta la fecha. Sin embargo, el hecho de que hasta la actualidad el presunto transportador no se haya aislado y caracterizado molecularmente y que todas las evidencias disponibles sean indirectas y compatibles con hipótesis alternativas, ha contribuido a crear una creciente controversia acerca de la existencia o no del transportador de anandamida y de su auténtica naturaleza.

En este sentido, tanto la dependencia de la temperatura como la saturabilidad exhibidas por la recaptación de anandamida, características que apoyan que sea un proceso mediado por una proteína específica, se observarían también en el caso de que el transporte de anandamida fuera un proceso de difusión simple a través de la membrana. En particular, la temperatura es un factor que afecta de forma notable a la fluidez de las membranas biológicas y, por tanto, a los fenómenos de

<sup>116</sup> Véase nota 55.

<sup>117</sup> Basavarajappa, B. S.; Saito, M.; Cooper, T. B.; Hungund, B. L. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *466*, 73.

<sup>118</sup> Véase nota 54.



transporte en que éstas están implicadas. Respecto a la saturabilidad, otra de las características clave de un proceso de difusión facilitada, podría reflejar simplemente el límite de solubilidad de la anandamida en el medio, fundamentalmente acuoso, o en la propia membrana. Finalmente, la inhibición farmacológica y la capacidad para discernir entre sustratos estructuralmente análogos que muestra el transporte de anandamida podría deberse a la inhibición no del propio transportador sino de alguna de las enzimas responsables del metabolismo posterior de la anandamida, como por ejemplo la FAAH, una vez que ésta se halla en el interior celular.

Todos estos puntos justifican plenamente la candente controversia generada en la actualidad acerca de la existencia o no del transportador de anandamida como entidad molecular independiente y de su auténtica naturaleza. Se han formulado diversas hipótesis, desde postular la existencia de un transportador específico de anandamida<sup>119</sup> hasta proponer que la recaptación de anandamida es realmente un proceso de difusión simple a través de la membrana seguido de hidrólisis por la FAAH, rechazándose la existencia de una proteína con función transportadora de anandamida.<sup>120</sup>

En particular, esta última hipótesis ha ido recibiendo una creciente atención ya que, además de resultar compatible con las evidencias disponibles hasta la fecha de dependencia de la temperatura, saturabilidad, inhibición farmacológica y especificidad estructural, se ha visto reforzada por el hecho de que todos los inhibidores desarrollados hasta hace muy poco presentaban potencias similares para inhibir el transporte de anandamida y la FAAH.<sup>121</sup> Por tanto, una de las cuestiones que ha despertado un mayor interés ha sido determinar si existe realmente un proceso de recaptación de anandamida independiente de la FAAH o, de forma más general, establecer hasta qué punto la FAAH influye

en el transporte de anandamida. Sin embargo, el estudio por separado de ambos procesos sólo puede llevarse a cabo de una forma completa mediante comparación directa del proceso de recaptación en presencia y ausencia de FAAH utilizando inhibidores de la recaptación de anandamida que muestren selectividad por este proceso frente a la enzima FAAH. En este contexto, la obtención del primer modelo de ratones a los que se les ha eliminado genéticamente la enzima FAAH, es decir, ratones FAAH<sup>-/-</sup> o ratones FAAH *knockout*<sup>122</sup> supone el primer paso para el desarrollo de este tipo de experimentos. La utilización de preparaciones provenientes de estos ratones junto con el desarrollo de inhibidores potentes y selectivos permitiría analizar ambos procesos por separado y establecer la contribución de la FAAH sobre el fenómeno de transporte de anandamida, contribuyendo a clarificar el proceso.

Por otro lado, las incógnitas sobre el proceso de recaptación de anandamida forman parte de un problema más extenso como es el transporte de esta amida y, en general, de las amidas bioactivas derivadas de ácidos grasos. Así, el movimiento de anandamida no se reduce exclusivamente al proceso de recaptación y, por tanto, a su paso a través de la membrana, sino que también engloba al movimiento de esta amida a través de medios acuosos. Con relación a este aspecto, tampoco se conoce aún con completa certeza el mecanismo del transporte de anandamida entre células vecinas, considerando la naturaleza acuosa del medio intercelular, ni tampoco del movimiento de la anandamida a través del citoplasma, también acuoso, por el cual debe difundir hasta alcanzar las membranas intracelulares donde se localiza la FAAH.

<sup>119</sup> (a) Véase nota 48. (b) Véase nota 54(a).

<sup>120</sup> Véase nota 58.

<sup>121</sup> (a) Véase nota 22. (b) Véase nota 58.

<sup>122</sup> Cravatt, B. F.; Demarest, K.; Patricelli, M. P.; Bracey, M. H.; Giang, D. K.; Martin, B. R.; Lichtman, A. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 9371.

### Movimiento extracelular

El movimiento de lípidos a través del medio extracelular requiere normalmente la ayuda de determinadas proteínas, denominadas *lipid binding proteins*, cuya función es unir estos lípidos y transportarlos a través del medio acuoso. Dentro de esta clase de proteínas transportadoras existe una enorme variedad, incluyendo desde la albúmina, especialmente abundante en el suero sanguíneo, hasta las especializadas lipocalinas. La albúmina es una de las proteínas que podría actuar periféricamente como transportador de la anandamida, facilitando su distribución a todo el organismo a través del torrente sanguíneo. De hecho, se ha descrito que la anandamida viaja a través del suero unida a la albúmina<sup>123</sup> y recientemente se ha estudiado el proceso y cinética de esta unión.<sup>124</sup> Por otra parte, se ha sugerido que el transporte de anandamida en el cerebro podría estar mediado por alguna proteína perteneciente a la familia de las lipocalinas.<sup>125</sup>

Las lipocalinas constituyen una familia de proteínas mayoritariamente extracelulares y de bajo peso molecular. Aunque sólo muestran un bajo grado de homología de secuencia que puede establecerse de forma general entre un 20-30%, sin embargo presentan la suficiente similitud en forma de motivos estructurales conservados de secuencias cortas como para que puedan considerarse como pertenecientes a la misma familia. Dentro de estas características, el aspecto más relevante son los dominios estructurales que les permiten reconocer y unir de manera específica moléculas pequeñas de carácter altamente hidrófobo.<sup>126</sup> Así, dentro de la familia de las lipocalinas destaca, como miembro prototípico, la proteína

plasmática de unión a retinol<sup>127</sup> aunque se han identificado también otras lipocalinas, como la inicialmente llamada Ch21, que ha pasado posteriormente a denominarse, de forma más general, proteína extracelular de unión de ácidos grasos. Esta proteína une específicamente ácidos grasos de cadena larga preferentemente insaturados, tales como el oleico, linoleico o araquidónico.<sup>128</sup> Además de estos sustratos, las lipocalinas pueden unir también otras moléculas tales como ciertos esteroides, feromonas y odorantes. Otros miembros de la familia de las lipocalinas con función transportadora son la globulina urinaria  $\alpha_2$ , la glicoproteína ácida  $\alpha_1$  o la microglobulina  $\alpha_1$ .<sup>129</sup> Sin embargo, y aunque su función principal se ha establecido como transportadora, ésta no es exclusiva ya que algunas lipocalinas juegan papeles fundamentales en otros procesos tales como la modulación del crecimiento celular y el metabolismo, la regulación de la respuesta inmune y algunos procesos alérgicos o el desarrollo neuronal.<sup>130</sup> Además, algunas lipocalinas pueden incluso ejercer funciones duales tales como la prostaglandina D sintasa, que tiene al mismo tiempo función enzimática y función transportadora y presenta una distribución mayoritaria en cerebro.<sup>131</sup>

### Movimiento a través de la membrana

Inicialmente el concepto de transportador de anandamida surgió para explicar el movimiento de este

<sup>123</sup> Giuffrida, A.; Rodríguez de Fonseca, F.; Nava, F.; Loubet-Lescoulié, P.; Piomelli, D. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *408*, 161.

<sup>124</sup> Bojesen, I. N.; Hansen, H. S. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 1790.

<sup>125</sup> Véase nota 37.

<sup>126</sup> Flower, D. R.; North, A. C. T.; Sansom, C. E. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 9.

<sup>127</sup> Newcomer, M. E.; Ong, D. E. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 57.

<sup>128</sup> (a) Cancedda, F. D.; Malpeli, M.; Gentili, C.; Di Marzo, V.; Bet, P.; Carlevaro, M.; Cermelli, S.; Cancedda, R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20163. (b) Cancedda, F. D.; Dozin, B.; Zerega, B.; Cermelli, S.; Gentili, C.; Cancedda, R. *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, *239*, 221.

<sup>129</sup> Åkerstrom, B.; Flower, D. R.; Salier, J.-P. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 1.

<sup>130</sup> (a) Véase nota 126. (b) Flower, D. R. *FEBS Lett.* **1994**, *354*, 7. (c) Sánchez, D.; Ganfornina, M. D.; Bastiani, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 102.

<sup>131</sup> Beuckmann, C. T.; Lazarus, M.; Gerashchenko, D.; Mizoguchi, A.; Nomura, S.; Mohri, I.; Uesugi, A.; Kaneko, T.; Mizuno, N.; Hayaishi, O.; Urade, Y. *J. Comp. Neurol.* **2000**, *428*, 62.

endocannabinoide a través de la membrana plasmática con objeto de que fuera consistente con los datos experimentales obtenidos de rapidez, saturabilidad y sensibilidad a determinados agentes farmacológicos. Además, este concepto contaba con el precedente conocido y ampliamente estudiado de la existencia de transportadores de membrana implicados en la recaptación de diversos neurotransmisores. Sin embargo, y aunque la primera hipótesis se planteó pensando en un mecanismo análogo a éste, los datos que se han ido obteniendo hasta la actualidad no son del todo compatibles con un sistema de este tipo. Por otro lado, también es importante considerar que la propia naturaleza físico-química de la anandamida, debido a su elevada lipofilia, no hace realmente necesaria la existencia de un mecanismo de este tipo, puesto que estrictamente es posible que la anandamida pueda acceder al interior celular simplemente mediante difusión a través de la membrana.

En conjunto, todas estas consideraciones están modificando la visión del transportador de anandamida haciendo necesario el desarrollo de nuevas hipótesis y provocando un enorme interés en esclarecer la relación exacta de la anandamida con los constituyentes de la membrana celular.

En concreto, una de las nuevas hipótesis que está despertando en la actualidad un mayor interés es la implicación en la recaptación de anandamida de los dominios de membrana conocidos como *lipid rafts*. En este sentido, un estudio muy reciente indica que el proceso de recaptación de anandamida podría tratarse en realidad de un fenómeno de endocitosis y que la anandamida se acumula de forma selectiva en los *lipid rafts* y esta acumulación es inhibida por el AM404.<sup>132</sup>

El término de *lipid rafts* (agrupamientos o agregados de lípidos, o, más literalmente, "balsas de lípidos") fue

descrito por vez primera a finales de la década de los noventa<sup>133</sup> y supuso una modificación importante a nivel conceptual del modelo de membrana generalmente aceptado del mosaico fluido formulado por Singer y Nicolson en la década de los setenta.<sup>134</sup> El modelo clásico del mosaico fluido establece que la membrana plasmática está compuesta por una bicapa lipídica en la cual flotan las proteínas. En este modelo las proteínas son las principales responsables de los fenómenos de señalización celular, mientras que la función de los lípidos es básicamente estructural y de soporte, constituyendo una base adecuada que dota a la membrana de la fluidez idónea para permitir movimientos de difusión lateral de las proteínas. Desde entonces, el conocimiento de la arquitectura espacio-temporal de la membrana ha despertado un enorme interés.<sup>135</sup> El importante número de estudios dirigidos a profundizar en este aspecto ha ido poniendo de manifiesto diversas características estructurales de las membranas celulares que no son plenamente compatibles con la descripción clásica del modelo del mosaico fluido, tales como la asimetría de la membrana o la existencia de cierto orden molecular de corto y largo alcance. En general estos estudios han revelado progresivamente el importante papel de los lípidos en determinados procesos de reconocimiento, interacción y señalización celular, funciones mucho más complejas que las meramente estructurales atribuidas inicialmente.

Dentro de los lípidos constituyentes de la membrana el colesterol es especialmente relevante, ya que las propiedades de las membranas biológicas dependen en gran medida de su contenido en este lípido. El colesterol no está distribuido al azar, sino que se encuentra mayoritariamente asociado a esfingolípidos, constituyendo agrupamientos cuyas propiedades difieren enormemente de las zonas adyacentes de la membrana.

<sup>132</sup> McFarland, M. J.; Porter, A. C.; Barker, E. L. Abstract # 3718. *Experimental Biology. Translating the Genome* 2003. (<http://www.biosis-select.org/faseb/data/FASEB003718.html>).

<sup>133</sup> Simons, K.; Ikonen, E. *Nature* 1997, 387, 569.

<sup>134</sup> Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* 1972, 175, 720.

<sup>135</sup> Edidin, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 414.

La mayoría de las células presentan al menos dos tipos distintos de microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos, denominados *lipid rafts* y *caveolas* (*caveolae*).

La definición de *lipid rafts* introduce por vez primera el concepto de la segregación de lípidos dentro de la propia membrana. Así, la membrana celular no presenta homogeneidad en su composición de lípidos, sino que se encuentra constituida por microdominios o agrupamientos dinámicos de determinados lípidos, mayoritariamente esfingolípidos y colesterol. Estos agregados son capaces de moverse en la membrana y tienen capacidad para, de forma selectiva, incluir o excluir determinadas proteínas.<sup>136</sup> El ensamblaje de péptidos y proteínas en dominios o agregados de la superficie de la membrana celular es de gran significación biológica porque se relaciona con la existencia de interacciones lípido-proteína. Estas interacciones juegan un papel fundamental dentro de la regulación de todo el conjunto de la señalización y comunicación celular y del control de las vías implicadas en el tráfico de moléculas entre las membranas de diversos compartimentos celulares.<sup>137</sup>

Estos agrupamientos lipídicos se aíslan de las membranas celulares aprovechando su insolubilidad frente a una extracción en frío con detergentes no iónicos, propiedad que permite purificarlos del resto de la membrana. De hecho, estos agrupamientos han sido clasificados en función de su solubilidad relativa en distintos detergentes, ya que el empleo de un tipo u otro de detergentes permite aislar diferentes subtipos de dominios que difieren en diversos aspectos tales como su densidad o composición de proteínas.<sup>138</sup>

La otra clase de microdominios existentes en la membrana celular, las *caveolas*, son invaginaciones

constituidas mayoritariamente por colesterol, esfingolípidos (como glicoesfingolípidos y esfingomielina) y una familia de proteínas denominadas genéricamente *caveolinas*. Estas invaginaciones, observables a microscopía electrónica y de un tamaño de alrededor de 50 nm, están presentes en muchos tipos celulares. Se caracterizan por estar recubiertas con heterooligómeros formados fundamentalmente por dos tipos de *caveolinas*, denominadas *caveolina-1* (CAV1) y *caveolina-2*, aunque también se ha identificado un tercer tipo, algo menos abundante que los dos anteriores, a la que se ha denominado *caveolina-3*.<sup>139</sup> La CAV1 es una proteína de unos 22 kDa con una zona central compuesta por un dominio hidrófobo formado por 33 aminoácidos que le permite asociarse a membranas.<sup>140</sup> Funciona como un transportador para el colesterol ya que una vez que éste es internalizado mediante endocitosis, la CAV1 es capaz de reconocer y unir al colesterol y transportarlo tanto intracelularmente como entre los compartimentos intracelulares y la membrana plasmática.<sup>141</sup>

En general, ambos tipos de agrupaciones, *caveolas* y *lipid rafts*, tienen en común una movilidad lateral reducida, una composición diferente del resto de la membrana y un enriquecimiento en proteínas de señalización. Sin embargo, difieren en estructura, estabilidad y contenido en proteínas asociadas. Los *lipid rafts* son dominios planares ricos en proteínas ancladas mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) y carecen de *caveolinas*, las proteínas estructurales características de las *caveolas*. Estos microdominios no son interconvertibles entre sí y tienen distintas funciones en

<sup>136</sup> Véase nota 133.

<sup>137</sup> (a) Edidin, M. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 492. (b) Binder, W. H.; Barragan, V.; Menger, F. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5802.

<sup>138</sup> (a) Chamberlain, L. H. *FEBS Lett.* **2004**, *559*, 1. (b) Radeva, G.; Sharom, F. J. *Biochem. J.* **2004**, doi: 10.1042/BJ20031348.

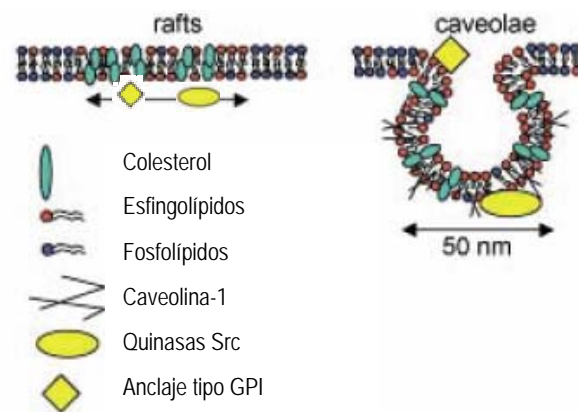
<sup>139</sup> (a) Carver, L. A.; Schnitzer, J. E. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 571. (b) Véase nota 137(b). (c) Marx, J. *Science* **2001**, *294*, 1862. (d) Williams, T. M.; Lisanti, M. P. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 214.

<sup>140</sup> (a) Rothberg, K. G.; Heuser, J. E.; Donzell, W. C.; Ying, Y.-S.; Glenney, J. R.; Anderson, R. G. W. *Cell* **1992**, *68*, 673. (b) Véase nota 137(b).

<sup>141</sup> (a) Anderson, R. G. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 199. (b) Robenek, M. J.; Severs, N. J.; Schlattmann, K.; Plenz, G.; Zimmer, K. P.; Troyer, D.; Robenek, H. *FASEB J.* **2004**, doi: 10.1096/fj.03-0782fje.

las células.<sup>142</sup> Además, otro aspecto diferencial importante es el hecho de que mientras las invaginaciones ricas en caveolina son observables mediante microscopía electrónica y están morfológicamente bien caracterizadas, la existencia o no de *lipid rafts* es un tema sujeto actualmente a un controvertido debate. Así, el empleo de distintas técnicas de microscopía, incluida la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), junto con agentes de entrecruzamiento deberían ser en teoría capaces de dirimir la existencia real o no de este tipo de agrupamientos de lípidos y determinar con claridad su tamaño y la proximidad de sus lípidos constituyentes. Sin embargo, puesto que las evidencias obtenidas no son completamente inequívocas, existe actualmente una falta de consenso en cuanto a la interpretación de los resultados disponibles hasta el momento.<sup>143</sup> A pesar de esto, la aplicación de nuevas técnicas, tales como la microscopía de dos fotones, ha permitido observar por vez primera una segregación de los lípidos de membrana en células vivas, resultado que apoya fuertemente la existencia de estos agregados lipídicos.<sup>144</sup> Adicionalmente, estudios recientes sobre la asociación selectiva del colesterol con fosfolípidos de cadena larga,<sup>145</sup> junto con la baja afinidad entre el colesterol y fosfolípidos que contienen ácido docosahexaenoico, postulado como posible mecanismo desencadenante de la formación de este tipo de dominios,<sup>146</sup> suponen un claro soporte adicional de la existencia de *lipid rafts*.

Ambos tipos de dominios, tanto caveolas como *lipid rafts*, están enriquecidos en moléculas implicadas en procesos de transducción de la señal, tales como receptores acoplados a proteínas G, tirosinas quinasas pertenecientes a la familia de la proteína Src y la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS).<sup>147</sup> La concentración de receptores para su interacción con moléculas de señalización podría permitir a estos dominios servir como plataformas de señalización,<sup>148</sup> pudiendo quizá tener esta función especial relevancia en el caso de los cannabinoides puesto que sus ligandos son moléculas de un elevado carácter lipídico y sus receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. En este contexto, se ha descrito recientemente la implicación de *lipid rafts* y del colesterol al menos en alguno de los efectos de la anandamida, como es la inducción de apoptosis en diversas líneas celulares.<sup>149</sup>



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura de los dominios enriquecidos en colesterol *lipid rafts* y caveolae

<sup>142</sup> Hong, S.; Huo, H.; Xu, J.; Liao, K. *Cell Death Differ.* **2004**, doi: 10.1038/sj.cdd.4401405.

<sup>143</sup> (a) Jacobson, K.; Dietrich, C. *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 87. (b) Munro, S. *Cell* **2003**, *115*, 377. (c) Zurzolo, C.; van Meer, G.; Mayor, S. *EMBO Reports* **2003**, *4*, 1117. (d) Edidin, M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 257. (e) Glebov, O. O.; Nichols, B. J. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 238. (f) Parton, R. G.; Hancock, J. F. *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 141.

<sup>144</sup> Gaus, K.; Gratton, E.; Kable, E. P. W.; Jones, A. S.; Gelissen, I.; Kritharides, L.; Jessup, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15554.

<sup>145</sup> Sugahara, M.; Uragami, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13040.

<sup>146</sup> Shaikh, S. R.; Cherezov, V.; Caffrey, M.; Stillwell, W.; Wassall, S. R. *Biochemistry* **2003**, *42*, 12028.

<sup>147</sup> (a) Smart, E. J.; Graf, G. A.; McNiven, M. A.; Sessa, W. C.; Engelman, J. A.; Scherer, P. E.; Okamoto, T.; Lisanti, M. P. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 7289. (b) Véase nota 137(b). (c) Véase nota 139(a).

<sup>148</sup> (a) Fielding, C. J.; Fielding, P. E. *Biochem. Soc. T.* **2004**, *32*, 65. (b) Gómez-Mouton, C.; Lacalle, R. A.; Mira, E.; Jiménez-Baranda, S.; Barber, D. F.; Carrera, A. C.; Martínez, A. C.; Manes, S. *J. Cell. Biol.* **2004**, *164*, 759.

<sup>149</sup> (a) Véase nota 33(c). (b) Véase nota 34.

Además de la ya mencionada posible importancia de los *lipid rafts* en la recaptación de anandamida,<sup>150</sup> no se puede descartar tampoco una hipotética implicación de las invaginaciones de caveolina, especialmente teniendo en cuenta que la internalización por este tipo de estructuras no está limitada a las macromoléculas, sino que pequeñas moléculas tales como el ácido fólico pueden ser recaptadas mediante este mecanismo.<sup>151</sup> Adicionalmente, la implicación de los *lipid rafts* en la regulación de los procesos de recaptación de neurotransmisores y de sus efectos sobre los transportadores de éstos acaba de ser comprobada en el caso concreto de la noradrenalina. Se ha descrito como la regulación de los niveles de la expresión del transportador de noradrenalina está mediada por *lipid rafts*.<sup>152</sup> Por tanto, todos estos datos en conjunto contribuyen a poner de manifiesto la potencial implicación que los microdominios de la membrana enriquecidos en colesterol, tanto caveolas como *lipid rafts*, podrían tener en el transporte y mecanismos de señalización de la anandamida a través de la membrana celular.

### Movimiento intracelular

Análogamente a lo que ocurre en el medio extracelular, es posible que la anandamida necesite de una proteína transportadora para moverse en el seno del citoplasma acuoso, ya que la anandamida debe viajar desde la membrana plasmática hasta las membranas intracelulares donde se localiza la FAAH para ser degradada. Teóricamente un mecanismo de este tipo también exhibiría las características de saturabilidad e inhibición por compuestos estructuralmente análogos descritas para el transporte de anandamida, siendo así consistente con los datos experimentales obtenidos hasta

la fecha. Además, la existencia de proteínas intracelulares con función transportadora de lípidos, capaces de reconocer, unir y transportar selectivamente moléculas pequeñas de elevado carácter hidrófobo, tales como ácidos grasos, colesterol, ceramida y otras moléculas lipídicas, entre los distintos compartimentos celulares, es un hecho bien constatado.<sup>153</sup> Por otro lado, también podrían jugar un papel importante alguna de las familias de proteínas transferidoras de lípidos tales como la prosaposina,<sup>154</sup> precursora de la familia de las saposinas,<sup>155</sup> y la proteína activadora GM2.<sup>156</sup> Estas proteínas, pertenecientes a la vía endocítica, se han caracterizado como proteínas transportadoras, capaces tanto de transferir lípidos entre distintas membranas celulares como de facilitar la interacción entre los sustratos lipídicos y las proteínas responsables de su metabolismo. Además, recientes estudios indican su implicación en un elevado número de procesos fisiológicos.<sup>157</sup>

Sin embargo, este planteamiento no deja de ser una mera hipótesis sobre la que aún no se dispone de ningún dato directo, ignorándose si alguna de las proteínas intracelulares con función transportadora de lípidos es también la responsable del movimiento de la anandamida o si se trata de otra proteína completamente nueva aún por identificar. Además, el mecanismo de funcionamiento de esta hipotética proteína tampoco se conoce, pudiendo

<sup>150</sup> Véase nota 132.

<sup>151</sup> Anderson, R. G. W.; Kamen, B. A.; Rothberg, K. G.; Lacey, S. W. *Science* **1992**, *255*, 410.

<sup>152</sup> Jayanthi, L. D.; Samuvel, D. J.; Ramamoorthy, S. *J. Biol. Chem.* **2004**, doi: 10.1074/jbc.M311172200.

<sup>153</sup> (a) Véase nota 141. (b) Balendiran, G. K.; Schnutgen, F.; Scapin, G.; Borchers, T.; Xhong, N.; Lim, K.; Godbout, R.; Spener, F.; Sacchettini, J. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27045. (c) Stremmel, W.; Pohl, L.; Ring, A.; Herrmann, T. *Lipids* **2001**, *36*, 981. (d) Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Miura, Y.; Kawano, M.; Fukasawa, M.; Nishijima, M. *Nature* **2003**, *426*, 803.

<sup>154</sup> Hiraiwa, M.; Soeda, S.; Kishimoto, Y.; O'Brien, J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11254.

<sup>155</sup> (a) Hiesberger, T.; Hüttler, S.; Rohlmann, A.; Schneider, W.; Sandhoff, K.; Herz, J. *EMBO J.* **1998**, *17*, 4617. (b) Ciaffoni, F.; Salvioli, R.; Tatti, M.; Arancia, G.; Crateri, P.; Vaccaro, A. M. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31583. (c) Ahn, V. E.; Faull, K. F.; Whitelegge, J. P.; Fluharty, A. L.; Privé, G. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 38.

<sup>156</sup> Wright, C. S.; Zhao, Q.; Rastinejad, F. *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 951.

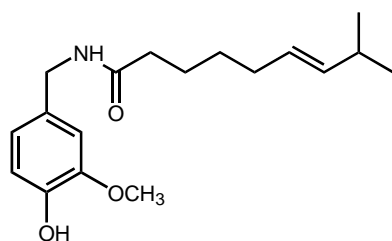
<sup>157</sup> Zhou, D.; Cantu III, C.; Sagiv, Y.; Schrantz, N.; Kulkarni, A. B.; Qi, X.; Mahuran, D. J.; Morales, C. R.; Grabowski, G. A.; Benlagha, K.; Savage, P.; Bendelac, A.; Teyton, L. *Science* **2004**, *303*, 523.

existir distintas posibilidades en función de la capacidad de dicha proteína para asociarse o no a las membranas, tanto plasmática como intracelulares, y a la capacidad de la anandamida para difundir lateralmente a través de las membranas hasta llegar a la FAAH y acceder al sitio catalítico de ésta a través del túnel que la estructura de esta enzima presenta.<sup>158</sup>

Considerando en conjunto todos los datos generados a lo largo de los últimos años sobre el estudio de los procesos de recaptación y transporte de la anandamida, en el momento presente existen muchas más hipótesis propuestas que evidencias firmes, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar estudios capaces de clarificar el movimiento de la anandamida y que permitan obtener alguna respuesta a las múltiples preguntas planteadas.

### 3.2. EL TRANSPORTE DE ENDOCANNABINOIDES Y EL RECEPTOR DE VANILLOIDES VR<sub>1</sub>

El receptor de vanilloides fue inicialmente identificado como el sitio de unión específico de la capsaicina, molécula responsable de la sensación ligeramente irritante característica del sabor picante de ciertos alimentos tales como el pimiento rojo (*Capsicum*).



Capsaicina

Hasta la fecha sólo se ha caracterizado en profundidad un subtipo del receptor de vanilloides, al que

se denominó VR<sub>1</sub><sup>159</sup> y el cual ha sido objeto de exhaustivos estudios. Sin embargo, la elevada diversidad de respuestas biológicas mediadas por los vanilloides apoya la existencia de una diversidad de isoformas y subtipos de dicho receptor aún no identificados.<sup>160</sup>

El receptor VR<sub>1</sub>, a diferencia de los receptores de cannabinoides, pertenece a la familia de los receptores de tipo canal iónico y, dentro de ellos, al subgrupo de los receptores de potencial transitorio (TRP).<sup>161</sup> De hecho, debido a esta característica y a la progresiva identificación de otros receptores estructural y funcionalmente relacionados, la intuitiva designación de VR<sub>1</sub> ha sido recientemente sustituida por TRPV1, con el doble objetivo de que la nomenclatura sea más sistemática y suministre la máxima información posible. En la actualidad, el subgrupo de receptores TRPV contiene al menos seis miembros diferentes identificados en mamíferos, todos los cuales funcionan como canales de calcio, aunque son activados por distintos estímulos.<sup>162</sup>

En particular, el receptor VR<sub>1</sub> es un canal de cationes que, sin ser totalmente selectivo, muestra una notable preferencia por los iones calcio. El receptor VR<sub>1</sub> es activado por la unión de sus ligandos específicos, a los que de forma genérica se les ha agrupado en el término vanilloides, así como por el calor (siendo necesario un estímulo que sobrepase el umbral del dolor, denominado *noxious heat*, establecido en unos 43 °C) y por un

<sup>159</sup> (a) Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. *Nature* **1997**, *389*, 816. (b) Hayes, P.; Meadows, H. J.; Gunthorpe, M. J.; Harries, M. H.; Duckworth, D. M.; Cairns, W.; Harrison, D. C.; Clarke, C. E.; Ellington, K.; Prinjha, R. K.; Barton, A. J. L.; Medhurst, A. D.; Smith, G. D.; Topp, S.; Murdock, P.; Sanger, G. J.; Terrett, J.; Jenkins, O.; Benham, C. D.; Randall, A. D.; Gloger, I. S.; Davis, J. B. *Pain* **2000**, *88*, 205. (c) Smart, D.; Jerman, J. C.; Gunthorpe, M. J.; Brough, S. J.; Ranson, J.; Cairns, W.; Hayes, P. D.; Randall, A. D.; Davis, J. B. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *417*, 51.

<sup>160</sup> (a) Sterner, O.; Szallasi, A. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 459. (b) Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 346.

<sup>161</sup> Gunthorpe, M. J.; Benham, C. D.; Randall, A.; Davis, J. B. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 183.

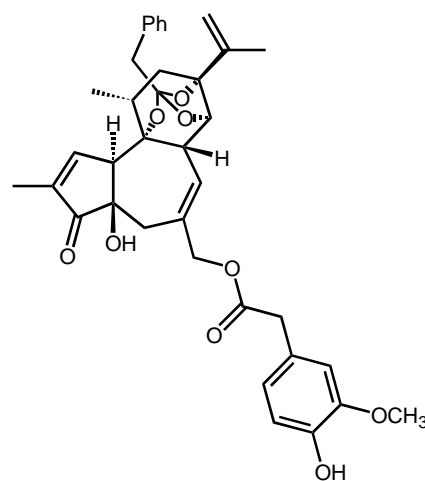
<sup>162</sup> Nilius, B.; Vriens, J.; Prenen, J.; Droogmans, G.; Voets, T. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *286*, C195.

<sup>158</sup> Véase nota 53.

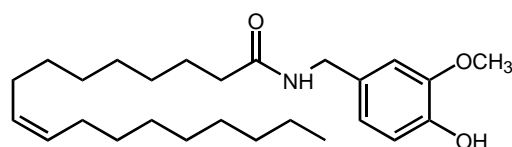
descenso en el valor de pH. Estructuralmente, el receptor VR<sub>1</sub> se caracteriza por presentar seis dominios transmembrana y repeticiones del motivo estructural anquirina en su extremo N terminal.<sup>163</sup>

Los receptores VR<sub>1</sub> se localizan fundamentalmente en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y en las neuronas nodosas ganglionares, aunque también están presentes en ciertas áreas cerebrales tales como el hipotálamo y los ganglios basales.<sup>164</sup> Esta localización dual justifica la implicación de los VR<sub>1</sub> tanto en procesos de nocicepción y de inflamación neurogénica, debido a su situación en neuronas sensoriales primarias, como su participación en diversas funciones relacionadas con su localización cerebral, tales como la formación de la memoria, la regulación del apetito o las emociones.<sup>165</sup> Celularmente, el VR<sub>1</sub> se encuentra tanto en la membrana plasmática como en el retículo endoplasmático y ambos pueden ser activados de forma independiente. Esta localización compartimental pone de manifiesto el complejo papel regulador del receptor VR<sub>1</sub> en la concentración intracelular de calcio en neuronas nociceptivas y apoya la relevancia funcional del VR<sub>1</sub> en las vías de señalización nociceptiva.<sup>166</sup>

Debido al creciente interés generado en torno al receptor VR<sub>1</sub>, en los últimos años se han desarrollado numerosos ligandos con diversos grados de afinidad, potencia y selectividad por dicho receptor. Así, se han descrito agonistas y antagonistas, clasificados en función de su origen natural o sintético y de su mecanismo de acción, competitivo o no competitivo y se han modificado estructuralmente llevándose a cabo diversos estudios de



Resiniferatoxina (RTX)



Olvanilo

relación estructura-afinidad (SAFIR).<sup>167</sup> De forma general, los agonistas del receptor VR<sub>1</sub> pueden clasificarse en dos grandes grupos en función de que contengan o no en su estructura el sistema de 4-hidroxi-3-metoxibencilo, elemento identificado inicialmente como característico de todos los compuestos con afinidad por dicho receptor. Dentro de los compuestos en que este elemento estructural está presente encontramos los compuestos capsaicina (página 35), resiniferatoxina (RTX) y olvanilo.

La segunda clase de agonistas del receptor VR<sub>1</sub> puede a su vez dividirse en dos grupos en función de su estructura química, los triisoprenilfenoles, como el escutigeral, y los dialdehídos insaturados terpenoides, entre los que cabe citar como estructuras más representativas el poligodial, el isoveleral o el β-acaridial.

<sup>163</sup> (a) Véase nota 159(a). (b) Szallasi, A. *Drugs Aging* 2001, 18, 561.

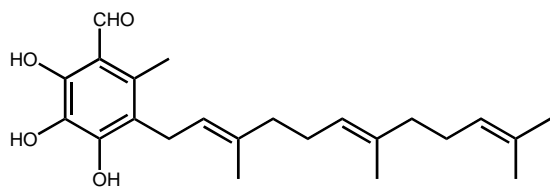
<sup>164</sup> (a) Véase nota 160(b). (b) Szallasi, A.; Blumberg, P. M. *Pharmacol. Rev.* 1999, 51, 159. (c) Roberts, J. C.; Davis, J. B.; Benham, C. D. *Brain Res.* 2004, 995, 176.

<sup>165</sup> Véase nota 160(b).

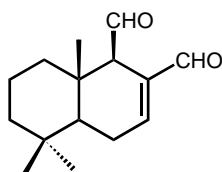
<sup>166</sup> Kárai, L.; Russell, J. T.; Iadarola, M. J.; Oláh, Z. *J. Biol. Chem.* 2004, 274, 16377.

<sup>167</sup> López-Rodríguez, M. L.; Viso, A.; Ortega-Gutiérrez, S. *Mini Rev. Med. Chem.* 2003, 3, 729.

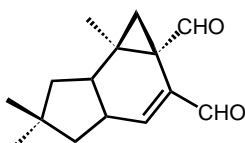




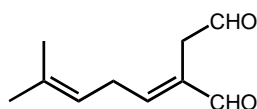
Escutigeral



Poligodial



Isoveleral

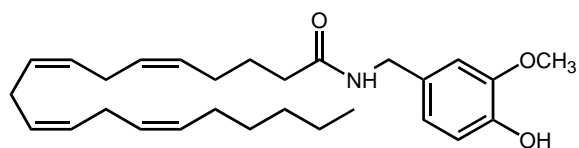
 $\beta$ -Acaridial

El descubrimiento de esta segunda clase de ligandos, capaces de unirse con elevada afinidad por el receptor VR<sub>1</sub> aún careciendo del elemento estructural típicamente vanilloide, unido al descubrimiento de la similitud estructural existente entre la anandamida y la capsaicina o el olvanilo (todos ellos con un grupo amida y una larga cadena alifática), llevó a postular la hipótesis de que alguno de los efectos inducidos por la anandamida fueran debidos a su acción sobre los receptores VR<sub>1</sub>.

A lo largo de los últimos cuatro años, se ha descrito como la anandamida, a concentraciones similares o ligeramente superiores a las necesarias para activar los receptores CB<sub>1</sub>, es capaz de inducir respuestas típicamente vanilloides<sup>168</sup> como son la vasodilatación arterial independiente del endotelio, el flujo de cationes en

neuronas sensoriales, la apoptosis y la inhibición de la contracción estimulada eléctricamente en determinados tipos musculares; efectos todos ellos revertidos en presencia de capsacepina, antagonista selectivo de los receptores VR<sub>1</sub>.

Análogamente, la similitud estructural entre la anandamida y algunos vanilloides como la capsaicina o el olvanilo, sugirió también la posibilidad de que ciertos vanilloides fueran capaces de interactuar con el SCE, bien uniéndose a los receptores CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub> o inhibiendo el transporte de anandamida o la FAAH. Esta hipótesis se confirmó con el progresivo descubrimiento de que tanto el olvanilo (página 36) como el arvanilo,<sup>169</sup> un híbrido vanilloide-cannabinoide, eran capaces de inhibir la recaptación de anandamida<sup>170</sup> y, que, además, el AM404 era capaz de activar los receptores VR<sub>1</sub>.<sup>171</sup>



Arvanilo

Todos estos resultados apuntan hacia la existencia de una regulación cruzada entre el sistema endovanilloide y el SCE y, en particular, han permitido postular la hipótesis de que el transportador de anandamida podría tener una función como regulador fisiológico de la acción de la anandamida, es decir, como la proteína que controla el lugar de acción intra o extracelular, de la

<sup>168</sup> (a) Zygmunt, P. M.; Petersson, J.; Andersson, D. A.; Chuang, H.-h.; Sörgård, M.; Di Marzo, V.; Julius, D.; Högestätt, E. D. *Nature* **1999**, *400*, 452. (b) De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Maccarrone, M.; Davis, J. B.; Finazzi-Agrò, A.; Di Marzo, V. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12856.

<sup>169</sup> (a) Di Marzo, V.; Griffin, G.; De Petrocellis, L.; Brandi, I.; Bisogno, T.; Williams, W.; Grier, M. C.; Kulasegram, S.; Mahadevan, A.; Razdan, R. K.; Martin, B. R. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* **2002**, *300*, 984. (b) Lo, Y.-K.; Chiang, H.-T.; Wu, S.-N. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 581.

<sup>170</sup> (a) Dasse, O.; Mahadevan, A.; Han, L.; Martin, B. R.; Di Marzo, V.; Razdan, R. K. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9195. (b) Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Brandi, I.; Jefferson, R. G.; Winckler, R. L.; Davis, J. B.; Dasse, O.; Mahadevan, A.; Razdan, R. K.; Martin, B. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 444.

<sup>171</sup> Véase nota 94.

anandamida.<sup>172</sup> En este sentido, se ha postulado que el sitio de unión de la anandamida en el receptor VR<sub>1</sub> podría ser intracelular,<sup>173</sup> a diferencia de lo que ocurre en los receptores de cannabinoides, donde es extracelular, de modo que su capacidad para activar un tipo u otro de receptor estaría condicionada por el funcionamiento coordinado del transportador de anandamida y de la FAAH. De este modo, se ha propuesto que la anandamida podría comportarse como un endocannabinoide o como un endovanilloide, en función de su lugar de acción. Es decir, la anandamida producida intracelularmente podría en primer lugar activar los receptores VR<sub>1</sub> hasta ser transportada al exterior a través del transportador o bien hidrolizada por la FAAH y, análogamente, la anandamida extracelular sería capaz de unirse y activar los receptores de cannabinoides hasta el momento de ser recaptada por el transportador.<sup>174</sup> Sin embargo, datos recientes indican que la administración intracelular de capsaicina no es suficiente, al menos en determinados casos, para activar los receptores VR<sub>1</sub>. Estos datos parecen indicar el requerimiento de la ocupación simultánea de otro sitio de unión distinto del intracelular, bien localizado extracelularmente<sup>175</sup> o en las regiones transmembrana.<sup>176</sup> Por tanto, es necesario el desarrollo de estudios que permitan clarificar los complejos mecanismos que regulan la activación del receptor VR<sub>1</sub> y, especialmente, el papel que juegan los distintos aminoácidos tanto en el reconocimiento y unión

de los ligandos del receptor de vanilloides como en la activación receptoral.

En cualquier caso, todas estas evidencias experimentales consideradas en conjunto parecen apoyar la existencia de un acoplamiento funcional entre el transportador y el receptor de vanilloides, donde el transportador gobernaría la acción preferente de la anandamida en los receptores CB<sub>1</sub> o VR<sub>1</sub>. Esta función reguladora podría resultar de especial importancia en aquellos tejidos, fundamentalmente del sistema nervioso, donde ambos receptores colocalizan.

Todos estos datos están contribuyendo a que la línea divisoria entre los sistemas cannabinoide y vanilloide sea cada vez menos clara, lo que ha llevado a postular una hipótesis que progresivamente está ganando aceptación y que postula que los receptores de vanilloides, o en general, los receptores de tipo TRP, podrían ser en realidad los receptores ionotrópicos de cannabinoides.<sup>177</sup>

Todos estos factores hacen que la obtención de inhibidores de la recaptación de anandamida represente simultáneamente tanto una estrategia para potenciar los efectos inducidos por la activación del SCE como un modo de interferir indirectamente con la activación de los receptores VR<sub>1</sub>, regulando así las importantes funciones fisiológicas donde el sistema vanilloide está involucrado.

### 3.3. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS DE LOS INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA

A pesar del enorme potencial terapéutico que el SCE representa para el tratamiento de numerosas patologías, su principal desventaja continua siendo la producción de efectos psicotrópicos asociados a una estimulación de los receptores cerebrales CB<sub>1</sub>. Debido a esto, la utilización de compuestos capaces de inhibir el sistema de inactivación de los ligandos endógenos, esto

<sup>172</sup> (a) Véase nota 56(b). (b) Di Marzo, V.; Blumberg, P. M.; Szallasi, A. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 372.

<sup>173</sup> (a) Tominaga, M.; Caterina, M. J.; Malmberg, A. B.; Rosen, T. A.; Gilbert, H.; Skinner, K.; Raumann, B. E.; Basbaum, A. I.; Julius, D. *Neuron* **1998**, *21*, 531. (b) Jung, J.; Hwang, S. W.; Kwak, J.; Lee, S.-Y.; Kang, C.-J.; Kim, W. B.; Kim, D.; Oh, U. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 529.

<sup>174</sup> (a) Véase nota 160(b). (b) Véase nota 168(b). (c) Véase nota 172(b).

<sup>175</sup> Vyklicky, L.; Lyfenko, A.; Kuffler, D. P.; Vlachova, V. *NeuroReport* **2003**, *14*, 1061.

<sup>176</sup> Gavva, N. R.; Klionsky, L.; Qu, Y.; Shi, L.; Tamir, R.; Edenson, S.; Zhang, T. J.; Viswanadhan, V. N.; Toth, A.; Pearce, L. V.; Vanderah, T. W.; Porreca, F.; Blumberg, P. M.; Lile, J.; Sun, Y.; Wild, K.; Louis, J. C.; Treanor, J. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, doi: 10.1074/jbc.M132577200.

<sup>177</sup> Jordt, S.-E.; Bautista, D. M.; Chuang, H.-h.; McKemy, D. D.; Zygmunt, P. M.; Högestätt, E. D.; Meng, I. D.; Julius, D. *Nature* **2004**, *427*, 260.

es, inhibidores de la recaptación de anandamida y de la FAAH, representa una atractiva alternativa a la utilización de agonistas cannabinoides.

Estos inhibidores, también denominados agonistas indirectos, serían capaces de reforzar la transmisión endocannabinoide en aquellas circunstancias patológicas caracterizadas por una hipofuncionalidad del SCE y, en general, de producir notables mejoras en el tratamiento de todos aquellos desórdenes donde los cannabinoides han demostrado ser potencialmente eficaces. Este abordaje permitiría evitar, además, los efectos indeseables asociados a una estimulación directa de los receptores CB<sub>1</sub>, ya que el aumento en la concentración de anandamida se produciría sólo de forma local en aquellas zonas donde el ligando es fisiológicamente biosintetizado.

En concreto, se ha descrito como los inhibidores de la recaptación de anandamida podrían representar una interesante y novedosa estrategia para el tratamiento de la nocicepción, aplicable tanto al dolor inflamatorio como al neuropático y también, debido a sus acciones en el sistema cardiovascular, del *shock* hipotensivo.<sup>178</sup>

Por otro lado, estos inhibidores son capaces de aliviar la sintomatología asociada a una disfunción en el sistema dopaminérgico, en estrecha relación con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson,<sup>179</sup> así como de inducir notables mejoras en enfermedades neurodegenerativas tales como el corea de Huntington<sup>180</sup> o la esclerosis múltiple. El caso de la esclerosis múltiple es especialmente importante porque diversos grupos de investigación independientes, utilizando distintos modelos de esclerosis múltiple tanto agudos como crónicos, tales como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la encefalomiелitis autoinmune experimental recurrente crónica (CREAE) o la enfermedad desmielinizante

inducida por el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV-IDD), han descrito efectos terapéuticos beneficiosos asociados al tratamiento con diversos agonistas de los receptores de cannabinoides así como la implicación de estos receptores en el desarrollo de la enfermedad.<sup>181</sup> En particular, en el modelo de CREAE se ha puesto explícitamente de manifiesto la implicación del SCE, ya que se ha comprobado que los endocannabinoides aumentan su concentración en las zonas lesionadas. Consecuentemente, la administración de compuestos capaces de aumentar el tono cannabinoide endógeno ha producido una importante mejora en la espasticidad asociada a la sintomatología del desarrollo de la enfermedad. Así, inhibidores de la FAAH como el AM374 o de la recaptación de anandamida tales como el AM404 o el VDM11 (páginas 24 y 25) han producido efectos terapéuticos beneficiosos.<sup>182</sup> Sin embargo, puesto que estos compuestos no son inhibidores de la recaptación totalmente selectivos, sino que presentan capacidad para activar los receptores VR<sub>1</sub> (como el AM404) o inhibir la FAAH (como el VDM11), no está totalmente claro si los efectos observados están asociados directamente a la inhibición de la recaptación de anandamida o a una acción indirecta mediada por la inhibición de la FAAH o por la activación del receptor VR<sub>1</sub>. Por tanto, resulta imprescindible desarrollar estudios con el objetivo de determinar si la inhibición de la recaptación de anandamida puede suponer realmente una terapia eficaz para el tratamiento de la esclerosis múltiple capaz de mimetizar los efectos terapéuticos beneficiosos observados tras la administración exógena de agonistas directos.

<sup>178</sup> (a) Véase nota 47. (b) Véase nota 70(e).

<sup>179</sup> (a) Véase nota 64(a). (b) Fernández-Espejo, E.; Caraballo, I.; Rodríguez de Fonseca, F.; Ferrer, B.; Banoua, F. E.; Flores, J. A.; Galán-Rodríguez, B. *Neuropsychopharmacology* **2004**, doi: 10.1038/sj.npp.1300407.

<sup>180</sup> Véase nota 82.

<sup>181</sup> (a) Baker D.; Pryce, G.; Croxford, J. L.; Brown, P.; Pertwee, R. G.; Huffman, J. W.; Layward, L. *Nature* **2000**, *404*, 84. (b) Véase nota 79. (c) Berrendero, F.; Sánchez, A.; Cabranes, A.; Puerta, C.; Ramos, J. A.; García-Merino, A.; Fernández-Ruiz, J. J. *Synapse* **2001**, *41*, 195. (d) Pryce, G.; Ahmed, Z.; Hankey, D. J. R.; Jackson, S. J.; Croxford, J. L.; Pocock, J. M.; Ledent, C.; Petzold, A.; Thompson, A. J.; Giovannoni, G.; Cuzner, M. L.; Baker, D. *Brain* **2003**, *126*, 2191. (e) Arévalo-Martín, A.; Vela, J. M.; Molina-Holgado, E.; Borrell, J.; Guaza, C. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 2511. (f) Croxford, J. L.; Miller, S. D. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 1231.

<sup>182</sup> Véase nota 79.

Así, aunque aún nos encontramos en una etapa muy inicial del desarrollo de nuevos principios activos capaces de interferir con el SCE debido a su reciente caracterización, el enorme interés terapéutico que este sistema despierta en la actualidad está impulsando la obtención de agentes de potencia, actividad y selectividad

controladas. Dentro de ellos, no cabe ninguna duda de que el diseño y síntesis de nuevos inhibidores de la recaptación de anandamida, trabajo de investigación objeto de esta memoria, podría abrir nuevos horizontes para el tratamiento de graves patologías para las cuales no existe aún una terapia médica adecuada.

#### *4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS I (1-38)

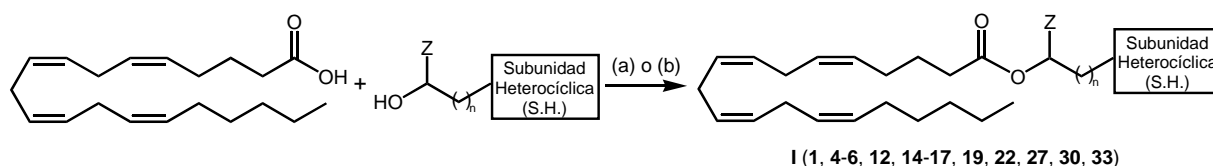
#### 4.1.1. Síntesis de ésteres y tioésteres

La síntesis de los ésteres de estructura general I (Esquema 1) se llevó a cabo por reacción entre el ácido araquidónico y el alcohol correspondiente bajo atmósfera de argón, en presencia de cantidades catalíticas de *N,N*-dimetilformamida (DMF), cloruro de metileno como disolvente y utilizando cloruro de oxalilo como agente de condensación<sup>183</sup> (1, 6, 12, 14, 19, 22, 27 y 30) o bien por tratamiento del ácido araquidónico con el alcohol correspondiente empleando *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de condensación en presencia de cantidades catalíticas de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP)<sup>184</sup> bajo atmósfera de argón en cloruro de metileno (4, 5, 15-17 y 33).

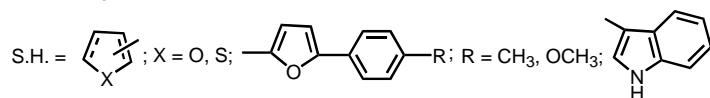
La síntesis de los alcoholes intermedios no comerciales 39a,b se realizó mediante hidrogenación catalítica, utilizando níquel-Raney como catalizador, de los aldehídos 40a,b previamente sintetizados por acoplamiento del derivado halogenado correspondiente con 2-furanocarbaldehído en presencia de cloruro de paladio (II) bajo atmósfera de argón y DMF como disolvente de la reacción (Esquema 2).<sup>185</sup>

El tioéster 3 se obtuvo por condensación del ácido araquidónico con 2-furanometiltiol utilizando DCC en presencia de cantidades catalíticas de DMAP (Esquema 3).

De manera análoga se preparó el retroéster 10 a partir del ácido 3-furoico y del alcohol araquidílico 41, cuya síntesis se llevó a cabo por reducción del ácido araquidónico con hidruro de litio y aluminio en tetrahidrofurano (THF) (Esquema 4).<sup>186</sup>



Z = H, CH<sub>3</sub>; n = 0, 1



Reactivos: (a) (ClCO)<sub>2</sub>, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.; (b) DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.

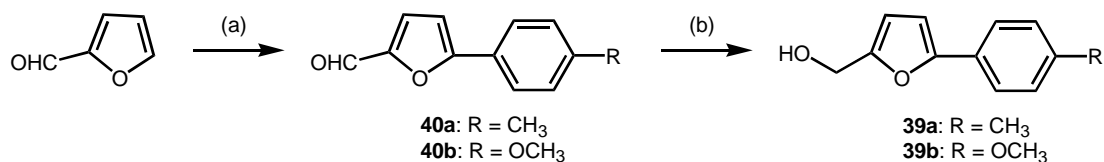
Esquema 1

<sup>183</sup> Corey, E. J.; Cashman, J. R.; Kantner, S. S.; Wright, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1503.

<sup>184</sup> (a) Williams, A.; Ibrahim, I. T. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 589. (b) Neises, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522. (c) Balas, L.; Jousseume, B.; Langwost, B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4525.

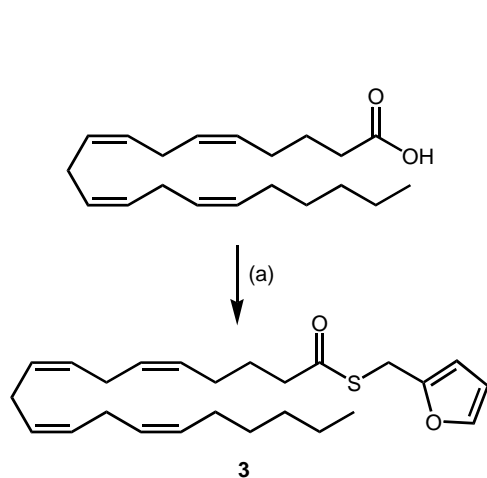
<sup>185</sup> McClure, M. S.; Glover, B.; McSorley, E.; Millar, A.; Osterhout, M. H.; Roschangar, F. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1677.

<sup>186</sup> Sugiura, T.; Kodaka, T.; Nakane, S.; Miyashita, T.; Kondo, S.; Suhara, Y.; Takayama, H.; Waku, K.; Seki, C.; Baba, N.; Ishima, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2794.



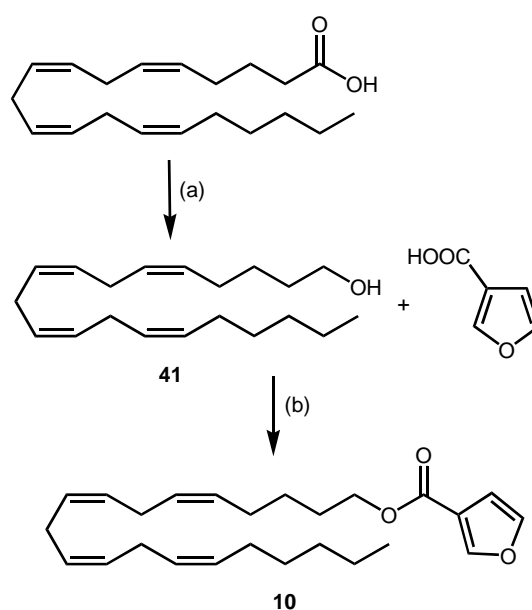
Reactivos: (a) I-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-R, PdCl<sub>2</sub>, Bu<sub>4</sub>NBr, KOAc, Cy<sub>3</sub>P, DMF, Ar, Δ; (b) H<sub>2</sub>, NiRa ac., t.a.

Esquema 2



Reactivos: (a) furfuryl-SH, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.

Esquema 3



Reactivos: (a) LiAlH<sub>4</sub>, THF, Ar, Δ; (b) DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.

Esquema 4

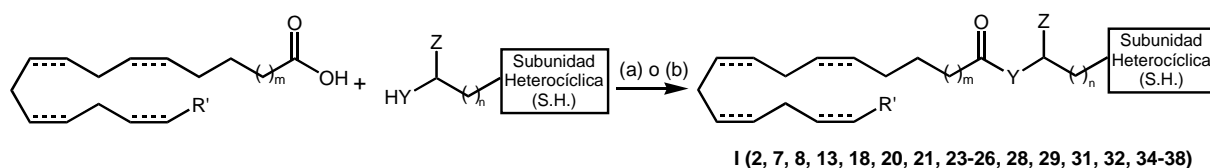
#### 4.1.2. Síntesis de amidas

Por reacción entre el correspondiente ácido graso y las aminas adecuadas, siguiendo los mismos procedimientos que en el caso anterior, se sintetizaron las amidas de fórmula general I (Esquema 5).

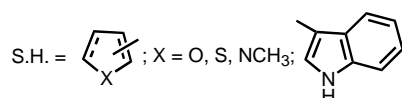
Las aminas intermedias no comerciales se prepararon bien siguiendo procedimientos descritos en la literatura o mediante rutas sintéticas puestas a punto en este trabajo. La síntesis de la (fur-3-ilmetil)amina (**42a**), la (1-metilpirrol-2-ilmetil)amina (**42b**) y la *N*-metil(fur-3-ilmetil)amina (**42c**) se ha llevado a cabo mediante

aminación reductora de sus aldehídos correspondientes por hidrogenación catalítica de éstos en presencia de disoluciones acuosas de hidróxido amónico o metilamina al 28% y utilizando níquel-Raney como catalizador (Esquema 6).<sup>187</sup>

<sup>187</sup> (a) Winans, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 3566. (b) Hudlicky, M. *Reductions in Organic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.; American Chemical Society: Washington D. C., 1996; pp 187-190.

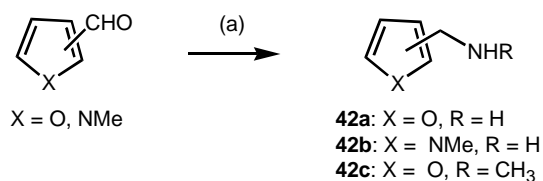


Y = NH, N(CH<sub>3</sub>), N-; Z = H, CH<sub>3</sub>; m = 1, 2; n = 0, 1; R' = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>



Reactivos: (a) (ClCO)<sub>2</sub>, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.; (b) DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.

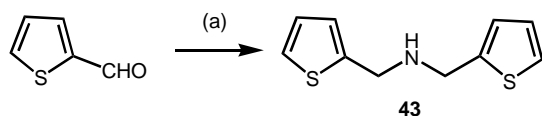
Esquema 5



Reactivos: (a) NH<sub>3</sub> ac. 28% o CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> ac. 28%, H<sub>2</sub>, NiRa, t.a.

Esquema 6

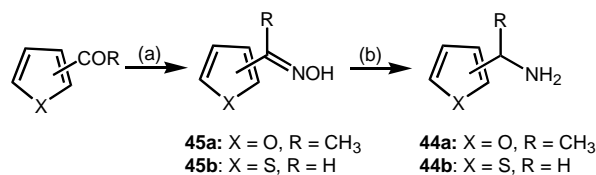
La bis(tien-2-ilmetil)amina (**43**) se obtuvo por aminación reductora con triacetoxiborohidruro sódico en presencia de acetato amónico<sup>188</sup> a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón y utilizando THF como disolvente (Esquema 7).



Reactivos: (a) NH<sub>4</sub>OAc, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, THF, Ar, t.a.

Esquema 7

La síntesis de la (±)-1-(fur-2-il)etilamina (**44a**) y de la (tien-3-ilmetil)amina (**44b**) se llevó a cabo a partir de su precursor carbonílico correspondiente vía reducción de sus oximas respectivas (**45a,b**), como aparece recogido en el Esquema 8.<sup>189</sup>



Reactivos: (a) NH<sub>2</sub>OH·HCl, NaOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O, Δ;  
 (b) NH<sub>3</sub> ac. 28%, MeOH, H<sub>2</sub>, NiRa, t.a.

Esquema 8

Las oximas de la 2-furilmetilcetona (**45a**) y del 3-tiofenocarbaldehído (**45b**) se obtuvieron por reacción de la cetona o aldehído correspondiente con hidroxilamina en presencia de acetato sódico en una mezcla etanol:agua (1:1, v/v). La subsiguiente hidrogenación catalítica en metanol de **45a,b** en

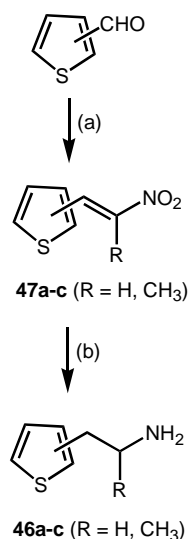
<sup>188</sup> Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849.

<sup>189</sup> Hays, S. J.; Caprathe, B. W.; Gilmore, J. L.; Amin, N.; Emmerling, M. R.; Michael, W.; Nadimpalli, R.; Nath, R.; Raser, K. J.; Stafford, D.; Watson, D.; Wang, K.; Jaen, J. C. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1060.



presencia de una disolución de hidróxido amónico al 28% y utilizando níquel-Raney como catalizador permitió acceder a las aminas de interés **44a,b**.

La ( $\pm$ )-1-metil-2-(tien-2-il)etilamina (**46a**), 2-(tien-3-il)etilamina (**46b**) y ( $\pm$ )-1-metil-2-(tien-3-il)etilamina (**46c**) se prepararon mediante reducción de sus  $\beta$ -nitrovinil derivados (**47a-c**), previamente obtenidos a partir del 2- ó 3-tiofenocarbaldehído y nitroalcanos utilizando estrategias sintéticas descritas en la literatura para la obtención de derivados similares.<sup>190</sup> Las condiciones de reacción empleadas se recogen en el Esquema 9.



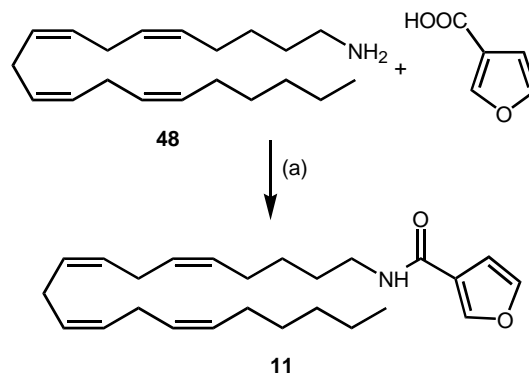
Reactivos: (a) CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, NaOH 10 M, tolueno, t.a. o CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, HOAc glacial, NH<sub>4</sub>OAc, Δ;  
(b) BH<sub>3</sub>·THF, NaBH<sub>4</sub>, THF, Ar, Δ.

Esquema 9

Los derivados (*E*)-1-(tien-2-il)-2-nitropropeno **47a** y (*E*)-1-(tien-3-il)-2-nitropropeno **47c** se obtuvieron por reacción entre el 2- ó 3-tiofenocarbaldehído,

respectivamente, y nitroetano en presencia de una cantidad catalítica de acetato amónico utilizando ácido acético glacial como disolvente de la reacción. El tratamiento de los  $\beta$ -nitrovinil derivados **47a,c** con el complejo BH<sub>3</sub>·THF bajo atmósfera de argón, en presencia de cantidades catalíticas de borohidruro sódico y tetrahidrofurano (THF) como disolvente de la reacción, permitió acceder a las aminas de interés **46a,c**. Análogamente se obtuvo la amina **46b** por reducción en las mismas condiciones del (*E*)-2-(tien-3-il)nitroetileno **47b** previamente sintetizado mediante una condensación tipo Knoevenagel entre el 3-tiofenocarbaldehído y nitrometano en presencia de una disolución acuosa de hidróxido sódico 10 M.

La retroamida **11** se sintetizó por condensación del ácido 3-furoico con la araquidilamina (**48**) utilizando DCC en presencia de cantidades catalíticas de DMAP bajo atmósfera de argón y en cloruro de metileno (Esquema 10).

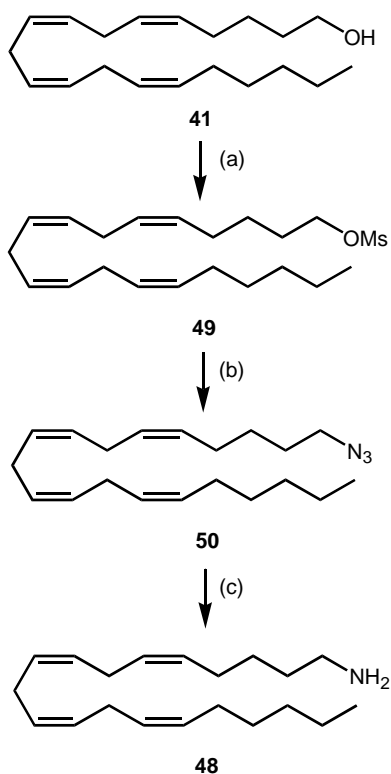


Reactivos: (a) DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Ar, t.a.

Esquema 10

<sup>190</sup> (a) Arnoldi, A.; Bregante, G.; Caldirola, P.; Merlini, L.; Tamburini, B. *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, *27*, 1169. (b) Goodman, M. M.; Kabalka, G. W.; Marks, R. C.; Knapp Jr., F. F.; Lee, J.; Liang, Y. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 280.

La araquidilamina **48**<sup>191</sup> se obtuvo a partir del mesilato **49** por tratamiento con azida sódica y posterior reducción de la azida **50** con hidruro de litio y aluminio en THF (Esquema 11).



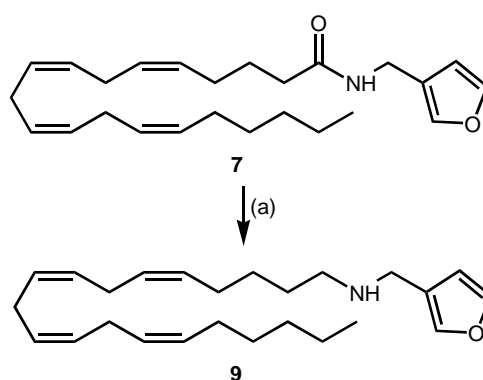
Reactivos: (a) MsCl, piridina, Ar, t.a.; (b) NaN<sub>3</sub>, DMF, Ar, 90°C; (c) LiAlH<sub>4</sub>, THF, Ar, Δ.

Esquema 11

#### 4.1.3. Síntesis de (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(Fur-3-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenilamina **9**

La amina **9** se obtuvo por reducción de su amida precursora **7** con hidruro de litio y aluminio bajo atmósfera

de argón utilizando THF como disolvente (Esquema 12).<sup>192</sup>



Reactivos: (a) LiAlH<sub>4</sub>, THF, Ar, Δ.

Esquema 12

Todos los compuestos sintetizados, tanto los intermedios de reacción como los productos finales, han sido aislados, purificados y caracterizados por sus datos espectroscópicos de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear de protón y carbono (<sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN).

La asignación de los protones y carbonos se ha realizado mediante el análisis conjunto de los espectros monodimensionales (1D) de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y DEPT 135, así como de los espectros bidimensionales (2D) de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY) de alguno de los compuestos representativos.

Entre las características espectroscópicas de <sup>1</sup>H-RMN más destacables en este tipo de compuestos cabe mencionar la presencia de dos multipletes, uno en torno a 2,0 ppm y otro en torno a 5,3 ppm, correspondientes, respectivamente, a los protones alílicos y a los protones

<sup>191</sup> Lin, S.; Khanolkar, A. D.; Fan, P.; Goutopoulos, A.; Qin, C.; Papahadjis, D.; Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5353.

<sup>192</sup> (a) Véase nota 187(b). (b) Wilson, C. V.; Stenberg, J. F. *Org. Synth., Collect. Vol.* **1963**, *IV*, 564. (c) Cope, A. C.; Ciganek, E. *Org. Synth., Collect. Vol.* **1963**, *IV*, 339.

vinílicos del fragmento de ácido graso, siendo característica de los derivados de ácido araquidónico, linoleico y linolénico la presencia de un multiplete a 2,8 ppm de los protones doblemente alílicos.

Todos los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN fueron registrados a temperatura ambiente y en  $\text{CDCl}_3$  con excepción del correspondiente al compuesto **8** (amida del ácido araquidónico y de la amina secundaria **42c**; Tabla I, página 50) para el cual, en estas condiciones, el espectro resultante mostraba una mezcla de rotámeros, siendo necesario aumentar la temperatura hasta  $70\text{ }^\circ\text{C}$  utilizando como disolvente  $\text{CD}_3\text{CN}$  para observar una coalescencia prácticamente total de las señales registradas.

Adicionalmente, la obtención de los espectros de infrarrojo permitió corroborar la formación de los ésteres y amidas objeto de interés por la aparición de una banda intensa en torno a  $1650\text{ cm}^{-1}$  para las amidas y  $1740\text{ cm}^{-1}$  para los ésteres correspondiente al grupo carbonilo de dichos compuestos.

## 4.2. PERFIL IN VITRO DE LOS DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS I

### 4.2.1. Estudio cualitativo de la relación entre la estructura de los compuestos sintetizados y su actividad como inhibidores de la recaptación de anandamida

La determinación de la capacidad de los compuestos **1-38** sintetizados para inhibir la recaptación de anandamida se ha llevado a cabo utilizando la línea celular de linfoma humano U937 y anandamida radiactiva como trazador siguiendo el protocolo basado en el descrito por Macarrone *et al.*<sup>193</sup> aunque con ciertas modificaciones.

El ensayo de recaptación de anandamida se realizó con células intactas a una concentración de  $10^6$  células/mL. Las suspensiones de células se preincubaron

a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones del compuesto objeto de estudio. A continuación las muestras se incubaron a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 minutos con una mezcla de anandamida radiactiva y fría. La recaptación se finalizó por filtración a vacío y la radiactividad retenida en los filtros se cuantificó mediante técnicas espectrométricas de centelleo líquido.

La recaptación específica se calcula como la diferencia entre la recaptación total y la inespecífica, determinada con experimentos control realizados en paralelo a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

El porcentaje de recaptación, tomando como 100% la radiactividad retenida en ausencia de inhibidor, se ajusta mediante regresión no lineal a una curva sigmoidea obtenida con el programa Prism (GraphPad).

Para realizar la puesta a punto del ensayo de recaptación y comprobar la validez de los resultados con él obtenidos se determinó en primer lugar la capacidad inhibitoria del AM404, descrita en la bibliografía como  $\text{CI}_{50} = 2,2 \pm 0,2\ \mu\text{M}$ .<sup>194</sup> De este experimento se obtuvo un valor de  $\text{CI}_{50} = 4 \pm 2\ \mu\text{M}$ , lo que está en acuerdo con el valor bibliográfico y confirma la fiabilidad del ensayo.

En las Tablas I y II se recogen los datos de la capacidad para inhibir la recaptación de anandamida expresados como  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) mostrada por los compuestos de estructura general I, incluyéndose como valor de referencia el del AM404. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  obtenidos corresponden a la media y desviación estándar de experimentos realizados tres veces por triplicado.

Dentro del estudio cualitativo de la relación entre la actividad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida y la estructura de los distintos derivados de ácido araquidónico I objeto de estudio, se analizó la influencia del anillo heterocíclico, del espaciador que separa éste de la cadena de ácido araquidónico así como del grupo -X-Y- que une ambas partes de la molécula. Basándonos en los datos recogidos en la Tabla I, los resultados más

<sup>193</sup> Véase nota 55(a).

<sup>194</sup> Véase nota 74(a).

relevantes pueden expresarse en los siguientes términos:<sup>195</sup>

a) Para evaluar la influencia de la subunidad heterocíclica se han considerado compuestos con distintos anillos de cinco eslabones (furano, tiofeno y pirrol). En estos casos, la situación de la cadena de ácido araquidónico en la posición 2 ó 3 del heterociclo parece ejercer una influencia diferente dependiendo del heterociclo considerado. Así, en los derivados de furano, la situación del resto de ácido araquidónico en la posición 3 aumenta la capacidad inhibitoria de los compuestos, como se deduce de los valores obtenidos para los derivados **6** y **1** (valores de  $Cl_{50}$  de 14 y 24  $\mu$ M, respectivamente) o **7** y **2** (valores de  $Cl_{50}$  de 0,8 y 5  $\mu$ M). Sin embargo, en el caso de los derivados de tiofeno, esta característica no parece ser tan relevante, como se observa en los compuestos **20**, **22** y **23**, con valores de  $Cl_{50}$  comprendidos entre 3 y 5  $\mu$ M. La falta de actividad del derivado **19** constituye una excepción a esta tendencia general.

La sustitución del anillo de furano o tiofeno por un anillo de pirrol no tiene apenas influencia en la capacidad inhibitoria de los compuestos. Este hecho se observa claramente en el caso de los compuestos **2**, **20** y **24**, con valores de  $Cl_{50}$  equipotentes ( $Cl_{50} = 5$ , 5,7 y 5  $\mu$ M, respectivamente).

El aumento de volumen en la región de la molécula correspondiente a la subunidad heterocíclica parece implicar una clara disminución en la capacidad inhibitoria del compuesto, como se deduce de la pérdida de potencia experimentada por los derivados benzocondensados **33** y **34** con valores de inhibición máxima del 64% y 55%, respectivamente. Este efecto se observa también si comparamos los valores obtenidos para los compuestos **4**

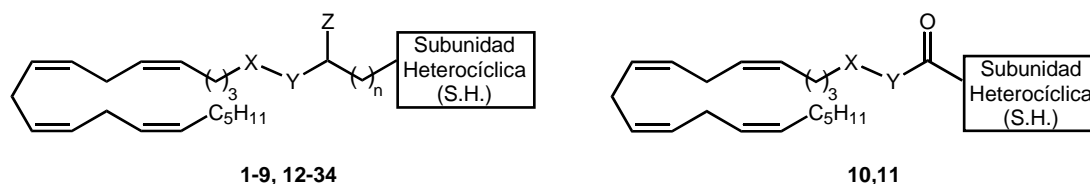
y **1** [Inh. Máx. (**4**) = 40%, Inh. Máx. (**1**) > 85%]. Sin embargo, cuando el aumento de volumen va acompañado de grupos capaces de establecer enlaces de hidrógeno adicionales, se produce no sólo una recuperación de la capacidad inhibitoria máxima [Inh. Máx. (**5**) > 85%], sino incluso un aumento en la potencia del compuesto, reflejado en el valor de su  $Cl_{50}$  [ $Cl_{50}$  (**1**) = 24  $\mu$ M;  $Cl_{50}$  (**5**) = 10  $\mu$ M].

Con respecto a la aromaticidad de la subunidad heterocíclica, cuando la cadena de ácido araquidónico está situada en la posición 2 del heterociclo la existencia de aromaticidad no resulta esencial para la actividad, como indican los valores de  $Cl_{50}$  de los compuestos **1** y **12** (24 y 18  $\mu$ M, respectivamente) y **2** y **13** (5 y 8  $\mu$ M, respectivamente). Sin embargo, cuando la cadena lateral de ácido araquidónico se localiza en la posición 3, la existencia de aromaticidad ejerce una notable influencia sobre la tendencia inhibitoria observada, como se aprecia en el valor de  $Cl_{50}$  obtenido para el compuesto **6** de 14  $\mu$ M frente a la tendencia no sigmoidea para la curva análoga correspondiente al compuesto **14**. Este comportamiento podría justificarse por la existencia de distintos mecanismos de inhibición de la recaptación de anandamida.

b) Con respecto a la naturaleza del fragmento -X-Y-, en general puede observarse como amidas secundarias, ésteres y tioésteres son capaces de inhibir la recaptación de anandamida, aunque las amidas muestran en general una mayor potencia. Este efecto se aprecia en la mejor capacidad inhibitoria de la amida **2** ( $Cl_{50} = 5$   $\mu$ M) comparada con su éster y tioéster análogos **1** y **3** [ $Cl_{50}$  (**1**) = 24  $\mu$ M;  $Cl_{50}$  (**3**) = 9  $\mu$ M]; en la mayor capacidad inhibitoria del compuesto **7** ( $Cl_{50} = 0,8$   $\mu$ M) frente a su éster correspondiente **6** ( $Cl_{50} = 14$   $\mu$ M) y, especialmente, en la recuperación de la actividad observada entre los compuestos **19** (inactivo) y **20** ( $Cl_{50} = 5,7$   $\mu$ M).

<sup>195</sup> (a) López-Rodríguez, M. L.; Viso, A.; Ortega-Gutiérrez, S.; Lastres-Becker, I.; González, S.; Fernández-Ruiz, J. J.; Ramos, J. A. PCT/ES01/00305, 2001. (b) López-Rodríguez, M. L.; Viso, A.; Ortega-Gutiérrez, S.; Lastres-Becker, I.; González, S.; Fernández-Ruiz, J. J.; Ramos, J. A. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 4505. (c) López-Rodríguez, M. L.; Viso, A.; Ortega-Gutiérrez, S.; Fowler, C. J.; Tiger, G.; de Lago, E.; Fernández-Ruiz, J.; Ramos, J. A. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 1512.

Tabla I. Capacidad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida y la actividad enzimática de la FAAH y afinidad receptoral de los compuestos 1-34



| S.H. | -X-Y- <sup>a</sup>       | Z | n | Recaptación de anandamida  |                       | FAAH                       |                       | Afinidad Receptoral                 |                                     |                                     |
|------|--------------------------|---|---|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|      |                          |   |   | Inh. Máx. <sup>b</sup> (%) | Cl <sub>50</sub> (μM) | Inh. Máx. <sup>c</sup> (%) | Cl <sub>50</sub> (μM) | K <sub>i</sub> CB <sub>1</sub> (nM) | K <sub>i</sub> CB <sub>2</sub> (nM) | K <sub>i</sub> VR <sub>1</sub> (nM) |
| 1    | -CO-O-                   | H | 0 | > 85                       | 24 ± 14               | 100                        | 53                    | > 5000                              | > 5000                              | > 5000                              |
| 2    | -CO-NH-                  | H | 0 | > 85                       | 5 ± 2                 | 100                        | 34                    | > 5000                              | > 5000                              | <i>d</i>                            |
| 3    | -CO-S-                   | H | 0 | > 85                       | 9 ± 2                 | 36 ± 7 <sup>e</sup>        | -                     | > 5000                              | > 5000                              | > 5000                              |
| 4    | -CO-O-                   | H | 0 | 40 ± 12                    | <i>f</i>              | <i>g</i>                   | <i>g</i>              | > 5000                              | > 5000                              | <i>g</i>                            |
| 5    | -CO-O-                   | H | 0 | > 85                       | 10 ± 3                | <i>g</i>                   | <i>g</i>              | > 5000                              | > 5000                              | <i>g</i>                            |
| 6    | -CO-O-                   | H | 0 | > 85                       | 14 ± 2                | 100                        | 103                   | > 5000                              | > 5000                              | <i>d</i>                            |
| 7    | -CO-NH-                  | H | 0 | > 85                       | 0,8 ± 0,4             | 100                        | 30                    | 4700 ± 80                           | 67 ± 6                              | > 5000                              |
| 8    | -CO-N(CH <sub>3</sub> )- | H | 0 | > 85                       | 111 ± 51              | 24 ± 4 <sup>e</sup>        | -                     | > 1000                              | > 1000                              | <i>g</i>                            |
| 9    | -CH <sub>2</sub> -NH-    | H | 0 | > 85                       | <i>h</i>              | 57 ± 11                    | 29                    | > 1000                              | > 1000                              | > 5000                              |
| 10   | -CH <sub>2</sub> -O-     | - | - | 25 ± 1                     | <i>f</i>              | <i>g</i>                   | <i>g</i>              | <i>g</i>                            | > 5000                              | <i>g</i>                            |
| 11   | -CH <sub>2</sub> -NH-    | - | - | 70 ± 5                     | 14 ± 3                | <i>g</i>                   | <i>g</i>              | 913 ± 250                           | 274 ± 75                            | <i>g</i>                            |

Tabla I. (Continuación)













| S.H. | -X-Y- <sup>a</sup>  | Z                       | n               | Recaptación de anandamida     |                          | FAAH                          |                          | Afinidad Receptorial                |                                     |                                     |        |
|------|---|-------------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------|
|      |   |                         |                 | Inh. Máx. <sup>b</sup><br>(%) | Cl <sub>50</sub><br>(μM) | Inh. Máx. <sup>c</sup><br>(%) | Cl <sub>50</sub><br>(μM) | K <sub>i</sub> CB <sub>1</sub> (nM) | K <sub>i</sub> CB <sub>2</sub> (nM) | K <sub>i</sub> VR <sub>1</sub> (nM) |        |
| 12   |    | (±) -CO-O-              | H               | 0                             | > 85                     | 18 ± 7                        | 23 ± 1 <sup>e</sup>      | -                                   | > 5000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 13   |   | (±) -CO-NH-             | H               | 0                             | > 85                     | 8 ± 2                         | 47 ± 14                  | 44                                  | > 5000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 14   |    | (±) -CO-O-              | H               | 0                             | > 85                     | <i>h</i>                      | 100                      | 113                                 | > 5000                              | > 10000                             | > 5000 |
| 15   |   | (±) -CO-O-              | CH <sub>3</sub> | 0                             | 70 ± 2                   | <i>f</i>                      | 45 ± 11 <sup>e</sup>     | -                                   | > 1000                              | > 1000                              | > 5000 |
| 16   |  | (+) ( <i>R</i> ) -CO-O- | CH <sub>3</sub> | 0                             | 37 ± 2                   | <i>f</i>                      | 19 ± 5 <sup>e</sup>      | -                                   | > 1000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 17   |   | (-) ( <i>S</i> ) -CO-O- | CH <sub>3</sub> | 0                             | 55 ± 4                   | <i>f</i>                      | 24 ± 1 <sup>e</sup>      | -                                   | > 1000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 18   |   | (±) -CO-NH-             | CH <sub>3</sub> | 0                             | > 85                     | 21 ± 12                       | 75 ± 11                  | 36                                  | > 5000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 19   |   | -CO-O-                  | H               | 0                             | Inactivo                 |                               | 80 ± 6                   | 12                                  | > 5000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 20   |  | -CO-NH-                 | H               | 0                             | > 85                     | 5,7 ± 0,6                     | 100                      | 112                                 | > 1000                              | > 10000                             | > 5000 |
| 21   |  |                         | H               | 0                             | > 85                     | 16 ± 4                        | <i>g</i>                 | <i>g</i>                            | > 1000                              | > 1000                              | > 5000 |
| 22   |  | -CO-O-                  | H               | 0                             | > 85                     | 3 ± 2                         | 100                      | 84                                  | > 5000                              | > 5000                              | > 5000 |
| 23   |   | -CO-NH-                 | H               | 0                             | > 85                     | 5 ± 2                         | 76 ± 6                   | 12                                  | > 1000                              | > 1000                              | > 5000 |
| 24   |  | -CO-NH-                 | H               | 0                             | > 85                     | 5,0 ± 0,7                     | <i>g</i>                 | <i>g</i>                            | 124 ± 1                             | 70 ± 5                              | > 5000 |

Tabla I. (Continuación)

| S.H.       | -X-Y- <sup>a</sup>  | Z           | n               | Recaptación de anandamida  |                       | FAAH                       |                       | Afinidad Receptorial                |                                     |                                     |                     |
|------------|---|-------------|-----------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
|            |   |             |                 | Inh. Máx. <sup>b</sup> (%) | Cl <sub>50</sub> (μM) | Inh. Máx. <sup>c</sup> (%) | Cl <sub>50</sub> (μM) | K <sub>i</sub> CB <sub>1</sub> (nM) | K <sub>i</sub> CB <sub>2</sub> (nM) | K <sub>i</sub> VR <sub>1</sub> (nM) |                     |
| 25         |    | -CO-NH-     | H               | 1                          | > 85                  | 12,8 ± 0,4                 | 38 ± 1 <sup>e</sup>   | -                                   | > 5000                              | > 1000                              | > 5000              |
| 26         |    | -CO-NH-     | H               | 1                          | > 85                  | 3,3 ± 0,9                  | <i>g</i>              | <i>g</i>                            | > 1000                              | 400 ± 100                           | > 5000              |
| 27         |   | -CO-O-      | H               | 1                          | > 85                  | 12 ± 1                     | 68 ± 13               | 24                                  | > 1000                              | > 5000                              | > 5000              |
| 28         |    | -CO-NH-     | H               | 1                          | > 85                  | 19 ± 3                     | 100                   | 102                                 | > 3000                              | > 1000                              | > 5000              |
| 29         |   | (±) -CO-NH- | CH <sub>3</sub> | 1                          | 66 ± 2                | 22 ± 1                     | 36 ± 6                | 15                                  | > 1000                              | > 1000                              | <i>d</i>            |
| 30         |   | -CO-O-      | H               | 1                          | 75 ± 8                | 26 ± 9                     | 100                   | 28                                  | > 1000                              | > 5000                              | > 5000              |
| 31         |  | -CO-NH-     | H               | 1                          | 60 ± 11               | 1,3 ± 0,5                  | <i>g</i>              | <i>g</i>                            | > 1000                              | > 1000                              | <i>d</i>            |
| 32         |   | (±) -CO-NH- | CH <sub>3</sub> | 1                          | 78 ± 3                | 21 ± 6                     | 37 ± 3 <sup>e</sup>   | -                                   | > 1000                              | > 1000                              | <i>d</i>            |
| 33         |  | -CO-O-      | H               | 1                          | 64 ± 6                | 28 ± 9                     | 61 ± 7                | 24                                  | > 5000                              | > 5000                              | > 5000              |
| 34         |   | -CO-NH-     | H               | 1                          | 55 ± 9                | 18 ± 8                     | 81 ± 2                | 2,7                                 | > 1000                              | > 5000                              | > 5000              |
| AM404      |   |             |                 |                            | > 85                  | 4 ± 2                      | 100                   | 37                                  | > 1000                              | > 5000                              | > 5000              |
| WIN552122  |   |             |                 |                            | -                     | -                          | -                     | -                                   | 4,5 ± 0,4                           | 3,9 ± 0,8                           | -                   |
| CP55940    |   |             |                 |                            | -                     | -                          | -                     | -                                   | 1,3 ± 0,4                           | 0,15 ± 0,05                         | -                   |
| Anandamida |   |             |                 |                            | -                     | -                          | -                     | -                                   | 285 ± 14                            | > 1000                              | 169 ± 33            |
| RTX        |   |             |                 |                            | -                     | -                          | -                     | -                                   | -                                   | -                                   | 40 ± 1 <sup>i</sup> |

<sup>a</sup>En los casos en que existe un centro estereogénico se indica entre paréntesis el signo de la rotación óptica y la configuración absoluta de dicho centro. <sup>b</sup>Inhibición de la recaptación de anandamida a la máxima concentración ensayada (50 μM). <sup>c</sup>Inhibición de la actividad enzimática de la FAAH a la máxima concentración analizada (100 μM). <sup>d</sup>Estos compuestos presentan una cierta afinidad por el receptor VR<sub>1</sub> (K<sub>i</sub> < 5000 nM). <sup>e</sup>En los casos en que el valor de Cl<sub>50</sub> obtenido era claramente superior a la máxima concentración ensayada (Cl<sub>50</sub> > 120 μM) o si no se podía obtener una curva de ajuste por razones estadísticas, únicamente se recoge la inhibición mostrada por el compuesto a la máxima concentración analizada (100 μM). <sup>f</sup>En estos casos la curva presentaba valores de inhibición máxima muy por debajo del resto de los inhibidores analizados, de modo que el valor de Cl<sub>50</sub> no sería comparable con los del resto de compuestos estudiados y no aparece recogido en la tabla. <sup>g</sup>No determinado. <sup>h</sup>En estos casos las curvas presentaban una forma hiperbólica y no el perfil sigmoideo característico del resto de curvas dosis-respuesta. <sup>i</sup>Valores picomolares.

La presencia de grupos de amida terciaria reduce notablemente la capacidad inhibitoria de los compuestos, como muestra la disminución en aproximadamente tres veces de la potencia del compuesto **21** ( $Cl_{50} = 16 \mu\text{M}$ ) frente al derivado **20** ( $Cl_{50} = 5,7 \mu\text{M}$ ) o en la dramática pérdida de actividad exhibida por el compuesto **8** ( $Cl_{50} = 111 \mu\text{M}$ ) frente a su análogo **7** ( $Cl_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ ). Estos resultados ponen de manifiesto los estrictos requerimientos estructurales en esta zona de la molécula próxima al grupo amida. Aunque inicialmente cabría pensar en la importancia del átomo de hidrógeno de la amida secundaria como posiblemente implicado en un enlace de hidrógeno, el hecho de que hayan sido previamente descritas algunas amidas terciarias con afinidades moderadas ( $Cl_{50} = 10 - 30 \mu\text{M}$ )<sup>196</sup> parece indicar que más que la importancia del átomo de hidrógeno en sí, el factor realmente responsable de esta disminución es la existencia de factores estéricos.

La sustitución del grupo carbonilo por un grupo metilénico (compuesto **9**) implica una variación en el comportamiento del compuesto, que ya no muestra un perfil característico sigmoideo de una curva dosis-respuesta sino que presenta una tendencia hiperbólica, aunque con valores de inhibición superiores al 85%.

El retroéster **10** y la retroamida **11** introducen una modificación de las distancias entre el grupo carbonilo y las subunidades aromática y de ácido graso. Esta modificación conlleva una drástica disminución de la capacidad inhibitoria, como se deduce de los valores de inhibición máxima obtenidos para el retroéster **10** (Inh. Máx. = 25%) frente a la inhibición superior al 85% mostrada por su análogo **6**. De forma similar, la retroamida **11** (Inh. Máx. = 70%,  $Cl_{50} = 14 \mu\text{M}$ ) exhibe una menor potencia que su isómero correspondiente **7** (Inh. Máx. > 85%,  $Cl_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ ).

c) El alargamiento del espaciador metilénico que une la cadena de ácido araquidónico con el fragmento heterocíclico provoca importantes disminuciones en el

valor de inhibición máxima. Por ejemplo, en el caso de los derivados de furano, el alargamiento en una unidad metilénica del espaciador del compuesto **2** ( $Cl_{50} = 5 \mu\text{M}$ ) se materializa en el compuesto **25** con una pérdida de potencia de tres veces ( $Cl_{50} = 12,8 \mu\text{M}$ ) y análogamente ocurre entre los compuestos **7** y **26** [ $Cl_{50}$  (**7**) =  $0,8 \mu\text{M}$ ;  $Cl_{50}$  (**26**) =  $3,3 \mu\text{M}$ ]. Este hecho también se observa en el caso de los derivados de tiofeno donde se aprecian notables empeoramientos en sus valores de  $Cl_{50}$  [ $Cl_{50}$  (**20**) =  $5,7 \mu\text{M}$  y  $Cl_{50}$  (**28**) =  $19 \mu\text{M}$ ], en sus valores de inhibición máxima [Inh. Máx. (**23**) > 85%; Inh. Máx. (**31**) = 60%] o en ambos simultáneamente, como ocurre entre los derivados **22** y **30** [Inh. Máx. (**22**) > 85%;  $Cl_{50}$  (**22**) =  $3 \mu\text{M}$ ; Inh. Máx. (**30**) = 75%;  $Cl_{50}$  (**30**) =  $26 \mu\text{M}$ ].

La introducción de grupos metilo en el espaciador ( $Z = \text{CH}_3$ ) produce también una notable disminución en la potencia inhibitoria de los compuestos sintetizados, tanto en compuestos con una unidad metilénica como en los inhibidores con dos unidades metilénicas en el espaciador. Así, los compuestos **15-17** presentan valores de inhibición máxima claramente inferiores al 85% mientras que su análogo correspondiente sin sustituir, el compuesto **1**, presenta un valor de inhibición máxima superior al 85% y  $Cl_{50} = 24 \mu\text{M}$ . Análogamente ocurre con los compuestos **2** y **18** [ $Cl_{50}$  (**2**) =  $5 \mu\text{M}$ ;  $Cl_{50}$  (**18**) =  $21 \mu\text{M}$ ]; **31** y **32** [ $Cl_{50}$  (**31**) =  $1,3 \mu\text{M}$ ;  $Cl_{50}$  (**32**) =  $21 \mu\text{M}$ ]; o **28** y **29** [Inh. Máx. (**28**) > 85%;  $Cl_{50}$  (**28**) =  $19 \mu\text{M}$ ; Inh. Máx. (**29**) = 66%;  $Cl_{50}$  (**29**) =  $22 \mu\text{M}$ ].

d) Adicionalmente, los compuestos **15-17** permiten poner de manifiesto la influencia de la estereoquímica en la capacidad para inhibir la acumulación de anandamida. De sus valores de inhibición máxima recogidos en la tabla se deduce que la capacidad del enantiómero *S* (comp. **17**) para inhibir el transporte de anandamida es superior a la mostrada por el *R* (comp. **16**), con valores de inhibición máxima de 55% y 37%, respectivamente. Este resultado está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía para otros análogos de anandamida,<sup>197</sup> donde también existe

<sup>196</sup> (a) Véase nota 74.

<sup>197</sup> (a) Véase nota 74(a). (b) Véase nota 92(b).



una preferencia enantiomérica por el isómero *S* frente al *R*, habiéndose observado, además, la curiosa propiedad de que esta preferencia es contraria a la mostrada por el receptor CB<sub>1</sub>, donde los enantiómeros *R* presentan una mayor afinidad que la de sus correspondientes compuestos *S*, pero paralela a la exhibida por la FAAH, algo que también se observa en estos compuestos, donde el enantiómero *S* es un inhibidor algo más eficaz que el correspondiente *R* (inhibiciones máximas del 24% y 19%, respectivamente).

Todos estos datos nos han permitido identificar la subunidad heterocíclica de 3-furilo, así como Z = H, n = 0 y -X-Y- = -CO-NH-, como los requerimientos estructurales óptimos para la actividad inhibitoria de la recaptación de anandamida. Por tanto, seleccionamos estos parámetros para analizar el efecto que diferentes cadenas de ácidos grasos podrían tener sobre la inhibición de la acumulación de anandamida.

Así, se sintetizaron los derivados **35-38** y se evaluó su actividad, recogiendo los datos de CI<sub>50</sub> en la Tabla II.

Los resultados obtenidos indican que ninguno de los ácidos grasos analizados fue capaz de mejorar la potencia mostrada por el derivado de ácido araquidónico **7** (CI<sub>50</sub> = 0,8 μM). Entre los tres derivados de ácido graso de dieciocho átomos de carbono, oleico (**35**, Δ<sup>1:9</sup>), linoleico (**36**, Δ<sup>2:9,12</sup>) y linoléico (**37**, Δ<sup>3:9,12,15</sup>), se aprecia cómo variaciones en el número de dobles enlaces implican modificaciones en los valores de CI<sub>50</sub>, siendo el inhibidor más potente el derivado **36**, con dos dobles enlaces en su estructura [CI<sub>50</sub> (**36**) = 1,4 μM]. Tanto la disminución en el número de dobles enlaces (**35**) como su aumento (**37**), conllevan un ligero empeoramiento de la potencia inhibitoria (valores de CI<sub>50</sub> de 4,2 y 8 μM, respectivamente). El acortamiento de la cadena de ácido graso de dieciocho a dieciséis átomos de carbono (compuesto **38**) no parece ser un factor relevante, como indican los valores similares de CI<sub>50</sub> obtenidos para ambos derivados [CI<sub>50</sub> (**35**) = 4,2 μM; CI<sub>50</sub> (**38**) = 3 μM].

Adicionalmente, la actividad de algunos de los compuestos de estructura general **I** (**3**, **7**, **32**, **33**, **35-38**), ha sido analizada en la línea tumoral de próstata PC-3, permitiendo identificar y caracterizar parcialmente por vez primera el sistema de inactivación de anandamida en estas células.<sup>198</sup>

#### 4.2.2. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la actividad enzimática de la enzima FAAH

La capacidad de los compuestos **1-38** como inhibidores de la actividad amido hidrolasa de la enzima FAAH se ha determinado en homogeneizado de tejido cerebral de rata utilizando anandamida radiactiva como trazador siguiendo el protocolo desarrollado por Fowler *et al.*<sup>199</sup>

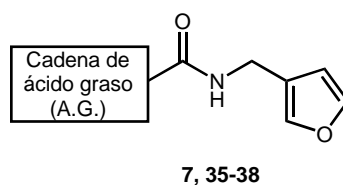
El tejido homogeneizado se incubaba a 37 °C durante 10 minutos con anandamida tritiada en su fragmento de etanolamina en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones del compuesto objeto de estudio. Finalizada la reacción, se cuantifica la radiactividad en forma de etanolamina liberada mediante técnicas espectrométricas de centelleo líquido.

En las Tablas I y II se recogen los datos de la potencia inhibitoria sobre la FAAH de los compuestos de estructura general **I**, expresados como valores de inhibición a la máxima concentración (Inh. Máx.) y CI<sub>50</sub> (μM), incluyéndose como valores de referencia los del AM404. Los valores de CI<sub>50</sub> se han obtenido a partir de sus respectivos pI<sub>50</sub> determinados mediante un mínimo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

<sup>198</sup> Ruiz-Llorente, L.; Ortega-Gutiérrez, S.; Viso, A.; Sánchez, M. G.; Sánchez, A. M.; Fernández, C.; Ramos, J. A.; Hillard, C. J.; Lasunción, M. A.; López-Rodríguez, M. L.; Díaz-Laviada, I. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 457.

<sup>199</sup> (a) Fowler, C. J.; Tiger, G.; Stenström, A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 729. (b) Véase nota 195(c).

**Tabla II.** Capacidad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida, actividad enzimática de la FAAH y afinidad receptorial de los compuestos **7**, **35-38**



|           | A.G.                           | Recaptación de anandamida  |                       | FAAH                       |                       | Afinidad Receptorial                |                                     |                                     |
|-----------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|           |                                | Inh. Máx. <sup>a</sup> (%) | Cl <sub>50</sub> (μM) | Inh. Máx. <sup>b</sup> (%) | Cl <sub>50</sub> (μM) | K <sub>i</sub> CB <sub>1</sub> (nM) | K <sub>i</sub> CB <sub>2</sub> (nM) | K <sub>i</sub> VR <sub>1</sub> (nM) |
| <b>7</b>  | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | > 85                       | 0,8 ± 0,4             | 100                        | 30                    | 4700 ± 80                           | 67 ± 6                              | > 5000                              |
| <b>35</b> |                                | > 85                       | 4,2 ± 0,4             | 55 ± 4                     | 5,6                   | > 5000                              | > 1000                              | <i>c</i>                            |
| <b>36</b> |                                | > 85                       | 1,4 ± 0,7             | 78 ± 3                     | 8,9                   | > 5000                              | > 1000                              | <i>c</i>                            |
| <b>37</b> |                                | > 85                       | 8 ± 3                 | 85 ± 3                     | 4,4                   | > 5000                              | > 1000                              | > 5000                              |
| <b>38</b> |                                | > 85                       | 3,0 ± 0,6             | 100                        | 67                    | > 5000                              | > 5000                              | <i>c</i>                            |
|           | AM404                          | > 85                       | 4 ± 2                 | 100                        | 3,7                   | > 1000                              | > 5000                              | > 5000                              |
|           | WIN552122                      | -                          | -                     | -                          | -                     | 4,5 ± 0,4                           | 3,9 ± 0,8                           | -                                   |
|           | CP55940                        | -                          | -                     | -                          | -                     | 1,3 ± 0,4                           | 0,15 ± 0,05                         | -                                   |
|           | Anandamida                     | -                          | -                     | -                          | -                     | 285 ± 14                            | > 1000                              | 169 ± 33                            |
|           | RTX                            | -                          | -                     | -                          | -                     | -                                   | -                                   | 40 ± 1 <sup>d</sup>                 |

<sup>a</sup>Inhibición a la concentración máxima ensayada (50 μM). <sup>b</sup>Inhibición a la concentración máxima ensayada (100 μM). <sup>c</sup>Estos compuestos presentan una cierta afinidad por el receptor VR<sub>1</sub> (K<sub>i</sub> < 5000 nM). <sup>d</sup>Valores picomolares.

Con respecto a la capacidad de los derivados I para inhibir la actividad catalítica de la FAAH, la mayoría de ellos muestra una moderada actividad como inhibidores de la enzima, con bajos valores de afinidad comprendidos entre 30 y 113  $\mu\text{M}$  e incluso con inhibiciones máximas por debajo del 50%.

Estos resultados contrastan con la equipotencia obtenida para otros inhibidores de la recaptación descritos con anterioridad tales como el AM404 [página 24, Tabla I,  $\text{CI}_{50}$  (Recaptación de anandamida) = 4  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CI}_{50}$  (FAAH) = 3,7  $\mu\text{M}$ ] o el VDM11 [página 25,  $\text{CI}_{50}$  (Recaptación de anandamida) = 10,2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CI}_{50}$  (FAAH) = 2  $\mu\text{M}$ <sup>200</sup>] así como con la dificultad encontrada en estudios previos a nuestro trabajo para separar la actividad inhibitoria de la recaptación de anandamida de la inhibición sobre la actividad catalítica de la FAAH.<sup>201</sup>

Aunque posteriormente se ha desarrollado otra serie de inhibidores potentes de la recaptación de anandamida que son asimismo selectivos frente a la FAAH, entre los cuales destaca el OMDM1 [página 26,  $\text{CI}_{50}$  (Recaptación de anandamida) = 2,4  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CI}_{50}$  (FAAH) > 50  $\mu\text{M}$ ] como el compuesto más representativo,<sup>202</sup> el presente grupo de compuestos de estructura I constituye la primera serie descrita de potentes inhibidores de la recaptación de anandamida que muestran además cierta selectividad frente a su capacidad para inhibir la enzima FAAH.

Así, el compuesto 7, es no sólo el más potente inhibidor de la recaptación de anandamida identificado hasta la fecha ( $\text{CI}_{50}$  = 0,8  $\mu\text{M}$ ) sino también el derivado con un mayor grado de selectividad frente a la FAAH [ $\text{CI}_{50}$  (FAAH) /  $\text{CI}_{50}$  (Recaptación de anandamida)  $\approx$  40].

#### 4.2.3. Determinación de la afinidad receptorial

Los estudios bioquímicos de determinación de afinidad de los compuestos 1-38 por los receptores de cannabinoides  $\text{CB}_1$  y  $\text{CB}_2$  y de vanilloides  $\text{VR}_1$  se han realizado mediante experimentos de desplazamiento de radioligando *in vitro*.

Los ensayos de inhibición competitiva han consistido en incubar la preparación subcelular adecuada con el radioligando tritiado selectivo del receptor de interés y con el compuesto objeto de estudio con el fin de medir la capacidad de éste para desplazar al radioligando en su unión al receptor. Este desplazamiento se expresa mediante el porcentaje de unión específica del compuesto analizado respecto de la unión del radioligando. La unión específica de los compuestos se calcula como la diferencia entre la unión total y la unión en presencia del ligando utilizado para determinar la unión no específica.

La afinidad de los ligandos por el receptor  $\text{CB}_1$  se ha determinado siguiendo el procedimiento experimental descrito por Houston *et al.*<sup>203</sup> con algunas modificaciones, utilizando [ $^3\text{H}$ ]WIN552122 como radioligando y cerebelo de rata como tejido cerebral. La afinidad de los ligandos por el receptor  $\text{CB}_2$  se ha obtenido siguiendo el procedimiento experimental descrito por Griffin *et al.*<sup>204</sup> con algunas variaciones utilizando como radioligando [ $^3\text{H}$ ]CP55940 y como tejido membranas de la línea celular HEK293EBNA transfectadas con el receptor  $\text{CB}_2$  humano. La afinidad de los ligandos por el receptor  $\text{VR}_1$  se ha determinado siguiendo el procedimiento experimental descrito por Szallasi *et al.*<sup>205</sup> con pequeñas modificaciones, utilizando [ $^3\text{H}$ ]RTX como radioligando y médula espinal de rata como tejido.

<sup>200</sup> Fowler, C. J.; Tiger, G.; Ligresti, A.; López-Rodríguez, M. L.; Di Marzo, V. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *492*, 1.

<sup>201</sup> Véase nota 74(b).

<sup>202</sup> (a) Véase nota 100. (b) Véase nota 200.

<sup>203</sup> Houston, D. B.; Evans, D. M.; Howlett, A. C.; Melvin, I. S. *Dupont Biotech. Update* **1991**, *6*, 21.

<sup>204</sup> Griffin, G.; Tao, Q.; Abood, M. E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 886.

<sup>205</sup> Szallasi, A.; Bíró, T.; Szabo, T.; Modarres, S.; Petersen, M.; Klusch, A.; Blumberg, P. M.; Krause, J. E.; Sterner, O. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1351.

En todos los casos se cuantifica la radiactividad unida a las membranas mediante espectrometría de centelleo líquido y el cálculo de la  $CI_{50}$  se realiza mediante regresión no lineal de la curva de desplazamiento, obtenida con el programa Prism (GraphPad). La conversión de  $CI_{50}$  a  $K_i$  se ha llevado a cabo utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff:<sup>206</sup>  $K_i = CI_{50}/(1 + L/K_D)$  donde L es la concentración de radioligando y  $K_D$  su constante de disociación.

En la Tablas I y II se recogen los valores de afinidad de los compuestos de estructura general I por los distintos receptores expresados como  $K_i$ , incluyéndose como valores de referencia los de ligandos representativos de los receptores analizados como son WIN552122, CP55940, RTX y anandamida. Los valores de  $K_i$  obtenidos corresponden a la media y desviación estándar de experimentos individuales realizados de dos a cuatro veces por triplicado.

Del análisis de los datos recogidos en la Tablas I y II se desprende que respecto a los receptores de cannabinoides, la mayoría de los compuestos sintetizados presentan muy baja afinidad tanto por  $CB_1$  como por  $CB_2$  ( $K_i > 1000$  nM), especialmente comparándolos con los valores de afinidad exhibidos por ligandos representativos de los tres tipos de receptores que aparecen recogidos en la Tabla I. Sólo el compuesto **24** muestra una moderada afinidad por ambos receptores de cannabinoides [ $K_i$  ( $CB_1$ ) = 124 nM,  $K_i$  ( $CB_2$ ) = 70 nM] y los compuestos **7**, **11** y **26** por el  $CB_2$  [ $K_i$  ( $CB_1$ , **7**) = 4700 nM,  $K_i$  ( $CB_2$ , **7**) = 67 nM;  $K_i$  ( $CB_1$ , **11**) = 913 nM,  $K_i$  ( $CB_2$ , **11**) = 274 nM;  $K_i$  ( $CB_1$ , **26**) > 1000 nM,  $K_i$  ( $CB_2$ , **26**) = 400 nM].

En relación a los receptores de vanilloides  $VR_1$ , la mayoría de los compuestos sintetizados resultan asimismo inactivos ( $K_i > 5000$  nM), mostrando una clara selectividad.

Hasta el momento no se ha descrito en la bibliografía ningún inhibidor de la recaptación de

anandamida tan potente como el compuesto **7** (-X-Y = -CO-NH-, Z = H, n = 0 y subunidad heterocíclica de 3-furilo), el cual, además de su excelente valor de  $CI_{50}$  = 0,8  $\mu$ M exhibe una elevada selectividad frente a la enzima FAAH ( $CI_{50}$  = 30  $\mu$ M) y los receptores  $CB_1$  y  $VR_1$  [ $K_i$  ( $CB_1$ ) = 4700 nM,  $K_i$  ( $VR_1$ ) > 5000 nM].

Su moderada afinidad exclusivamente por el receptor  $CB_2$  ( $K_i$  = 67 nM) indica la posibilidad de activar dicho receptor y simultáneamente inhibir el metabolismo de los endocannabinoides. Esta potenciación de la transmisión endocannabinoide carecería por tanto de los efectos psicotrópicos asociados a una estimulación directa de los receptores  $CB_1$  cerebrales, con las interesantes posibilidades terapéuticas que de este hecho se derivan.

El excelente perfil in vitro obtenido para el compuesto **7** (UCM707) hace de este derivado una herramienta farmacológica excepcional tanto a un nivel básico para esclarecer aspectos del funcionamiento del SCE aún desconocidos, como a un nivel aplicado, enfocado a su posible aplicabilidad terapéutica.

Así, dentro del contexto de investigación básica en el SCE, el compuesto UCM707 representa una herramienta fundamental para el estudio de la recaptación de anandamida y, especialmente, de la influencia de la enzima FAAH en este proceso. Por otro lado, y dentro ya de un nivel aplicado, el UCM707 constituye un candidato ideal para estudiar la aplicabilidad terapéutica de los inhibidores de la recaptación de anandamida a diversas patologías neurodegenerativas, tales como la esclerosis múltiple.

<sup>206</sup> Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.

#### 4.3. INFLUENCIA DE LA ENZIMA FAAH EN LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA

Teniendo en cuenta las hipótesis que atribuyen el proceso de recaptación de anandamida exclusivamente a la acción de la FAAH,<sup>207</sup> se llevaron a cabo estudios dirigidos a determinar la contribución de esta enzima al transporte de anandamida. Para ello, se analizó la acumulación de anandamida utilizando el compuesto UCM707 en cultivos primarios de neuronas corticales procedentes de ratones en los que se ha eliminado genéticamente la enzima FAAH (FAAH *knockout*, FAAH<sup>-/-</sup>).

##### 4.3.1. Caracterización de un componente no celular en la recaptación de anandamida

En primer lugar se establecieron las condiciones idóneas para estudiar la acumulación de anandamida, con el objeto de comparar la recaptación en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup>. Teniendo en cuenta la naturaleza altamente hidrófoba de la anandamida, se prestó especial atención a las interacciones no específicas, tales como la posible adsorción de la anandamida en las placas de cultivo. Los resultados obtenidos en estas condiciones mostraron un elevado grado de unión inespecífica en ausencia de neuronas. Esta unión, al igual que la recaptación en neuronas tanto FAAH<sup>+/+</sup> como FAAH<sup>-/-</sup>, es dependiente de la temperatura (Figura 6).

Además, la interacción no específica entre la anandamida y placas de cultivo vacías es bloqueada por el UCM707 en una manera dosis-dependiente con una curva sigmoidea característica de interacciones específicas entre una proteína y su ligando (Figura 7).

Esta alta unión inespecífica de la anandamida hizo necesario establecer unas nuevas condiciones que permitieran cuantificar de una forma fiable la recaptación de anandamida y discriminar claramente entre sus componentes específico e inespecífico.

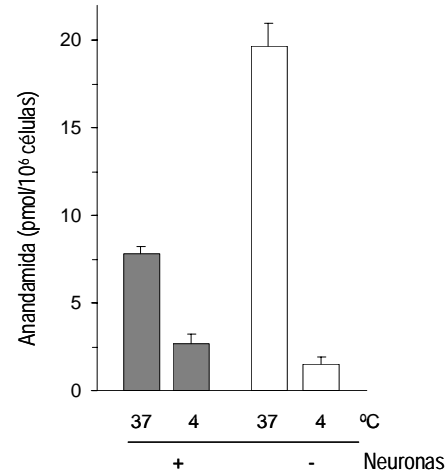


Figura 6. Acumulación de anandamida en placas de cultivo con neuronas FAAH<sup>+/+</sup> (barras sombreadas) o vacías (barras blancas)

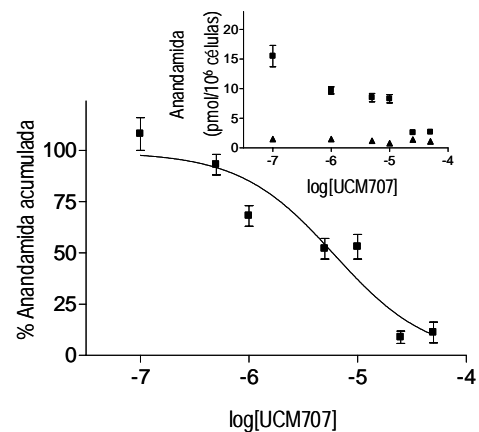
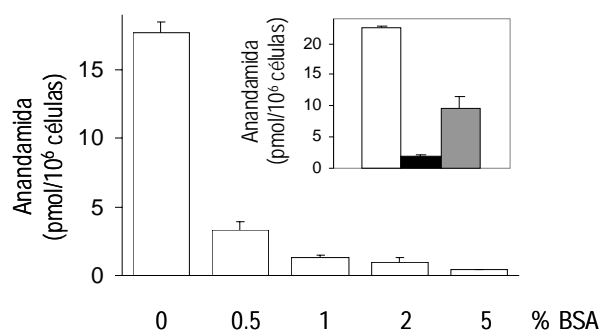


Figura 7. Bloqueo de la acumulación de anandamida por el UCM707 en placas de cultivo vacías

<sup>207</sup> Véase nota 58.

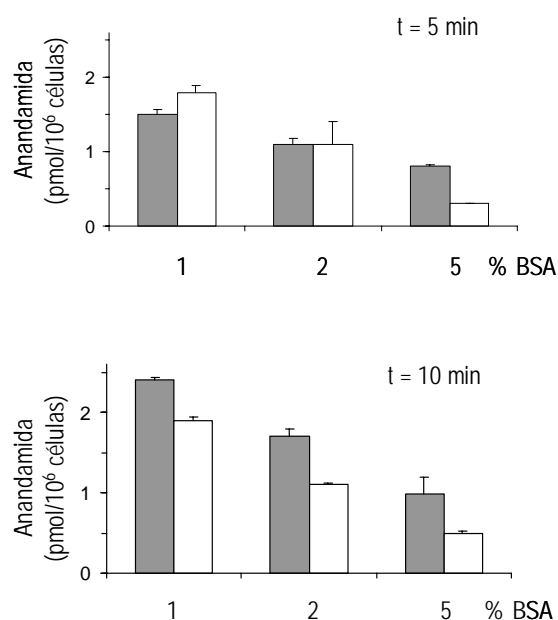
#### 4.3.2. Eliminación del componente no celular de la recaptación de anandamida

El alto grado de la unión no específica de la anandamida y también del UCM707 a las placas de cultivo, hizo necesaria la inclusión de una proteína con capacidad transportadora, capaz de mantener en solución estas moléculas altamente lipofílicas. La albúmina de suero bovino (BSA) se utiliza ampliamente en el estudio del transporte de lípidos para mejorar su solubilidad y difusión a través de medios acuosos y reducir las interacciones no específicas de los lípidos con proteínas y superficies, facilitando por tanto el estudio de sus interacciones con sitios de unión específicos.<sup>208</sup> Por tanto, se llevaron a cabo incubaciones en presencia de concentraciones crecientes de BSA con objeto de identificar las condiciones que permitieran eliminar el mayor grado de unión no específica (Figura 8).



**Figura 8.** Acumulación de anandamida en placas de cultivo vacías en presencia de BSA. La gráfica insertada muestra la anandamida retenida en las placas en ausencia de BSA (barra blanca), en presencia de 1% BSA (barra negra) o tras bloquear con 1% BSA y lavar con medio de cultivo (barra gris)

La concentración óptima de BSA fue identificada como un 5%, permitiendo estas condiciones una clara diferenciación de la acumulación de anandamida en presencia y en ausencia de células (Figura 9). Además, esta concentración de BSA es aproximadamente la cantidad de albúmina presente en el suero de especies tales como la rata o el humano,<sup>209</sup> lo que dota a estas condiciones experimentales de una mayor similitud fisiológica, al menos en lo que al transporte sistémico o periférico de la anandamida se refiere.



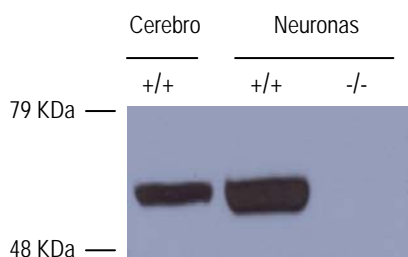
**Figura 9.** Acumulación de anandamida durante cinco y diez minutos de incubación en presencia de diversas concentraciones de BSA en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> (barras sombreadas) o en placas de cultivo sin células (barras blancas)

<sup>208</sup> (a) Véase nota 84. (b) Hamilton, J. A.; Kamp, F. *Diabetes* **1999**, *48*, 2255.

<sup>209</sup> Véase nota 124.

#### 4.3.3. Recaptación de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup>

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas del ensayo (5% BSA, 10 min), se estudió la recaptación de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup>. El análisis mediante *western blot* confirmó la elevada expresión de FAAH en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> así como su ausencia en las FAAH<sup>-/-</sup> (Figura 10).

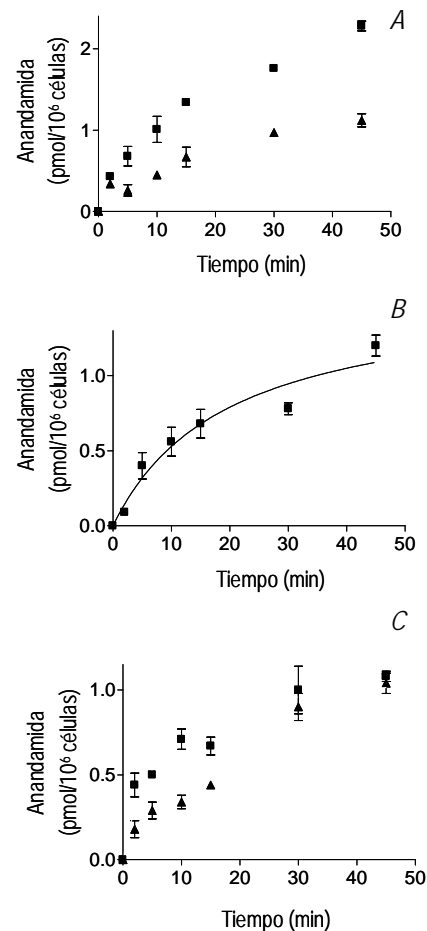


**Figura 10.** Análisis mediante *western blot* de la expresión de FAAH en cultivos de neuronas corticales FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup>

Los estudios del curso temporal de la recaptación de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> mostraron que la diferencia entre la recaptación de anandamida en presencia y ausencia de células se mantenía aproximadamente constante a lo largo de todo el intervalo de tiempo analizado (Figura 11A). La sustracción de la componente inespecífica (unión de anandamida en ausencia de células) de la recaptación total (anandamida incorporada en presencia de células) permitió obtener la cinética de recaptación específica (Figura 11B).

Experimentos análogos realizados en neuronas FAAH<sup>-/-</sup> (Figura 11C) indicaron que durante los primeros veinte minutos las diferencias entre la acumulación de anandamida en presencia y ausencia de células se mantienen, siendo comparables a las obtenidas en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> (Figura 11A). Sin embargo, a tiempos más largos (a partir de veinte minutos), la acumulación en ausencia de células se aproximaba a los valores

obtenidos en presencia de células (Figura 11C), indicando que en neuronas FAAH<sup>-/-</sup> la recaptación específica alcanza su saturación a una concentración inferior de anandamida que en el caso de neuronas FAAH<sup>+/+</sup>. Esto es consistente con el hecho de que las neuronas FAAH<sup>-/-</sup> acumulan menos cantidad total de anandamida que las neuronas FAAH<sup>+/+</sup> a lo largo de todo el intervalo de tiempo analizado, como muestra la diferencia entre la anandamida total acumulada en las neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup> (Figuras 11B y 11C).



**Figura 11.** A, Acumulación de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> (■) y en placas vacías (▲). B, Acumulación celular de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup>. C, Acumulación de anandamida en neuronas FAAH<sup>-/-</sup> (■) y en placas vacías (▲)

Estos datos sugieren que la enzima FAAH contribuye de forma significativa a la recaptación de anandamida, especialmente a tiempos largos de incubación. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que describen cómo la presencia de la FAAH aumenta la recaptación de anandamida e indican que esta enzima contribuye al proceso de recaptación, sobre todo a tiempos largos.<sup>210</sup>

Adicionalmente, recientes estudios describen un efecto similar en preparaciones obtenidas a partir de sinaptosomas de ratones FAAH<sup>-/-</sup>,<sup>211</sup> los cuales muestran una recaptación de anandamida saturable aunque de menor magnitud que en el caso de preparaciones similares FAAH<sup>+/+</sup>.

Sin embargo, a tiempos cortos (como por ejemplo 10 minutos), la acumulación de anandamida tanto en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> como FAAH<sup>-/-</sup> es similar (Figuras 11A y 11C) y puede ser comparada directamente. Por tanto, a tiempos cortos, existe un componente de la recaptación de anandamida que es independiente de la FAAH. Este resultado indica que aunque esta enzima contribuye al proceso de internalización de la anandamida, ambos fenómenos, recaptación e hidrólisis, no están intrínsecamente unidos. Por tanto, nos centramos en el estudio de este proceso independiente de la enzima FAAH.

#### 4.3.4. Inhibición de la recaptación de anandamida por el UCM707 en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup>

Utilizando las condiciones de ensayo previamente seleccionadas (5% BSA, 10 minutos de incubación), se determinó el efecto de inhibición del UCM707 tanto en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> como FAAH<sup>-/-</sup>. En ambos casos el UCM707 fue capaz de inhibir la recaptación de anandamida (Figuras 12A y 12B) con eficacias y

potencias comparables [ $IC_{50}$  (+/+) =  $4 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $IC_{50}$  (-/-) =  $3 \pm 1 \mu\text{M}$ ].

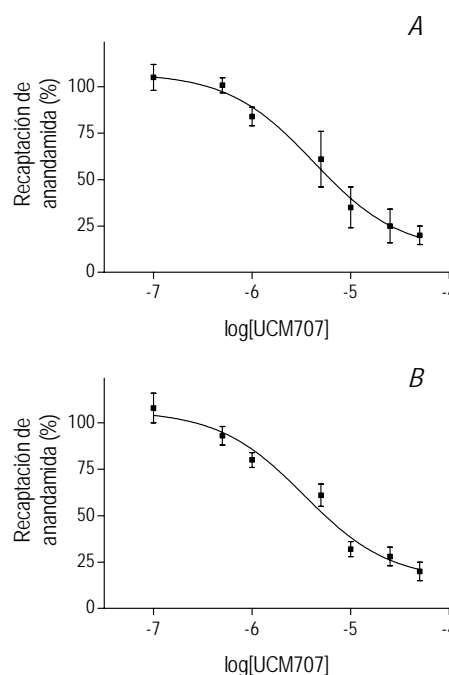


Figura 12. Inhibición de la recaptación de anandamida por el UCM707 en A, neuronas FAAH<sup>+/+</sup> o B, neuronas FAAH<sup>-/-</sup>.

Adicionalmente, y con el fin de verificar que, efectivamente, estos resultados no estuvieran reflejando un efecto inesperado del UCM707 sobre la FAAH, se determinó el efecto de este compuesto sobre la actividad enzimática en las mismas preparaciones empleadas para estudiar la recaptación. La presencia de concentraciones de UCM707 de hasta  $50 \mu\text{M}$  no produjo ninguna inhibición significativa sobre la actividad de la enzima FAAH en los cultivos neuronales ni tampoco en homogeneizado de tejido cerebral, obteniéndose resultados comparables en ambos casos. Estos datos están de acuerdo con los resultados previos de la baja capacidad inhibitoria del UCM707 sobre la FAAH ( $IC_{50}$  =  $30 \mu\text{M}$ , Tabla I) y son consistentes con la potencia similar que este compuesto muestra para inhibir la recaptación

<sup>210</sup> Véase nota 54(b).

<sup>211</sup> Ligresti, A.; Morera, E.; van der Stelt, M.; Monory, K.; Lutz, B.; Ortar, G.; Di Marzo, V. *Biochem. J.* 2004, doi: 10.1042/BJ20031812.

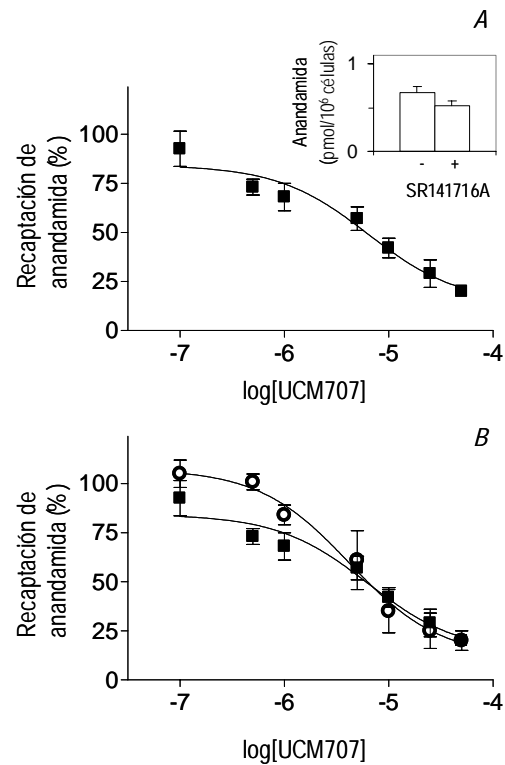


de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup> [ $Cl_{50}$  (+/+) =  $4 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $Cl_{50}$  (-/-) =  $3 \pm 1 \mu\text{M}$ , respectivamente].

Este resultado apoya la existencia de al menos una entidad proteica adicional y distinta de la FAAH que puede ser inhibida de forma selectiva por el UCM707.

Una proteína que podría contribuir al componente de la recaptación de anandamida independiente de la FAAH es el receptor CB<sub>1</sub>, el cual muestra una elevada expresión en neuronas corticales.<sup>212</sup> Por tanto, y con objeto de estudiar la posible implicación de este receptor cannabinoide, se llevaron a cabo diversos estudios de recaptación de anandamida en presencia de su antagonista selectivo, el compuesto SR141716A.

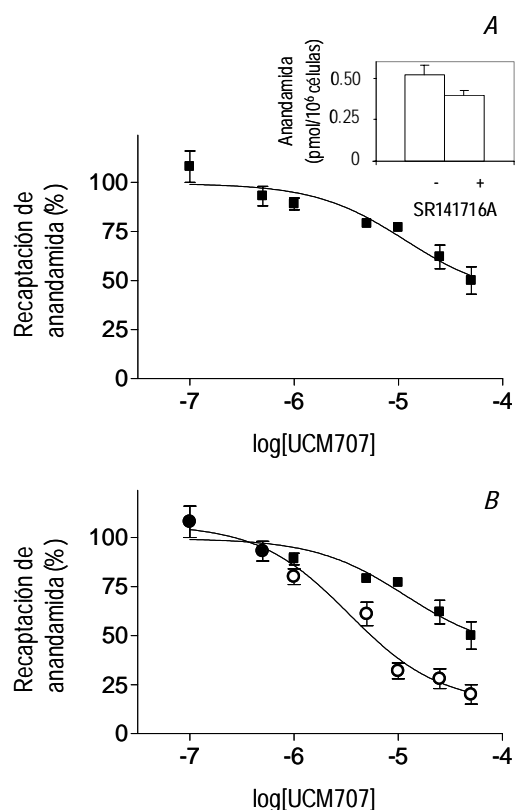
El tratamiento de cultivos neuronales FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup> con SR141716A (100 nM) produjo una moderada reducción en la acumulación total de anandamida (aproximadamente un 20%) en ambos tipos de células (Figuras 13A y 14A, gráficas insertadas). Sin embargo, la presencia de SR141716A ejerció efectos notablemente distintos sobre la inhibición producida por el UCM707 en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup>. Así, mientras que el SR141716A apenas afectó a la inhibición de la recaptación de anandamida producida por el UCM707 en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> ( $Cl_{50} = 4 \pm 1 \mu\text{M}$ ; Figura 13), sí produjo una marcada disminución en neuronas FAAH<sup>-/-</sup> (Figura 14) tanto en la eficacia (valores de inhibición máxima de aproximadamente 50% y 80% en presencia y ausencia de SR141716A, respectivamente) como en la potencia inhibitoria ( $Cl_{50} = 11 \pm 1 \mu\text{M}$ ;  $Cl_{50} = 3 \pm 1 \mu\text{M}$  en presencia y ausencia de SR141716A, respectivamente). Estos resultados sugieren que el receptor CB<sub>1</sub> podría contribuir de forma significativa al proceso de recaptación de anandamida. Además, se observa claramente cómo la ausencia de FAAH junto con el bloqueo simultáneo del receptor CB<sub>1</sub> debido a la presencia de su antagonista, provoca un aumento en la difusión de la anandamida a través de las membranas, recaptación que no se inhibe por el UCM707 (Figura 14A).



**Figura 13.** A, Inhibición de la recaptación de anandamida por el UCM707 en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> en presencia del antagonista SR141716A. La gráfica insertada muestra la anandamida acumulada por las células en presencia o ausencia del antagonista. B, Superposición del efecto inhibitorio del UCM707 en ausencia (O) o presencia (■) del antagonista

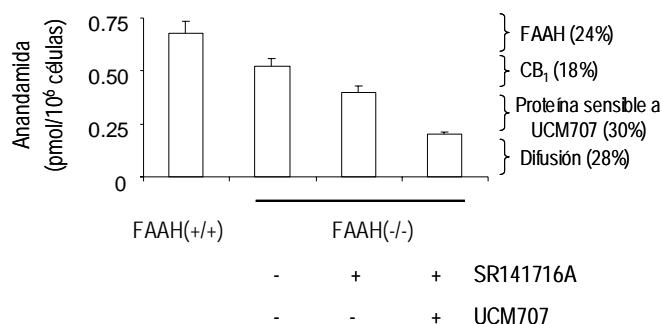
Considerados en conjunto, estos datos indican que el proceso de recaptación de anandamida es un fenómeno complejo, compuesto por una contribución proteica (mediada por diferentes entidades tanto ya identificadas -FAAH, CB<sub>1</sub>- como aún desconocidas) junto con una componente de difusión simple. Las contribuciones relativas de cada uno de estos componentes a la recaptación global de anandamida pueden ser analizadas comparando los niveles absolutos

<sup>212</sup> Véase nota 48(a).



**Figura 14.** A, Inhibición de la recaptación de anandamida por el UCM707 en neuronas FAAH<sup>-/-</sup> en presencia del antagonista SR141716A. La gráfica insertada muestra la anandamida acumulada por las células en presencia o ausencia del antagonista. B, Superposición del efecto inhibitorio del UCM707 en ausencia (○) o presencia (■) del antagonista

de anandamida bajo las condiciones en que estas proteínas han sido bloqueadas farmacológicamente o eliminadas genéticamente. Así, como se esquematiza en la Figura 15, la componente inespecífica de difusión simple contribuye en aproximadamente un 30%, correspondiendo el 70% restante a la componente específica mediada por proteínas. De esta contribución específica, FAAH y CB<sub>1</sub> dan cuenta de aproximadamente un 50%. El otro 50% de la recaptación, que puede ser inhibido de forma específica por el UCM707, indica la existencia de otra(s) proteína(s) adicional(es) sensible(s)



**Figura 15.** Contribución relativa de las proteínas individuales y de la difusión a la recaptación celular de anandamida

a la acción de este compuesto y que también participaría en el transporte celular de anandamida. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que la proteína transportadora de anandamida podría ser una proteína citosólica que facilite el transporte de anandamida desde su sitio de acción en el receptor CB<sub>1</sub> hasta las membranas intracelulares donde la FAAH se localiza.<sup>213</sup> El receptor CB<sub>1</sub>, la enzima FAAH y una tercera proteína implicada en el transporte de anandamida podrían residir en una proximidad espacial y actuar como un sistema de señalización coordinado, quizá organizado en microdominios de membrana tipo *lipid rafts*. En este contexto, se podría proponer que la proteína implicada en el movimiento de la anandamida transportaría ésta desde los receptores CB<sub>1</sub> de la membrana plasmática a las proximidades de la FAAH, situada en las membranas intracelulares.

Este mecanismo sería similar a otros previamente descritos en los cuales ciertas proteínas citosólicas con función transportadora juegan importantes papeles en el transporte de lípidos tales como determinados ácidos grasos, colesterol o ceramida entre distintos

<sup>213</sup> Véase nota 51(b).

compartimentos celulares.<sup>214</sup> En el caso de la recaptación de anandamida, la reducción en el nivel de recaptación específica obtenido en neuronas FAAH<sup>-/-</sup> en presencia del antagonista de CB<sub>1</sub> (Figura 14) sería consistente con un proceso de este tipo. Un mecanismo de esta clase se encontraría funcionalmente inutilizado en una extensión importante si las proteínas que funcionan como punto de partida y de llegada de la anandamida, es decir, el receptor CB<sub>1</sub> y la FAAH, se encuentran inactivadas al mismo tiempo. Además, este modelo sería también consistente con los recientes hallazgos que muestran que también la liberación de anandamida es bloqueada por inhibidores de la recaptación,<sup>215</sup> ya que una proteína intracelular podría promover el movimiento bidireccional de las amidas de ácidos grasos hacia dentro y hacia fuera de las neuronas. Finalmente, estos datos que indican la existencia de un componente proteico implicado en la recaptación de anandamida distinto de la FAAH son también consistentes con un estudio muy reciente que describe la saturabilidad de la recaptación de anandamida en sinaptosomas obtenidos a partir de ratones FAAH<sup>-/-</sup>.<sup>216</sup>

Todos estos resultados, considerados en conjunto, ponen de manifiesto que para poder definir el papel que realmente juegan las proteínas responsables de la unión y el transporte en la recaptación de moléculas altamente hidrófobas como es el caso de la anandamida, existen muchos problemas intrínsecos que deben tenerse en cuenta. Algunos de estos factores son la adsorción no específica a las placas de cultivo, la contribución de la difusión simple a través de las membranas celulares y la presencia de enzimas catabólicas intracelulares que pueden crear gradientes que actuarían como fuerzas conductoras de la internalización de sus sustratos lipídicos.

Bajo estas condiciones experimentales optimizadas, la comparación entre la recaptación de anandamida en neuronas FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup> ha permitido evaluar la contribución de la enzima FAAH al proceso de recaptación de la anandamida. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una proteína distinta de la FAAH en la recaptación de anandamida, aunque esta enzima interviene notablemente en el proceso. Además se pone de manifiesto la contribución del receptor CB<sub>1</sub> a la internalización de anandamida, sugiriendo que la proteína transportadora de anandamida podría funcionar de forma análoga a otras proteínas transportadoras de lípidos, facilitando el movimiento de la anandamida desde su sitio de acción (el receptor CB<sub>1</sub>) a su sitio de degradación (la enzima FAAH) una vez que ha terminado su función.<sup>217</sup> Este mecanismo proveería de una extraordinaria capacidad a la célula para regular estrechamente el ciclo de activación/desactivación de la señalización inducida por el receptor CB<sub>1</sub>.

Por supuesto únicamente el aislamiento y caracterización molecular de la proteína implicada en el transporte de anandamida supondrá la evidencia definitiva de su existencia y permitirá su identificación inequívoca.

#### 4.4. APLICABILIDAD TERAPÉUTICA DEL INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA UCM707 EN UN MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

El prometedor perfil *in vitro* del UCM707 constituye un excelente punto de partida para el estudio de este compuesto desde un punto de vista aplicado.

Los datos preliminares de los primeros estudios realizados confirmaron que el UCM707 era activo *in vivo* y que los efectos observados eran compatibles con el perfil *in vitro* previamente establecido. Así, los resultados obtenidos, ponían de manifiesto que el UCM707 se comportaba *in vivo* como un inhibidor de la recaptación de anandamida. La administración simultánea de dosis

<sup>214</sup> (a) Véase nota 153. (b) Soccio, R. E.; Breslow, J. L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22183.

<sup>215</sup> (a) Véase nota 211. (b) Ronesi, J.; Gerdeman, G. L.; Lovinger, D. M. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 1673.

<sup>216</sup> Véase nota 211.

<sup>217</sup> Ortega-Gutiérrez, S.; Hawkins, E. G.; Viso, A.; López-Rodríguez, M. L.; Cravatt, B. F. *Biochemistry* **2004**, en prensa.

subefectivas de UCM707 y anandamida producía una clara potenciación de los efectos de este endocannabinoide, fundamentalmente en cuanto a antinocicepción e inmovilidad.<sup>218</sup>

Estos resultados iniciales in vivo nos llevaron a estudiar si la potenciación del SCE mediante la administración de un agonista indirecto como el UCM707 podía constituir realmente un abordaje terapéutico eficaz para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurodegenerativa de carácter crónico caracterizada por respuestas autoinmunes contra las proteínas que constituyen la mielina. La destrucción de ésta conduce de forma progresiva a importantes deficiencias sensoriales y a una coordinación motora altamente deteriorada, como consecuencia de las alteraciones en la transmisión nerviosa. Aunque la destrucción de la mielina se atribuye fundamentalmente a una exacerbada respuesta inmune mediada específicamente por células T colaboradoras de tipo 1 CD4<sup>+</sup> (Th1 CD4<sup>+</sup>), la presencia de un ambiente altamente proinflamatorio en la zona dañada contribuye también a frenar el proceso de remielinización.<sup>219</sup>

La encefalomielititis murina inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD) produce una enfermedad desmielinizante cuya progresión y sintomatología es muy similar a la esclerosis múltiple humana,<sup>220</sup> por lo que se seleccionó este modelo para estudiar la aplicabilidad terapéutica del UCM707 a la patología de la esclerosis múltiple.

#### 4.4.1. Análisis de las deficiencias neurológicas asociadas a la funcionalidad motora

La evaluación de las deficiencias neurológicas de los ratones se analizó empleando un rotarod. El rotarod es un aparato compuesto por un rodillo que gira con velocidad o con aceleración constante y se sitúa suspendido sobre una plataforma. La capacidad de los ratones para mantenerse sobre el rotarod refleja su equilibrio, coordinación y control motor, de tal modo que la desmielinización inducida por el virus de Theiler se relaciona directamente con una disminución de su capacidad para mantenerse sobre el rotarod.<sup>221</sup>

Los ratones infectados con el virus de Theiler presentaron una menor capacidad para mantenerse sobre el rotarod comparados con el grupo control no infectado antes de comenzar el tratamiento (Figura 16A). Tras finalizar el tratamiento (administración durante doce días de una dosis intraperitoneal de 5 mg/Kg/día de UCM707) los ratones tratados mostraron una significativa mejoría en su capacidad para mantenerse sobre el rotarod frente a los animales que únicamente habían recibido vehículo (Figura 16B). La administración de UCM707 a ratones control no modificó, al menos aparentemente, el comportamiento motor de éstos (Figura 16B).

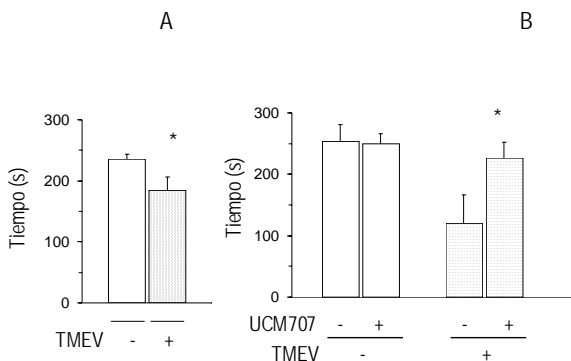
Adicionalmente, utilizando la caja de actividad (*activity cage*) se evaluaron otros parámetros motores tales como la actividad horizontal y vertical, tanto antes del inicio del tratamiento (Figura 17A) como una vez finalizado éste (Figura 17B), observándose como la administración de UCM707 produce claras mejorías en ambos parámetros.

<sup>218</sup> De Lago, E.; Fernández-Ruiz, J.; Ortega-Gutiérrez, S.; Viso, A.; López-Rodríguez, M. L.; Ramos, J. A. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *449*, 99.

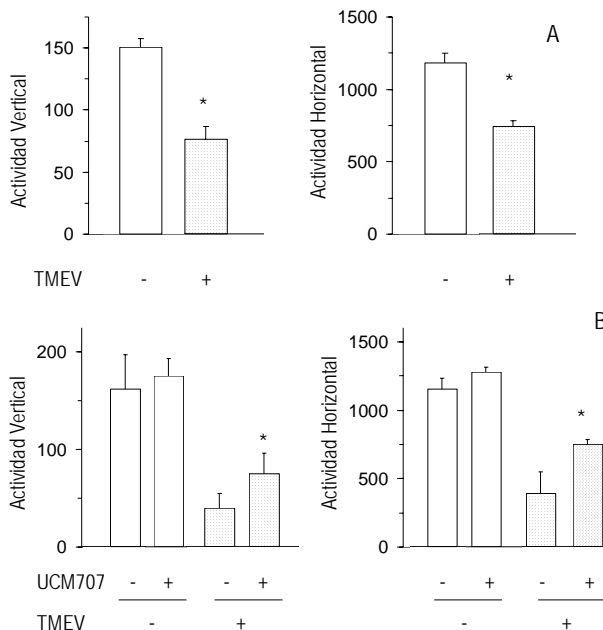
<sup>219</sup> Noseworthy, J. H.; Lucchinetti, C.; Rodríguez, M.; Weinshenker, B. G. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 938.

<sup>220</sup> Dal Canto, M. C.; Lipton, H. L. *Am. J. Pathol.* **1977**, *88*, 497.

<sup>221</sup> McGavern, D. B.; Zoehlein, L.; Drescher, K. M.; Rodríguez, M. *Exp. Neurol.* **1999**, *158*, 171.



**Figura 16.** Capacidad para mantenerse sobre el rotarod de ratones infectados con TMEV (barras punteadas) o sin infectar (barras blancas) *A*, antes del tratamiento (n= 14); \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) o *B*, tras finalizar el tratamiento (vehículo o 5 mg/Kg/día UCM707, 12 días, i.p.; n= 7); \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente al grupo tratado con vehículo



**Figura 17.** Actividad vertical y horizontal de ratones infectados con TMEV (barras punteadas) o sin infectar (barras blancas) *A*, antes del tratamiento (n = 14); \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) o *B*, tras finalizar el tratamiento (vehículo o 5 mg/Kg/día UCM707, 12 días, i.p.; n= 7); \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente al grupo tratado con vehículo

#### 4.4.2. Activación microglial

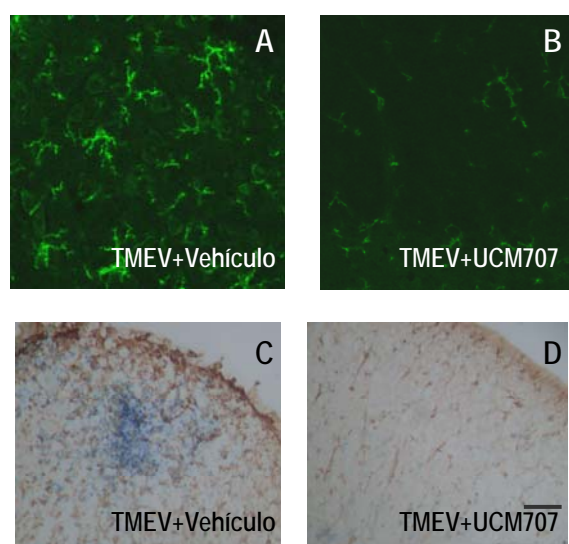
La infección con TMEV produce una activación inmune crónica mediada por células Th1 CD4+ específicas de forma que ciertos epítopos de la mielina son reconocidos y atacados, conduciendo a la destrucción progresiva de la misma. La activación de estos linfocitos T se produce tras una interacción previa con células presentadoras de antígenos (APCs), proceso en el que están implicados tanto la microglía activada residente en la médula espinal como los macrófagos periféricos que se infiltran en esta zona.<sup>222</sup> La microglía residente en la médula espinal de ratones que no han sido infectados con el TMEV se encuentra en un estado de reposo (*resting*) y no se comportan como células competentes presentadoras de antígenos. Sin embargo, la infección con el virus de Theiler hace que la microglía abandone su estado de reposo transformándose en microglía reactiva y convirtiéndose en una potente célula presentadora de antígeno. Por otro lado, los macrófagos provenientes de la periferia que han migrado hacia la zona de daño celular infiltrándose en la médula espinal, funcionan también como potentes APCs con capacidad, por tanto, para activar las células T responsables de la destrucción de la mielina.

La infección con TMEV produjo un claro aumento de la reactividad microglial, con su morfología ameboide característica, y de los infiltrados en la médula espinal (Figuras 18A y 18C). La administración del UCM707 indujo una disminución tanto en la reactividad microglial como en los infiltrados celulares (Figuras 18B y 18D). En las Figuras 18C y 18D puede observarse también el marcaje correspondiente a los vasos sanguíneos, a los que la lectina de tomate también reconoce.

En el SNC de ratones infectados con el TMEV, los macrófagos y la microglía presentan antígenos de la mielina a las células T CD4+ fundamentalmente a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de

<sup>222</sup> Mack, C. L.; Vanderlugt-Castaneda, C. L.; Neville, K. L.; Miller, S. D. *J. Neuroimmunol.* **2003**, *144*, 68.

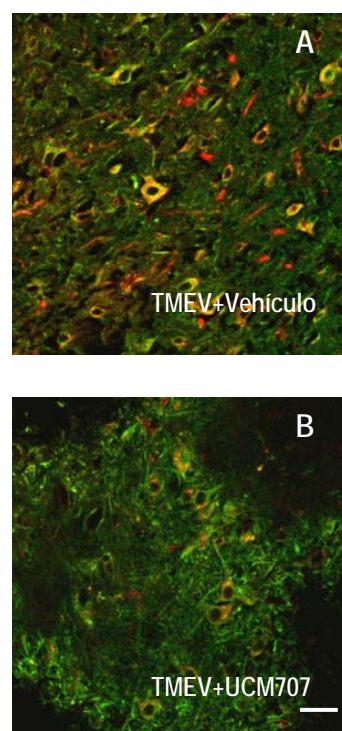
tipo II.<sup>223</sup> El marcaje doble para microglía/macrófagos (CD11b) y para el haplotipo H-2A del MHC de clase II en los ratones infectados con el virus puso de manifiesto la presencia predominante de los antígenos MHC de clase II en las células microgliales/macrófagos CD11b<sup>+</sup> (Figura 19A). La colocalización de ambos antígenos se observa claramente (color amarillo) en los ratones que sólo recibieron vehículo (Figura 19A). El tratamiento con el UCM707 redujo drásticamente la expresión de MHC de tipo II en la microglía (Figura 19B). Este efecto inmunomodulador resulta clave para disminuir la activación de las células T y por tanto frenar el ataque y destrucción de la mielina.



**Figura 18.** Disminución de la reactividad microglial y de los infiltrados celulares por tratamiento con UCM707. Células CD11b<sup>+</sup> (microglía/macrófagos) en secciones de médula espinal en ratones infectados con TMEV tratados *A*, con vehículo o *B*, con UCM707. Marcaje con lectina de tomate y tinción de contraste con azul de toluidina en secciones de médula espinal en ratones infectados con TMEV tratados *C*, con vehículo o *D*, con UCM707 (escala, 40 µm en *A, B* y 50 µm en *C, D*)

<sup>223</sup> Katz-Levy, Y.; Neville, K. L.; Girvin, A. M.; Vanderlugt, C. L.; Pope, J. G.; Tan, L. J.; Miller, S. D. *J. Clin. Invest.* **1999** *104*, 599.

Estos datos indican que el aumento del tono endógeno cannabinoide mediante la administración de un inhibidor de la recaptación de anandamida induce una significativa mejora funcional en el modelo de esclerosis múltiple empleado. Esta mejoría se refleja en la notable recuperación motora observada en diversos ensayos (Figuras 16B y 17B).



**Figura 19.** Disminución de la expresión del antígeno MHC de clase II en células microgliales tras la administración de UCM707. Localización del antígeno MHC de clase II (rojo) en células CD11b<sup>+</sup> (verde) en secciones de médula espinal en ratones infectados con TMEV tratados *A*, con vehículo o *B*, con UCM707 (escala, 40 µm)

La activación del SCE tiene un efecto inmunomodulador caracterizado por una disminución del ambiente inflamatorio que favorece la recuperación funcional. El tratamiento con el UCM707 produce una

disminución de la reactividad microglial e infiltrados periféricos (Figuras 18B y 18D) así como de la expresión del antígeno MHC de clase II por la microglía/macrófagos (Figura 19B), lo que en definitiva produce una inhibición de la respuesta inmune mediada por las células T CD4<sup>+</sup>, implicadas en la destrucción de la mielina.

Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que muestran que el tratamiento con agonistas cannabinoides produce importantes mejoras funcionales y favorece la remielinización, disminuyendo el ambiente inflamatorio y favoreciendo la supervivencia y diferenciación de los oligodendrocitos.<sup>224</sup> Sin embargo, estos resultados muestran por primera vez que se pueden conseguir unos efectos terapéuticos beneficiosos análogos por activación del SCE mediante agonistas indirectos como el UCM707. El aumento selectivo del tono cannabinoide endógeno sólo en las zonas donde fisiológicamente está implicado en los efectos deseados tiene las ventajas de carecer de efectos secundarios colaterales, tales como la aparición de problemas psicotrópicos o la generación de otros efectos distintos de los buscados por activación de los receptores de cannabinoides de una forma generalizada.<sup>225</sup>

Los datos obtenidos son consistentes con hallazgos previos que describían una mejora en la sintomatología de un modelo agudo de esclerosis múltiple mediante la activación del SCE con agonistas indirectos inhibidores de la FAAH (como el AM376) y de la recaptación de anandamida (AM404 y VDM11).<sup>226</sup> Sin embargo, en este caso no puede descartarse que al menos parte de los efectos observados se deban a una inhibición de la enzima FAAH (en el caso del VDM11) o a una activación de los receptores de vanilloides (en el caso del AM404). Por tanto, el presente estudio describe por primera vez el efecto terapéutico de un inhibidor selectivo de la

recaptación de anandamida en un modelo crónico de esclerosis múltiple.

#### 4.4.3. Efecto del UCM707 en la producción de factores proinflamatorios en células microgliales en cultivo

Puesto que los resultados anteriores parecen atribuir los efectos beneficiosos asociados al tratamiento con el UCM707 a una disminución del ambiente proinflamatorio, se llevaron a cabo una serie de experimentos con objeto de confirmar este aspecto. Así, se utilizaron cultivos de microglía sometidos a un estímulo proinflamatorio (administración del lipopolisacárido bacteriano, LPS) y se estudió el efecto del UCM707 sobre la producción de ciertos factores proinflamatorios tales como las interleuquinas (IL) 1 $\beta$  y 6, el NO y la expresión de enzimas implicadas en estas vías de inflamación como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa inducible (COX-2).

La cuantificación de los niveles de IL-1 $\beta$  y de IL-6 se ha llevado a cabo utilizando ensayos de enzimoimmunoensayo (ELISA) comerciales. La determinación de las concentraciones de NO se ha realizado empleando el método colorimétrico de Griess,<sup>227</sup> que valora la cantidad de NO presente en forma de nitritos por absorbancia a 550 nm. La expresión de proteínas se ha analizado por *western blot* y se ha cuantificado mediante densitometría de las bandas correspondientes. Todos los datos se expresan como los valores medios y el error estándar de dos a cuatro experimentos independientes realizados por duplicado.

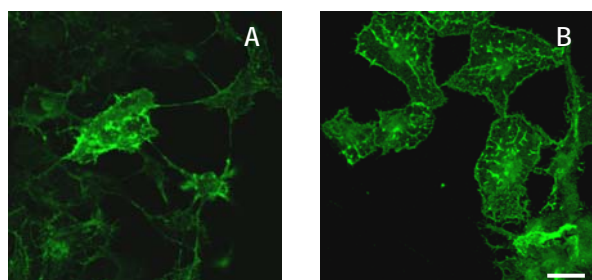
La estimulación con LPS (50  $\mu$ g/mL) de células microgliales en cultivo produjo un marcado efecto de activación, como se observa en la adquisición de una morfología reactiva (Figura 20).

<sup>224</sup> Véase nota 181(e).

<sup>225</sup> Véase nota 71.

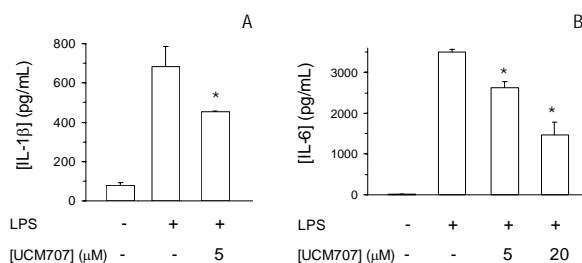
<sup>226</sup> Véase nota 79.

<sup>227</sup> Green, L. C.; Wagner, D. A.; Glowgowski, J.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131.



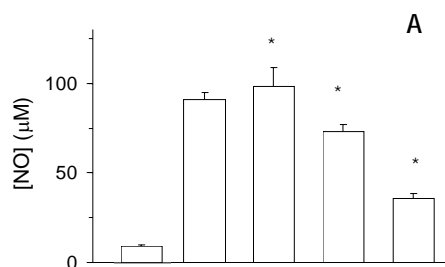
**Figura 20.** Células microgliales (OX-42<sup>+</sup>) en cultivo *A*, antes o *B*, después de ser estimuladas con LPS 50 µg/mL (escala, 25 µm)

Esta activación se refleja en un claro aumento en la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 (Figura 21). La administración de UCM707 (5 µM) produjo una inhibición significativa en la producción de IL-1 $\beta$  (Figura 21A). Sin embargo, esta misma dosis indujo un efecto menos marcado en la síntesis de IL-6 (Figura 21B), llegándose en este caso a obtener efectos similares a concentraciones más altas del compuesto (20 µM).

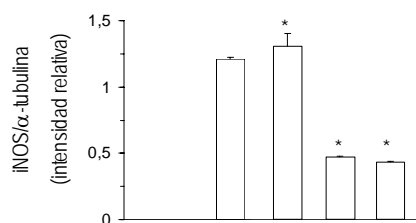
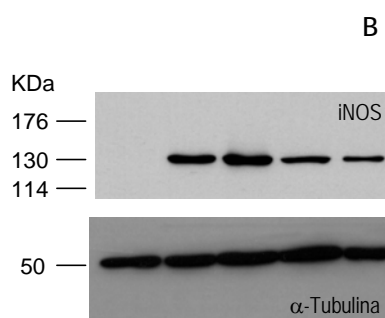


**Figura 21.** Efecto de la estimulación con LPS (50 µg/mL) y de la administración de UCM707 en células microgliales en cultivo sobre la producción de *A*, IL-1 $\beta$  y *B*, IL-6, \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente a la estimulación con LPS

La administración de UCM707 provocó una importante disminución en la producción de NO que ocurre en paralelo a una inhibición de la expresión de la iNOS, principal enzima implicada en la síntesis de NO (Figura 22).



| LPS | SR141716A | [UCM707] (µM) |
|-----|-----------|---------------|
| -   | -         | -             |
| +   | -         | -             |
| +   | +         | -             |
| +   | -         | 5             |
| +   | -         | 20            |

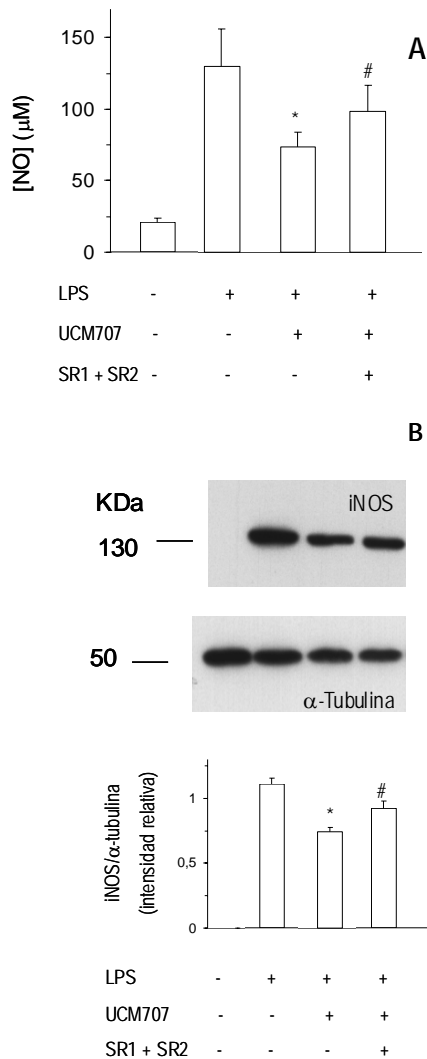


| LPS | SR141716A | [UCM707] (µM) |
|-----|-----------|---------------|
| -   | -         | -             |
| +   | -         | -             |
| +   | +         | -             |
| +   | -         | 5             |
| +   | -         | 20            |

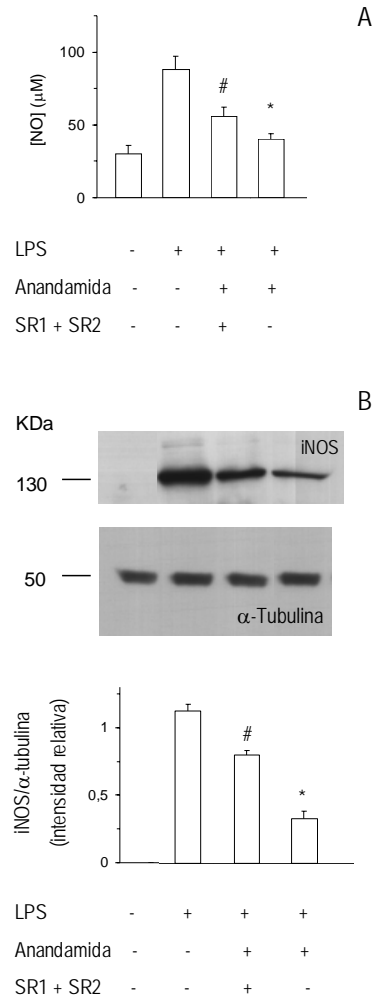
**Figura 22.** Efecto de la estimulación con LPS (50 µg/mL) y de la administración de SR141716A (1 mM) o UCM707 en células microgliales en cultivo sobre *A*, la producción de NO y *B*, la expresión de iNOS; \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente a la estimulación con LPS



Este efecto es parcialmente revertido en presencia de los dos antagonistas de los receptores de cannabinoides (1 mM) SR141716A y SR144528 (Figura 23) y mimetizado por la anandamida (Figura 24).



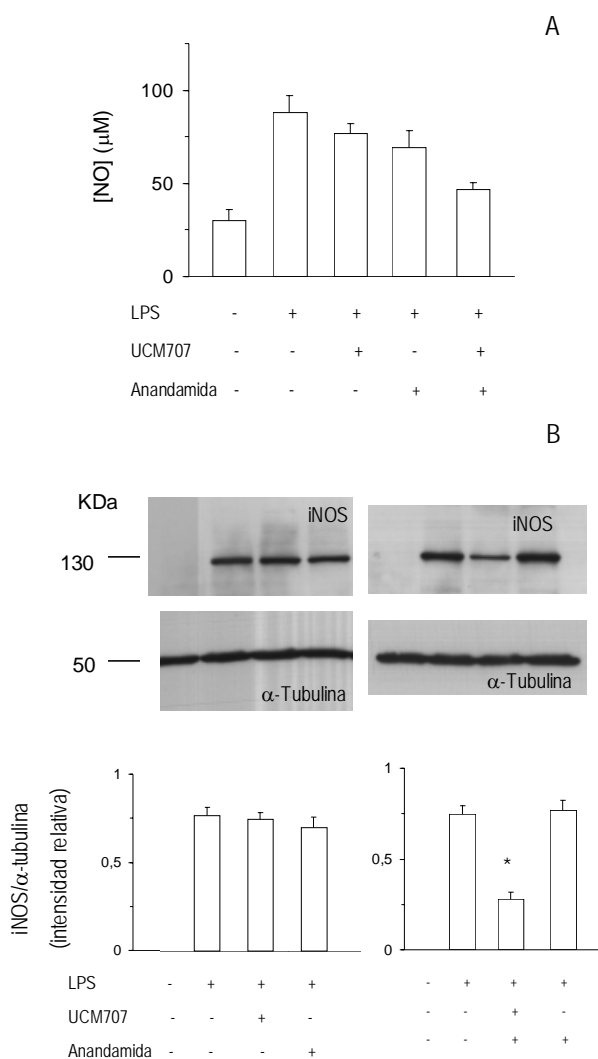
**Figura 23.** Bloqueo del efecto del UCM707 (5 µM) por administración conjunta de los antagonistas SR141716A (SR1; 1 mM) y SR144528 (SR2; 1 mM) en células microgliales estimuladas con LPS (50 µg/mL) sobre *A*, la producción de NO y *B*, la expresión de iNOS; Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente a la administración de LPS (\*) o de UCM707 (#)



**Figura 24.** Bloqueo del efecto de anandamida (10 µM) por administración conjunta de los antagonistas SR141716A (SR1; 1 mM) y SR144528 (SR2; 1 mM) en células microgliales en cultivo estimuladas con LPS (50 µg/mL) sobre *A*, la producción de NO y *B*, la expresión de iNOS; Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente a la estimulación con LPS (\*) o frente al tratamiento con anandamida (#)

Además, la administración de una dosis subefectiva de UCM707 (1 µM) es capaz de potenciar fuertemente la

acción de una dosis subefectiva de anandamida (1  $\mu$ M), confirmando la capacidad del UCM707 para potenciar los efectos de la anandamida (Figura 25).



**Figura 25.** Efecto de las dosis subefectivas de UCM707 (1  $\mu$ M) y anandamida (1  $\mu$ M) por separado y potenciación por el UCM707 (1  $\mu$ M) de una dosis subefectiva de anandamida (1  $\mu$ M) en células microgliales en cultivo estimuladas con LPS (50  $\mu$ g/mL) sobre *A*, la producción de NO y *B*, la expresión de iNOS; \*, Diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) frente a la estimulación con LPS

El hecho de que la administración simultánea de los dos antagonistas de los receptores de cannabinoides no consiga revertir completamente los efectos producidos tanto por el UCM707 (Figura 23) como por la anandamida (Figura 24) se relaciona posiblemente con la existencia de otros sitios de acción para la anandamida tales como otros receptores de cannabinoides aún no identificados, que podrían estar implicados en fenómenos de antiinflamación o vasodilatación y cuyos efectos no son bloqueados por el tratamiento con estos antagonistas.<sup>228</sup>

La acción antiinflamatoria del UCM707 parece ser específica de la vía de la iNOS ya que la administración de este compuesto no afecta de forma significativa a la expresión de la COX-2.

En conclusión, la administración de UCM707 en el modelo murino de esclerosis múltiple del virus de Theiler induce mejoras motoras muy significativas. A estos efectos beneficiosos contribuyen, al menos en gran parte, las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la activación del SCE, como indica la disminución de la reactividad microglial y de la expresión de antígenos MHC de clase II. Este perfil antiinflamatorio del UCM707 se ha confirmado *in vitro*, donde este compuesto muestra una elevada capacidad para disminuir la producción de diversos factores proinflamatorios tales como la expresión de iNOS o la síntesis de las interleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-6 o el NO.

Estos resultados confirman que la inhibición de la recaptación de anandamida puede constituir realmente una aproximación eficaz para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Estos datos revisten especial importancia considerando la acuciante necesidad de sustituir las terapias actuales, meramente paliativas y a todas luces insuficientes, con nuevos tratamientos que resulten verdaderamente eficaces a largo plazo y que produzcan mejoras funcionales. Así, en este contexto, el compuesto UCM707, con sus propiedades

<sup>228</sup> (a) Véase nota 18. (b) Véase nota 19. (c) Mo, F. M.; Offertaler, L.; Kunos, G. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *489*, 21.

inmunomoduladoras, antiinflamatorias y neuroprotectoras<sup>229</sup> mediadas por activación del SCE, podría representar un prometedor punto de partida para el desarrollo de una nueva generación de fármacos, que

mediante una potenciación fisiológica del SCE, sean capaces de frenar la progresión neurodegenerativa de la esclerosis múltiple, aliviar la sintomatología de la enfermedad e inducir mejoras funcionales.

---

<sup>229</sup> Marsicano, G.; Goodenough, S.; Monory, K.; Herman, H.; Eder, M.; Cannich, A.; Azad, S. C.; Cascio, M. G.; Ortega-Gutiérrez, S.; van der Stelt, M.; López-Rodríguez, M. L.; Casanova, E.; Schütz, G.; Ziegler-Schönberger, W.; Di Marzo, V.; Behl, C.; Lutz, B. *Science* **2003**, *302*, 84.



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. QUÍMICA

Los espectros de infrarrojo (IR) se han registrado en un espectrofotómetro "Perkin-Elmer 781" y "Shimadzu-8300"; las frecuencias se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono ( $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -RMN) se han registrado a temperatura ambiente, excepto que se indique otra cosa y han sido obtenidos en los espectrómetros "Varian VXR-300S", "Bruker Avance 300-AM" a 300 y 75 MHz, respectivamente, y "Bruker 200-AC" a 200 y 50 MHz respectivamente, del Centro de Asistencia a la Investigación de RMN de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna; las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en hertzios (Hz). En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (tripleto), q (cuadrupleto), qt (quintupleto), sx (sextupleto), m (multiplete) y a (ancho). La espectrometría de masas se llevó a cabo por inyección directa en un espectrómetro de cuadrupolo "HP5989A", usando la técnica de impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV o en un instrumento "Bruker LC-Esquire" (4000 v) con analizador de trampa de iones utilizando la técnica de ionización por *electrospray* (ESI) del Centro de Asistencia a la Investigación de espectrometría de masas de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCM. Los picos se expresan en  $m/z$ , y los picos molecular y base se indican como (M) y (100), respectivamente. Los resultados de microanálisis de los compuestos finales estaban comprendidos dentro del  $\pm 0,4\%$  del valor teórico. Para determinar la actividad óptica  $[\alpha]$  se ha utilizado un polarímetro "Perkin Elmer 781". Las reacciones de hidrogenación se han realizado en un hidrogenador "Parr". Los puntos de fusión se han medido en un bloque medidor de puntos de fusión ("Melting Point Apparatus

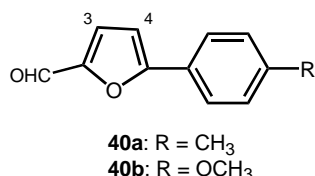
SMP3", Stuart Scientific, UK) y no se han corregido. Las adiciones controladas se han llevado a cabo utilizando una bomba de adición "Cole-Parker". La cromatografía analítica en capa fina (c.c.f.) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60F-254) y detección con luz UV, yodo, disolución etanólica al 5% de ninhidrina o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico (PMA). Para la cromatografía en columna se utilizó gel de sílice tipo 60 de Merck (tamaño de grano 230-400 ASTM). Todos los productos de partida y reactivos se han adquirido con alto grado de pureza en Acros, Aldrich, Fluka, Merck, Panreac o Sigma. Los disolventes con alto grado de pureza se adquirieron en SDS, Panreac o Merck. El resto de los disolventes se han secado y/o destilado antes de ser utilizados. La DMF y la piridina anhidras se obtuvieron por agitación sobre hidruro cálcico y destilación a vacío. El cloruro de metileno anhidro se utilizó recién destilado sobre hidruro cálcico. El THF anhidro se utilizó recién destilado bajo argón sobre sodio y benzofenona como indicador.

#### 5.1.1. Síntesis de alcoholes

5.1.1.1. 5-(*p*-Metilfenil)-2-furanocarbaldehído, 5-(*p*-metoxifenil)-2-furanocarbaldehído. Procedimiento general. **40a,b**

Una mezcla de 10,4 mmol de 2-furanocarbaldehído, 1,0 mmol de bromuro de tetrabutilamonio, 2,1 mmol de acetato potásico, 0,05 mmol de cloruro de paladio (II) y 0,1 mmol de triciclohexilfosfina en DMF (0,9 mL/mmol de 2-furanocarbaldehído), bajo atmósfera de argón, se calienta a 110 °C. A continuación se añade *p*-yodotolueno o *p*-yodoanisol (1,0 mmol) mediante adición controlada (0,35 mmol/h). Tras completarse esta adición, la mezcla de reacción se deja durante seis-ocho horas a 110 °C hasta que no se observa evolución (c.c.f.). Una vez enfriado a temperatura ambiente, el crudo se extrae con acetato de etilo y se lava con una disolución saturada de cloruro amónico. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión

reducida. Finalmente, el producto se purifica mediante destilación en un horno de bolas seguido de cromatografía en columna de gel de sílice utilizando el eluyente adecuado.



\* 5-(*p*-Metilfenil)-2-furanocarbaldehído **40a**

Rto. = 50%; R<sub>f</sub> = 0,5 (cloroformo).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,70 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz, H<sub>3</sub>), 7,16 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, AA'BB'), 7,22 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz, H<sub>4</sub>), 7,63 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, AA'BB'), 9,53 (s, 1H, CHO).

\* 5-(*p*-Metoxifenil)-2-furanocarbaldehído **40b**

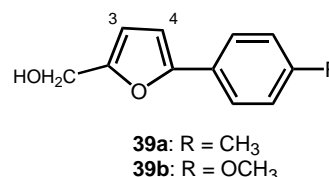
Rto. = 90%; R<sub>f</sub> = 0,7 (cloroformo).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 3,76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6,69 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz, H<sub>3</sub>), 6,97 (dd, 2H, *J* = 6,8, 2,2 Hz, AA'BB'), 7,23 (dd, 1H, *J* = 3,7, 0,7 Hz, H<sub>4</sub>), 7,77 (dd, 2H, *J* = 6,8, 2,2 Hz, AA'BB'), 9,60 (s, 1H, CHO).

5.1.1.2. 2-Hidroximetil-5-(*p*-metilfenil)furano, 2-hidroximetil-5-(*p*-metoxifenil)furano. Procedimiento general. **39a,b**

Una suspensión de 1,0 mmol del aldehído correspondiente (**40a,b**) en disolución acuosa de níquel-Raney (5%) se hidrogena a temperatura ambiente a 50 p.s.i. (libras/pulgadas<sup>2</sup>) durante ocho-diez horas hasta desaparición del producto de partida (c.c.f.). A continuación se elimina el catalizador por filtración sobre celita y la fase acuosa se extrae con cloruro de metileno (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. Los alcoholes obtenidos se purificaron mediante

cromatografía en columna de gel de sílice utilizando el eluyente adecuado.



\* 2-Hidroximetil-5-(*p*-metilfenil)furano **39a**

Rto. = 70%; R<sub>f</sub> = 0,4 (cloroformo:metanol, 9:1).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3416, 3053, 1499, 1018, 822, 791.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2,37 (s, 1H, OH), 2,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6,36 (d, 1H, *J* = 2,2 Hz, H<sub>3</sub>), 6,56 (d, 1H, *J* = 2,4 Hz, H<sub>4</sub>), 7,23 (d, 2H, *J* = 7,9 Hz, AA'BB'), 7,57 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz, AA'BB').

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 21,2, 53,5, 105,0, 109,8, 123,7 (2C), 127,8, 129,5 (2C), 137,3, 141,7, 153,5.

\* 2-Hidroximetil-5-(*p*-metoxifenil)furano **39b**

Rto. = 20%; R<sub>f</sub> = 0,3 (éter etílico:cloroformo, 2:8).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3414, 3055, 1499, 1421, 1176, 1022.

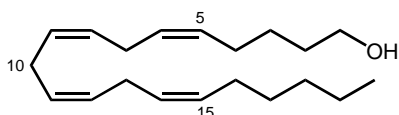
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,60 (s, 1H, OH), 3,84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,66 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6,35 (d, 1H, *J* = 3,2 Hz, H<sub>3</sub>), 6,46 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz, H<sub>4</sub>), 6,92 (dd, 2H, *J* = 6,8, 2,2 Hz, AA'BB'), 7,61 (dd, 2H, *J* = 6,8, 2,2 Hz, AA'BB').

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 53,5, 55,5, 104,4, 114,3, 122,5 (2C), 127,3, 130,6 (2C), 148,5, 153,4, 159,2.

5.1.1.3. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-icosa-5,8,11,14-tetraenol (alcohol araquidílico) **41**

A una disolución de 100 mg (0,29 mmol) de ácido araquidónico en 0,3 mL de THF, refrigerada en un baño de hielo/sal se le añade, cuidadosamente y bajo atmósfera de argón, 8,5 mg (0,22 mmol) de hidruro de litio y aluminio. Cuando se deja de observar la aparición de espuma, la reacción se refluxa a 65 °C durante dos horas

y a continuación se agita a temperatura ambiente durante doce horas más, siempre en atmósfera inerte. Por último se añaden gota a gota y en frío (en baño de hielo) 0,2 mL de agua, 0,05 mL de una disolución de hidróxido sódico al 15% y otros 0,5 mL más de agua y se agita durante cuarenta y cinco minutos. Las sales se filtran sobre celita y se lavan con éter etílico. Los extractos etéreos se lavan con una mezcla (1:1, v/v) de hidróxido sódico al 15% y cloruro sódico saturada, mientras que la fase acuosa inicial se extrae con cloruro de metileno (2 x 5 mL). Todas las fases orgánicas se juntan y se secan sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose 65 mg (Rto. = 77%) del correspondiente alcohol puro como un aceite.



$R_f = 0,26$  (cloroformo).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3404, 3018, 2930, 2860, 1718, 1458, 1420, 1379, 1047.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,89 (t, 3H,  $J = 6,8$  Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,25-1,74 (m, 11H, 2H<sub>2</sub>, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>, OH), 2,01-2,14 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,79-2,87 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 3,64 (td, 2H,  $J = 6,4, 2,4$  Hz, 2H<sub>1</sub>), 5,26-5,47 (m, 8H, H vinílicos).

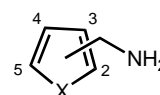
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,1, 22,6, 25,6 (3C), 25,8, 26,9, 27,2, 29,3, 31,5, 32,4, 62,9, 127,5, 127,9, 128,1 (2C), 128,3, 128,5, 129,9, 130,5.

### 5.1.2. Síntesis de aminas

5.1.2.1. (Fur-3-ilmetil)amina, (1-metilpirrol-2-ilmetil)amina.  
Procedimiento general. **42a,b**

A una suspensión de 7,0 mmol de 3-furanocarbaldehído o 2-(1-metilpirrol)carbaldehído en 30 mL de hidróxido amónico acuoso al 28% se le añade un 5% de níquel-Raney. La mezcla de reacción se hidrogena a temperatura ambiente durante ocho-diez horas a 50

p.s.i. hasta completa desaparición del producto de partida (c.c.f.). A continuación se filtra el catalizador sobre celita y la fase acuosa se extrae con cloruro de metileno (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose la correspondiente amina pura como un aceite.



**42a:** X = O

**42b:** X = NMe

\* (Fur-3-ilmetil)amina **42a**

Rto. = 80%;  $R_f = 0,35$  (éter etílico:metanol:amoníaco, 1:1:0,02).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3377, 3134, 3113, 2866, 1500, 1387, 1161, 1020, 874.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,72 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 3,68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,34 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7,28-7,30 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 36,8, 109,6, 126,8, 138,7, 143,0.

\* (1-Metil-1H-pirrol-2-ilmetil)amina **42b**

Rto. = 70%;  $R_f = 0,18$  (cloroformo:metanol, 9,5:0,5).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3018, 2854, 1159, 930.

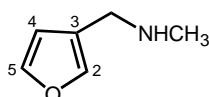
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,66 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 3,63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,01-6,10 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>), 6,59-6,64 (m, 1H, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 35,1, 36,9, 106,3, 112,8, 126,7, 128,2.

5.1.2.2. *N*-Metil(fur-3-ilmetil)amina **42c**

A una suspensión de 150 mg (1,6 mmol) de 3-furanocarbaldehído en 6,0 mL de una disolución acuosa de metilamina al 28% se le añade un 5% de níquel-Raney. La mezcla de reacción se hidrogena a temperatura ambiente durante ocho-diez horas a 50 p.s.i. hasta completa desaparición del producto de partida

(c.c.f.). A continuación se filtra el catalizador sobre celita y la fase acuosa se extrae con cloruro de metileno (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose 117 mg (67%) de **42c** como un aceite que se utiliza sin posterior purificación.



$R_f = 0,13$  (cloroformo:metanol, 8:2).

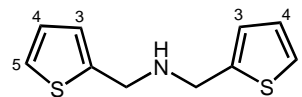
IR (CDCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3325, 3132, 2941, 1638, 1500, 1377, 1163, 874.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,98 (sa, 1H, NH), 2,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,52 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,28-6,31 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7,28-7,31 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 36,7, 46,3, 110,5, 123,8, 140,6, 143,1.

### 5.1.2.3. Bis(tien-2-ilmetil)amina **43**

A una disolución de 1,7 g de acetato amónico (22,3 mmol) en 11,2 mL de THF, bajo argón, se le añaden 250 mg (2,2 mmol) de 2-tiofenocarbaldehído. A continuación se adicionan 710 mg (3,4 mmol) de triacetoxiborohidruro sódico y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante veinticuatro horas hasta que no se observa evolución (c.c.f.). El crudo se extrae con una disolución de hidróxido sódico 3 M (2 x 7 mL) y la fase acuosa se extrae repetidamente con eter etílico (5 x 10 mL). Las fases orgánicas se juntan y se secan sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y la amina se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice obteniéndose 100 mg (Rto. = 43%) de la amina **43**.



$R_f = 0,22$  (cloroformo:metanol, 9,5:0,5).

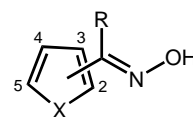
IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3360, 3296, 3043, 2851, 1663, 1551, 1453, 1372, 1241.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 4,01 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 4,44 (sa, 1H, NH), 6,90-7,01 (m, 4H, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>4</sub>), 7,20-7,22 (m, 2H, 2H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 46,0 (2C), 125,5 (2C), 126,2 (2C), 126,7 (2C), 127,1 (2C).

### 5.1.2.4. Oximas de la 2-furilmetilcetona y del 3-tiofenocarbaldehído. Procedimiento general. **45a,b**

A una disolución de 1,0 mmol del compuesto carbonílico correspondiente en 2,0 mL de etanol y 2,0 mL de agua destilada se le añade 185 mg (2,7 mmol) de hidrocloreto de hidroxilamina y 220 mg (2,7 mmol) de acetato sódico. La mezcla de reacción se refluxe hasta desaparición del producto de partida, dejándose enfriar a continuación hasta temperatura ambiente. El etanol se elimina a presión reducida y la disolución acuosa resultante se extrae con acetato de etilo (3 x 2 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre sulfato magnésico, el disolvente se elimina a presión reducida y sobre el residuo resultante se añaden, gota a gota, 4 mL de agua helada, obteniéndose así las oximas correspondientes.



**45a:** X = O, R = CH<sub>3</sub>  
**45b:** X = S, R = H

\* (*E*)-Oxima de la 2-furilmetilcetona **45a**

Rto. = 88%;  $R_f = 0,30$  (cloroformo:acetato de etilo, 9:1).

p.f.: 89-91 °C.



IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296, 3140, 1638, 1493, 1373, 1304, 1290, 1230, 1165, 1009, 901, 756.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 2,23 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,44 (dd, 1H,  $J = 3,4, 1,7$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 6,64 (dd, 1H,  $J = 3,4, 0,5$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 7,46-7,49 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ), 9,07 (sa, 1H, OH).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 10,9, 109,9, 111,0, 143,4, 147,4, 150,0.

\* (*E*)-Oxima del 3-tiofenocarbaldehído **45b**

Rto. = 88%;  $R_f = 0,27$  (cloroformo).

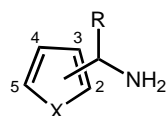
IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3271, 2922, 1636, 1518, 1456, 1416, 1362, 1296, 1242, 1159, 1086, 968.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,26-7,42 (m, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_5$ ), 7,48-7,52 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 8,20 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 8,54 (sa, 1H, OH).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 125,2, 126,8, 129,4, 134,2, 145,6.

5.1.2.5. ( $\pm$ )-1-(Fur-2-il)etilamina, (tien-3-ilmetil)amina.  
Procedimiento general. **44a,b**

Sobre 3,0 mL de hidróxido amónico acuoso al 28% se añade una disolución de 0,75 mmol de la oxima correspondiente **45a,b** en 8 mL de metanol y un 5% de níquel-Raney. La mezcla de reacción se hidrogena a temperatura ambiente a 45 p.s.i. durante cinco horas hasta desaparición del producto de partida (c.c.f.). A continuación se filtra el catalizador sobre celita y la fase acuosa se extrae repetidas veces con cloruro de metileno (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose las aminas correspondientes como un aceite.



**44a**: X = O, R =  $\text{CH}_3$

**44b**: X = S, R = H

\* ( $\pm$ )-1-(Fur-2-il)etilamina **44a**

Rto. = 60%;  $R_f = 0,17$  (cloroformo:metanol, 9:1).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 3298, 3051, 2972, 2930, 2874, 1678, 1601, 1572, 1470, 1150, 1009, 806, 702.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1,21 (d, 3H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,59 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,86 (q, 1H,  $J = 6,6$  Hz, CH), 5,90 (dt, 1H,  $J = 3,2, 0,7$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 6,09 (dd, 1H,  $J = 3,2, 2,0$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,13 (dd, 1H,  $J = 1,9, 0,7$  Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 21,9, 45,0, 103,1, 109,9, 141,0, 160,2.

\* (Tien-3-ilmetil)amina **44b**

Rto. = 69%;  $R_f = 0,11$  (cloroformo).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3366, 3296, 3049, 2924, 2854, 1638, 1558, 1456, 1244, 779.

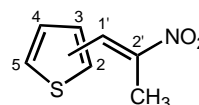
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1,70 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,88 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,03 (dd, 1H,  $J = 4,9, 1,0$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,09-7,11 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7,28 (dd, 1H,  $J = 4,9, 2,9$  Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 41,7, 120,3, 126,0, 126,9, 144,6.

5.1.2.6.  $\beta$ -Nitrovinil derivados **47a-c**

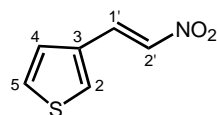
5.1.2.6.1. (*E*)-1-(Tien-2-il)-2-nitropropeno, (*E*)-1-(tien-3-il)-2-nitropropeno. Procedimiento general. **47a,c**

A una disolución de 206 mg (2,7 mmol) de acetato amónico en 2 mL de ácido acético glacial, se le añaden 4,5 mmol del 2- o 3-tiofenocarbaldehído y 0,48 mL (6,7 mmol) de nitroetano. La mezcla de reacción se refluxe durante doce horas hasta que no se observa evolución (c.c.f.). A continuación, el crudo se vierte lentamente sobre 2 mL de una mezcla de agua y hielo. El precipitado así obtenido se aísla por filtración, obteniéndose los  $\beta$ -nitrovinil derivados de interés.



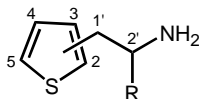
**\*(E)-1-(Tien-2-il)-2-nitropropeno 47a**Rto. = 56%; R<sub>f</sub> = 0,74 (cloroformo).IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3024, 1638, 1541, 1512, 1491, 1389, 1331, 1298, 1242, 1223, 714.<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2,56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,19 (dd, 1H, *J* = 5,1, 3,7 Hz, H<sub>4</sub>), 7,44 (d, 1H, *J* = 3,4 Hz, H<sub>3</sub>), 7,65 (d, 1H, *J* = 5,1 Hz, H<sub>5</sub>), 8,31 (s, 1H, H<sub>1</sub>).<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 14,0, 127,0, 128,0, 131,5, 134,5, 135,0, 144,2.**\*(E)-1-(Tien-3-il)-2-nitropropeno 47c**Rto. = 62%; R<sub>f</sub> = 0,71 (cloroformo).IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3020, 1653, 1512, 1317, 995, 933, 883.<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2,50 (d, 3H, *J* = 0,7 Hz, CH<sub>3</sub>), 7,28 (dd, 1H, *J* = 5,1, 1,2 Hz, H<sub>4</sub>), 7,44 (ddd, 1H, *J* = 5,1, 2,9, 0,5 Hz, H<sub>5</sub>), 7,59-7,61 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 8,09 (s, 1H, H<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 14,0, 126,8, 127,4, 128,0, 129,7, 133,5, 147,5.**5.1.2.6.2. (E)-2-(Tien-3-il)nitroetileno 47b**

A una mezcla de 0,24 mL (4,5 mmol) de nitrometano y 0,39 mL (4,5 mmol) de 3-tiofenocarbaldehído en 0,9 mL de tolueno seco a 0 °C se le añade, gota a gota, 0,45 mL (4,5 mmol) de una disolución de hidróxido sódico 10 M, manteniendo la temperatura de reacción siempre por debajo de 10 °C. La mezcla de reacción se agita durante 90 minutos (c.c.f.). A continuación se adicionan 3,5 mL de agua helada y la mezcla se vierte cuidadosamente sobre 2,2 mL de una disolución de ácido clorhídrico al 15%. El precipitado de color amarillo así obtenido se aísla por filtración, obteniéndose 170 mg (Rto. = 40%) de **47b**.

R<sub>f</sub> = 0,30 (cloroformo:metanol, 9,5:0,5).IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3111, 3020, 2399, 1632, 1526, 1342, 1319, 964.<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 7,28 (ddd, 1H, *J* = 5,4, 1,0, 0,5 Hz, H<sub>4</sub>), 7,44 (ddd, 1H, *J* = 5,1, 2,9, 0,5 Hz, H<sub>5</sub>), 7,49 (d, 1H, *J* = 13,7 Hz, H<sub>2</sub>), 7,74 (dd, 1H, *J* = 2,9, 1,2 Hz, H<sub>2</sub>), 8,02 (d, 1H, *J* = 13,4 Hz, H<sub>1</sub>).<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 125,1, 128,2, 132,2, 132,5, 132,6, 136,8.

5.1.2.7. (±)-1-Metil-2-(tien-2-il)etilamina, 2-(tien-3-il)etilamina, (±)-1-metil-2-(tien-3-il)etilamina. Procedimiento general. **46a-c**

En un matraz de dos bocas en baño de hielo/sal y bajo atmósfera de argón, a 7,5 equivalentes de una disolución 1,0 M de BH<sub>3</sub> en THF se le añade 1 equivalente del β-nitrovinil derivado correspondiente **47a-c** previamente disuelto en THF (1,5 mL/mmol), manteniendo la temperatura por debajo de -10 °C. Terminada la adición, se deja que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente, se añaden 0,16 equivalentes de borohidruro sódico y se calienta a reflujo durante 36 horas (c.c.f.). A continuación, el crudo así obtenido se vierte sobre agua a 0 °C (15 mL/mmol β-nitrovinil derivado), se acidifica hasta pH = 2 con una disolución de ácido clorhídrico al 10% y se agita a 65-70 °C durante dos horas. Finalmente, y tras dejar enfriar a temperatura ambiente, el crudo se lava con éter etílico (2 x 30 mL/mmol β-nitrovinil derivado). La fase acuosa se basifica con lentejas de hidróxido sódico hasta pH = 7-8 y se extrae con éter etílico (3 x 30 mL/mmol β-nitrovinil derivado). A continuación la fase acuosa se basifica de la misma manera hasta pH = 10 y se extrae nuevamente con éter etílico (3 x 30 mL/mmol β-nitrovinil derivado). Los extractos etéreos se secan por separado sobre sulfato sódico anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose la correspondiente amina pura como un aceite.



**46a,c:** R = CH<sub>3</sub>

**46b:** R = H

**\* (±)-1-Metil-2-(tien-2-il)etilamina 46a**

Rto. = 48%; R<sub>f</sub> = 0,11 (cloroformo).

IR (CDCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3368, 2962, 2928, 1583, 1456, 1437, 1381, 1148, 1059.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,12 (d, 3H, *J* = 6,1 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,91 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,70 (ddd, 1H, *J* = 14,3, 8,1, 0,5 Hz, H<sub>1a</sub>), 2,89 (ddd, 1H, *J* = 14,4, 4,9, 0,7 Hz, H<sub>1b</sub>), 3,06-3,22 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6,79-6,82 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6,92 (dd, 1H, *J* = 5,1, 3,4 Hz, H<sub>4</sub>), 7,13 (dd, 1H, *J* = 5,1, 1,2 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 23,1, 40,4, 48,6, 123,7, 125,6, 126,8, 141,8.

**\*2-(Tien-3-il)etilamina 46b**

Rto. = 60%; R<sub>f</sub> = 0,15 (cloroformo:metanol, 9:1).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3360, 3277, 3099, 2961, 2855, 1458, 1080, 704.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2,06 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 2,79 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz, 2H<sub>1</sub>), 2,96 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, 2H<sub>2</sub>), 6,96 (dd, 1H, *J* = 4,9, 1,5 Hz, H<sub>4</sub>), 7,00 (dd, 1H, *J* = 2,9, 1,2 Hz, H<sub>2</sub>), 7,28 (dd, 1H, *J* = 4,9, 3,2 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 34,1, 42,6, 121,0, 125,6, 128,1, 139,9.

**\* (±)-1-Metil-2-(tien-3-il)etilamina 46c**

Rto. = 51%; R<sub>f</sub> = 0,10 (cloroformo).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3360, 3286, 3182, 3099, 3047, 2960, 2926, 1583, 1454, 1379, 1344, 1080, 833, 773.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1,04 (d, 3H, *J* = 6,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,53 (dd, 1H, *J* = 13,7, 8,0 Hz, H<sub>1a</sub>), 2,70 (ddd, 1H, *J* = 13,7, 5,1, 0,5 Hz, H<sub>1b</sub>), 3,14 (sx, 1H, *J* = 6,3 Hz, H<sub>2</sub>), 4,72 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,92 (dd, 1H, *J* = 4,9, 1,2 Hz, H<sub>4</sub>), 6,96 (ddd,

1H, *J* = 2,9, 1,0, 0,5 Hz, H<sub>2</sub>), 7,24 (dd, 1H, *J* = 4,9, 2,9 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, δ): 23,8, 40,6, 47,6, 121,4, 125,3, 128,4, 139,8.

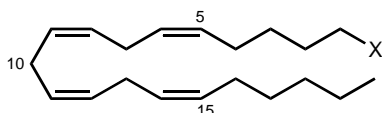
**5.1.2.8. (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenilamina (araquidilamina) 48**

A una disolución de 279 mg (0,93 mmol) del alcohol araquidílico **41** en 5,4 mL de piridina anhidra, se le añade, bajo atmósfera de argón y a 0°C, 160 mg (1,4 mmol) de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla de reacción se agita durante seis horas a temperatura ambiente tras las cuales se vierte sobre 11 mL de agua fría y se extrae con éter etílico (4 x 15 mL). Los extractos etéreos se lavan con ácido sulfúrico 0,5 M y a continuación con una disolución saturada de bicarbonato sódico. Por último, los extractos etéreos se secan sobre sulfato sódico anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. Así se obtienen 230 mg (Rto. = 67%) del mesilato **49** como un aceite que se utiliza directamente sin posteriores purificaciones.

A continuación, 230 mg (0,62 mmol) del mesilato **49** se disuelven en 5 mL de DMF anhidra y sobre ellos, utilizando una máscara y mampara de seguridad, se añade una disolución de 195 mg (3 mmol) de azida sódica disuelta en 10 mL de DMF. La reacción se calienta a 90 °C durante veinticuatro horas. Después, el crudo de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente, se filtra sobre un algodón y se vierte sobre 3,6 mL de agua a 0 °C. Tras extraer repetidamente con éter etílico (4 x 15 mL), las fases etéreas se lavan con cloruro amónico saturado (3 x 20 mL), se secan sobre sulfato sódico y se elimina el disolvente a presión reducida. La azida se purifica mediante una cromatografía en columna de gel de sílice en éter de petróleo, obteniéndose 40 mg (Rto. = 20%) de la azida de interés **50** como un aceite incoloro.

Finalmente, a una disolución de 40 mg (0,13 mmol) de la azida **50** en 1 mL de THF, se le añade 16 mg (0,4 mmol) de hidruro de litio y aluminio disueltos en 0,4 mL de

THF y la mezcla de reacción se refluye (80 °C) durante diez horas. A continuación se agita a temperatura ambiente durante dos horas más, siempre en atmósfera inerte, y se añaden gota a gota y en frío (en baño de hielo) 0,05 mL de agua, 0,03 mL de una disolución de hidróxido sódico al 15% y otros 0,25 mL más de agua y se agita durante cuarenta y cinco minutos. Las sales se filtran sobre celita y se lavan con éter etílico. Los extractos etéreos se lavan con una mezcla (1:1, v/v) de hidróxido sódico al 15% y cloruro sódico saturada mientras que la fase acuosa inicial se extrae con cloruro de metileno. Todas las fases orgánicas se juntan y se secan sobre sulfato sódico anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose 25 mg (Rto. = 66%) de la araquidilamina **48** como un aceite incoloro.



**49:** X = O-SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>  
**50:** X = N<sub>3</sub>  
**48:** X = NH<sub>2</sub>

\* Metanosulfonato de (5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-icosatetraenilo **49**

R<sub>f</sub> = 0,31 (cloroformo).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,82 (t, 3H, J = 6,7 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,14-1,23 (m, 8H, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,66-1,78 (m, 2H, 2H<sub>2</sub>), 1,97-2,02 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,72-2,81 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 2,94 (s, 3H, OSO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,16 (t, 2H, J = 6,4 Hz, 2H<sub>1</sub>), 5,23-5,33 (m, 8H, H vinílicos).

\* (5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-icosatetraenilazida **50**

R<sub>f</sub> = 0,18 (éter de petróleo).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,82 (t, 3H, J = 7,0 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,15-1,26 (m, 8H, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,50-1,65 (m, 2H, 2H<sub>2</sub>), 1,92-2,05 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,74-2,82 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>,

2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 3,20 (t, 2H, J = 6,9 Hz, 2H<sub>1</sub>), 5,29-5,32 (m, 8H, H vinílicos).

\* (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenilamina (araquidilamina) **48**

R<sub>f</sub> = 0,15 (cloroformo:metanol, 8:2).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,76-0,82 (m, 3H, 3H<sub>20</sub>), 1,15-1,26 (m, 8H, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,52-1,63 (m, 2H, 2H<sub>2</sub>), 1,97-2,03 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,63 (t, 2H, J = 6,7 Hz, 2H<sub>1</sub>), 2,72-2,77 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 5,23-5,32 (m, 8H, H vinílicos).

### 5.1.3. Síntesis de ésteres, tioésteres y amidas I. Procedimiento general (1-8, 10-38)

#### Método A

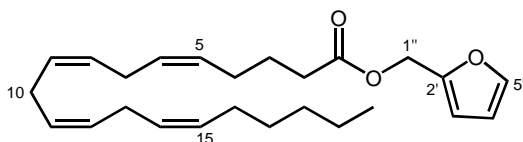
En un matraz de dos bocas, bajo atmósfera de argón, a 1 equivalente de ácido araquidónico (100 mg, 0,29 mmol) en cloruro de metileno anhidro (1 mL/mmol) se le adiciona DMF anhidro (1 equivalente), cloruro de metileno anhidro (15 mL/mmol de ácido araquidónico) y cloruro de oxalilo (2 equivalentes) previamente disuelto en cloruro de metileno anhidro (0,5 mL/mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se elimina el disolvente utilizando una bomba de vacío. Así se obtiene un residuo sólido que se redissuelve en cloruro de metileno anhidro (15 mL/mmol de ácido araquidónico), siempre bajo atmósfera de argón, sobre el que se añade el alcohol o amina correspondiente (1,5 equivalentes) disuelto en cloruro de metileno anhidro (1 mL/mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente hasta que no se observa evolución (c.c.f.) en la desaparición de los productos de partida (tres-seis horas) hidrolizándose a continuación con agua destilada (15 mL/mmol de ácido araquidónico). El crudo de reacción se extrae con cloroformo (3 x 10 mL/mmol de ácido araquidónico) y se lava con una disolución saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico o magnésico anhidro, eliminando después el disolvente a presión reducida. Finalmente, el producto se

purifica por una o dos cromatografías consecutivas en columna de gel de sílice utilizando el/los eluyente(s) adecuado(s).

### Método B

En un matraz de dos bocas, bajo atmósfera de argón y en baño de hielo/sal, a 1 equivalente de ácido araquidónico (100 mg, 0,29 mmol) disuelto en cloruro de metileno anhidro (1,5 mL/mmol) y a 1,5 equivalentes del alcohol o amina correspondientes disueltos en cloruro de metileno anhidro (1 mL/mmol) se le añade gota a gota una mezcla de 1 equivalente (68 mg, 0,29 mmol) de DCC y 0,068 equivalentes (2,7 mg, 0,022 mmol) de DMAP en cloruro de metileno anhidro (3 mL/mmol DCC). La mezcla de reacción se agita a esta temperatura durante cinco minutos y después a temperatura ambiente, siempre bajo atmósfera de argón, hasta que no se observa evolución (c.c.f.) en la desaparición de los productos de partida (cuatro-seis horas). A continuación se filtra la dicitclohexilurea formada y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo así obtenido se redissuelve en cloruro de metileno (20 mL/mmol de ácido araquidónico) lavándose consecutivamente con una disolución de ácido clorhídrico 0,5 M y con disolución saturada de cloruro sódico. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico o magnésico anhidros y el disolvente se elimina a presión reducida. Finalmente, el producto se purifica por una o dos cromatografías consecutivas en columna de gel de sílice utilizando el/los eluyente(s) adecuado(s).

#### 5.1.3.1. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de (fur-2-il)metilo 1



### Método A.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo (30:1) y hexano:cloruro de metileno (2:1).

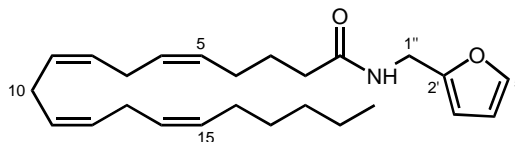
Rto. = 57%;  $R_f$  = 0,18 (hexano:cloruro de metileno, 2:1).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3013, 2957, 2928, 2856, 1736, 1456, 1377, 1229, 1153, 910, 734.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,78 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,15-1,36 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,60 (qt, 2H,  $J$  = 7,5 Hz, 2H<sub>3</sub>), 1,93-2,08 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,28 (t, 2H,  $J$  = 7,4 Hz, 2H<sub>2</sub>), 2,68-2,79 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 4,99 (s, 2H, 2H<sub>1''</sub>), 5,30-5,40 (m, 8H, H vinílicos), 6,35 (dd, 1H,  $J$  = 3,2, 1,8 Hz, H<sub>4</sub>), 6,39 (d, 1H,  $J$  = 3,1 Hz, H<sub>3</sub>), 7,41 (dd, 1H,  $J$  = 1,8, 0,8 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,1, 22,4, 24,6, 25,6 (3C), 26,6, 27,4, 29,5, 31,5, 33,6, 58,0, 110,7 (2C), 127,5, 127,9, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 128,9, 130,5, 143,2, 149,8, 173,3.

#### 5.1.3.2. (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(Fur-2-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida 2



### Método A.

Cromatografía: cloroformo:metanol (100:5→1:1) y cloroformo:acetato de etilo (100:3).

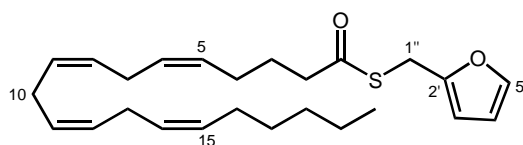
Rto. = 57%;  $R_f$  = 0,80 (cloroformo:metanol, 9,5:0,5).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3450, 2927, 1676, 1512, 1425, 1149, 1014, 927.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,87 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,24-1,28 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,75 (qt, 2H,  $J$  = 7,1 Hz, 2H<sub>3</sub>), 1,97-2,22 (m, 6H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>, 2H<sub>2</sub>), 2,78-2,83 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 4,41 (d, 2H,  $J$  = 5,4 Hz, 2H<sub>1''</sub>), 5,35-5,38 (m, 8H, H vinílicos), 5,83 (sa, 1H, NH), 6,20 (d, 1H,  $J$  = 7,4 Hz, H<sub>3</sub>) 6,29-6,31 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7,32-7,34 (m, 1H, H<sub>5</sub>).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}\delta$ ): 14,0, 22,5, 25,3, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 35,9, 36,4, 107,4, 110,4, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 129,1, 130,5, 142,1, 151,4, 172,5.

5.1.3.3. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tiotetraenoato de S-(fur-2-il)metilo 3



Método B.

Cromatografía: hexano:éter etílico (150:1).

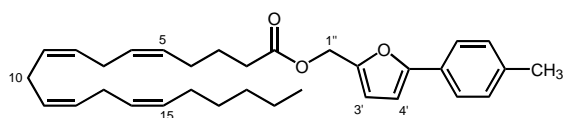
Rto. = 59%;  $R_f$  = 0,17 (hexano:éter etílico, 100:1).

$\text{IR}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3013, 2957, 2928, 2856, 1693, 1502, 1456, 1248, 1151, 1072, 1011, 910.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}\delta$ ): 0,89 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,25-1,40 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,75 (qt, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,01-2,16 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,58 (t, 2H,  $J$  = 7,8 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,76-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 4,15 (s, 2H,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,27-5,47 (m, 8H, H vinílicos), 6,21 (dq, 1H,  $J$  = 3,2, 0,7 Hz,  $\text{H}_4$ ), 6,28 (dd, 1H,  $J$  = 3,2, 1,7 Hz,  $\text{H}_3$ ), 7,32 (dd, 1H,  $J$  = 1,7, 0,7 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}\delta$ ): 13,9, 22,6, 25,3, 25,6 (4C), 26,3, 27,2, 29,3, 31,5, 43,7, 107,7, 110,4, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,5, 128,6, 129,1, 130,5, 142,0, 150,4, 197,9.

5.1.3.4. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de [5-(*p*-tolil)fur-2-il]metilo 4



Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (9,5:0,5) y hexano:éter etílico (100:1).

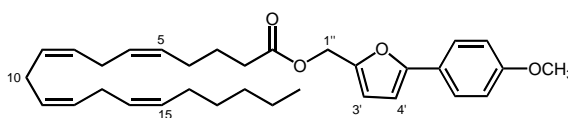
Rto. = 35%;  $R_f$  = 0,30 hexano:cloroformo (9,5:0,5).

$\text{IR}$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3013, 2926, 2856, 1736, 1497, 1454, 1024, 820, 789.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}\delta$ ): 0,81 (t, 3H,  $J$  = 6,7 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,14-1,35 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,57-1,72 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 1,93-2,09 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,29 (s, 3H, Ar- $\text{CH}_3$ ), 2,30 (t, 2H,  $J$  = 10,3 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,68-2,88 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 5,03 (s, 2H,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,19-5,39 (m, 8H, H vinílicos), 6,39 (d, 1H,  $J$  = 3,3 Hz,  $\text{H}_3$ ), 6,47 (d, 1H,  $J$  = 3,3 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,09-7,21 (m, 2H, AA'BB'), 7,38-7,59 (m, 2H, AA'BB').

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}\delta$ ): 13,9, 21,0, 21,2, 22,5, 24,6, 25,5 (2C), 26,4, 27,1, 29,2, 31,4, 33,5, 58,0, 105,0, 111,5, 123,8, 125,6, 127,4 (2C), 127,7, 127,8, 128,1, 128,5, 128,8, 129,2, 129,4 (2C), 130,4, 137,4, 148,6, 154,7, 173,1.

5.1.3.5. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de [5-(*p*-metoxifenil)fur-2-il]metilo 5



Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (9:1) y hexano:éter etílico (9:1).

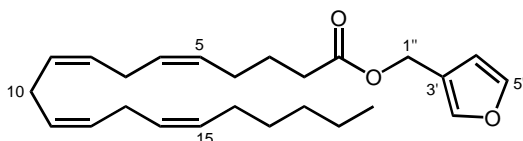
Rto. = 30%;  $R_f$  = 0,30 (hexano:éter etílico, 1:1).

$\text{IR}$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3013, 2955, 2928, 2854, 1736, 1499, 1175, 1146, 1032, 833.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3\text{-}\delta$ ): 0,89 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,41 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,74 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,02-2,16 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,37 (t, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,78-2,85 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,85 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 5,11 (s, 2H,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,28-5,35 (m, 8H, H vinílicos), 6,47 (dd, 2H,  $J$  = 6,3, 3,3 Hz,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ), 6,90-6,95 (m, 2H, AA'BB'), 7,59-7,64 (m, 2H, AA'BB').

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,2, 22,7, 24,9, 25,8 (3C), 26,7, 27,4, 29,5, 31,7, 33,7, 55,5, 58,3, 104,4, 112,8, 114,3 (2C), 123,8, 125,6, 127,1, 127,7, 128,0, 128,3 (3C), 128,7, 129,0, 130,6, 148,5, 154,8, 159,4, 173,4.

5.1.3.6. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de (fur-3-il)metilo **6**



Método A.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo (30:1) y hexano:cloruro de metileno (5:1).

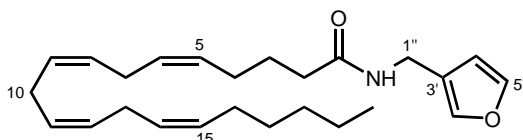
Rto. = 55%;  $R_f$  = 0,15 (hexano:cloruro de metileno, 2:1).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3013, 2957, 2928, 2856, 1734, 1458, 1379, 1217, 1151, 1024, 874.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,37 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,70 (qt, 2H,  $J$  = 7,5 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,01-2,13 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,32 (t, 2H,  $J$  = 7,5 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,80 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 4,97 (s, 2H,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,28-5,41 (m, 8H, H vinílicos), 6,41 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,38 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ) 7,45-7,46 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,5, 24,7, 25,6 (2C), 25,7, 26,5, 27,2, 29,3, 31,5, 33,6, 57,5, 110,5, 120,5, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,9, 129,0, 130,5, 141,5, 143,4, 173,4.

5.1.3.7. (5Z,8Z,11Z,14Z)-*N*-(Fur-3-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida **7**



Método A y método B.

Cromatografía: cloroformo:acetato de etilo (9,5:0,5) y hexano:acetato de etilo (2:1).

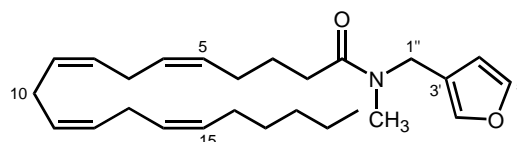
Rto. = 45% (método A) y 65% (método B);  $R_f$  = 0,43 (hexano:acetato de etilo, 1:1).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 3018, 2930, 2856, 1709, 1655, 1522, 1458, 1420, 1022.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,0 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,35 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,73 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,23 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,76-2,85 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 4,28 (d, 2H,  $J$  = 5,6 Hz,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,32-5,47 (m, 8H, H vinílicos), 5,58 (sa, 1H, NH), 6,35-6,36 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ) 7,37-7,38 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,5, 25,4, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 34,4, 36,0, 110,3, 122,0, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 129,0, 130,5, 140,1, 143,5, 172,6.

5.1.3.8. (5Z,8Z,11Z,14Z)-*N*-(Fur-3-ilmetil)-*N*-metilicosa-5,8,11,14-tetraenamida **8**



Método B.

Cromatografía: cloroformo:hexano (1:1) y hexano:éter etílico (3:2).

Rto. = 52%;  $R_f$  = 0,16 (hexano:éter etílico, 1:1).

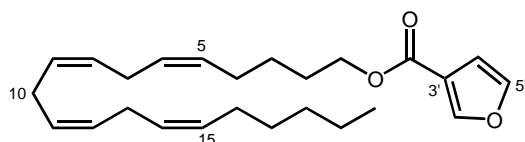
IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3011, 2928, 2856, 1628, 1460, 1408, 1273, 1161, 1068, 874, 733.

$^1\text{H}$ -RMN (70 °C,  $\text{CD}_3\text{CN}$ - $\delta$ ): 0,92 (t, 3H,  $J$  = 7,0 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,33-1,43 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,69 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,07-2,26 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,35-2,37 (m, 2H,  $2\text{H}_2$ ), 2,84-2,92 (m, 9H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ , N- $\text{CH}_3$ ), 4,38 (s, 2H,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,34-5,64 (m, 8H, H vinílicos), 6,37 (s, 1H,  $\text{H}_4$ ) 7,42-7,45 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (70 °C,  $\text{CD}_3\text{CN}-\delta$ ): 14,6, 23,6 (2C), 26,8 (3C), 28,0 (2C), 28,4 (2C), 30,5 (2C), 32,7, 123,7, 129,1, 129,2, 129,4, 129,5, 129,7, 129,8, 129,9, 131,0, 131,7, 142,0, 145,0, 173,8.

$\text{MS (ESI)}$ : 398 (M+1, 100), 397 (M), 348, 305, 259, 238, 196, 112.

#### 5.1.3.9. 3-Furoato de (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenilo 10



#### Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (7,5:2,5).

Rto. = 68%;  $R_f$  = 0,34 (hexano:cloroformo, 7:3).

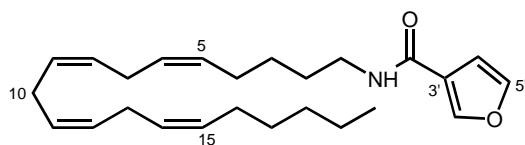
$\text{IR (CHCl}_3, \text{cm}^{-1})$ : 3298, 3136, 3013, 2957, 2928, 2856, 2341, 1742, 1508, 1458, 1306, 1163, 1076, 910, 762.

$^1\text{H-RMN (CDCl}_3-\delta)$ : 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,21-1,40 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,44-1,60 (m, 2H,  $2\text{H}_2$ ), 1,65-1,81 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,18 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,79-2,87 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 4,25 (t, 2H,  $J$  = 6,6 Hz,  $2\text{H}_1$ ), 5,26-5,47 (m, 8H, H vinílicos), 6,74 (dd, 1H,  $J$  = 1,7, 0,7 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,42 (t, 1H,  $J$  = 1,7 Hz,  $\text{H}_5$ ) 8,00 (dd, 1H,  $J$  = 1,5, 0,7 Hz,  $\text{H}_2$ ).

$^{13}\text{C-RMN (CDCl}_3-\delta)$ : 14,0, 22,5, 25,6 (3C), 26,0, 26,8, 27,2, 28,3, 29,3, 31,5, 64,6, 110,0, 119,7, 127,5, 127,9, 128,1, 128,2, 128,3, 128,6, 129,6, 130,5, 143,8, 147,7, 163,3.

$\text{MS (ESI)}$ : 407 (M+Na, 100), 385 (M+1).

#### 5.1.3.10. (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(icosa-5,8,11,14-tetraenil)-3-furamida 11



Cromatografía: cloroformo:hexano (1:1).

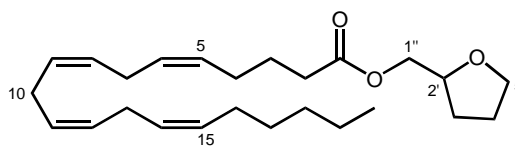
Rto. = 55%;  $R_f$  = 0,34 (cloroformo).

$\text{IR (CDCl}_3, \text{cm}^{-1})$ : 3310, 2930, 2856, 2307, 1638, 1541, 1452, 1323, 1265, 1163, 876.

$^1\text{H-RMN (CDCl}_3-\delta)$ : 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,20-1,32 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,45-1,60 (m, 2H,  $2\text{H}_2$ ), 1,75-1,85 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 1,97-2,17 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,81 (t, 6H,  $J$  = 5,4 Hz,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,41 (q, 2H,  $J$  = 6,8 Hz,  $2\text{H}_1$ ), 5,30-5,44 (m, 8H, H vinílicos), 5,72 (sa, 1H, NH), 6,58 (dd, 1H,  $J$  = 1,7, 0,7 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,43 (t, 1H,  $J$  = 1,7 Hz,  $\text{H}_5$ ) 7,91 (dd, 1H,  $J$  = 1,7, 0,7 Hz,  $\text{H}_2$ ).

$^{13}\text{C-RMN (CDCl}_3-\delta)$ : 14,0, 22,5, 25,4, 25,6 (2C), 26,8, 26,9, 27,2, 29,3, 31,0, 31,5, 38,5, 110,5, 120,5, 127,5, 127,9, 128,2 (2C), 128,3, 128,6, 129,6, 130,5, 143,7, 147,8, 174,3.

#### 5.1.3.11. ( $\pm$ )-(5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de (tetrahidrofur-2-il)metilo 12



#### Método A.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo (10:1) y hexano:cloruro de metileno (1:5).

Rto. = 48%;  $R_f$  = 0,11 (hexano:cloruro de metileno, 1:5).

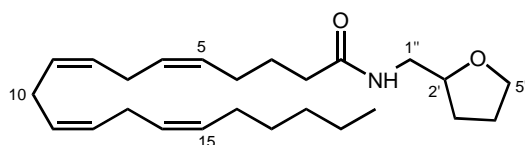
$\text{IR (CHCl}_3, \text{cm}^{-1})$ : 3016, 2957, 2930, 2858, 1732, 1086, 1024, 926.

$^1\text{H-RMN (CDCl}_3-\delta)$ : 0,86 (t, 3H,  $J$  = 6,9 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,38 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,53-1,63 (m, 2H,  $2\text{H}_3$  o  $2\text{H}_4$ ), 1,70 (qt, 2H,  $J$  = 7,5 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 1,83-1,95 (m, 2H,  $2\text{H}_3$  o  $2\text{H}_4$ ), 1,98-2,12 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,33 (t, 2H,  $J$  = 7,6 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,76-2,82 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,71-3,78 (m, 1H,  $\text{H}_{5a}$ ), 3,81-3,89 (m, 1H,  $\text{H}_{5b}$ ), 3,91-3,99 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4,05-4,20 (m, 2H,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,32-5,35 (m, 8H, H vinílicos).



$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,6, 24,8, 25,6 (3C), 26,5, 27,2 (2C), 28,0, 29,3, 31,5, 33,6, 66,4, 68,4, 76,4, 127,5, 127,9, 128,2 (2C), 128,6, 128,8, 128,9, 130,5, 173,5.

5.1.3.12. ( $\pm$ )-(5Z,8Z,11Z,14Z)-*N*-(Tetrahidrofur-2-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida **13**



Método A.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo (1:1) y cloroformo:acetato de etilo (5:1).

Rto. = 83%;  $R_f$  = 0,18 (cloroformo:acetato de etilo, 5:1).

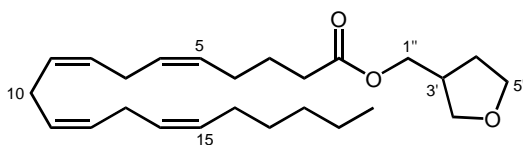
IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3443, 3329, 3016, 2930, 2858, 1655, 1522, 1078.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,85 (t, 3H,  $J$  = 6,0 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,35 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,46-1,55 (m, 1H,  $\text{H}_3$  o  $\text{H}_4$ ), 1,71 (qt, 2H,  $J$  = 7,8 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 1,81-1,91 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 1,97-2,11 (m, 3H,  $\text{H}_3$  o  $\text{H}_4$ ), 2,16 (t, 2H,  $J$  = 7,2 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,76-2,82 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,07 (ddd, 1H,  $J$  = 13,5, 7,5, 4,5 Hz,  $\text{H}_{1'a}$ ), 3,57 (ddd, 1H,  $J$  = 13,8, 6,6, 3,3 Hz,  $\text{H}_{1'b}$ ), 3,70 (q, 1H,  $J$  = 6,9 Hz,  $\text{H}_{5'a}$ ), 3,81 (q, 1H,  $J$  = 6,6 Hz,  $\text{H}_{5'b}$ ), 3,91 (qd, 1H,  $J$  = 7,5, 3,3 Hz,  $\text{H}_2$ ), 5,26-5,39 (m, 8H, H vinílicos), 5,81 (sa, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,5, 25,5, 25,6 (3C), 25,8, 26,7, 27,2, 28,6, 29,3, 31,5, 36,0, 43,1, 67,9, 77,7, 127,5, 127,8, 128,2 (2C), 128,5, 128,7, 129,1, 130,4, 172,7.

MS: 388 ( $\text{M}+1$ ), 198, 182, 102, 83 (100), 71, 55.

5.1.3.13. ( $\pm$ )-(5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de (tetrahidrofur-3-il)metilo **14**



Método A.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo (10:1) y cloroformo→cloroformo:acetato de etilo (1:1).

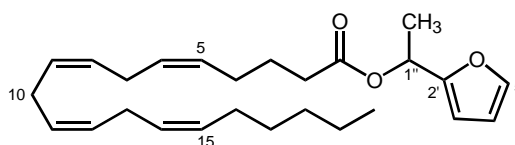
Rto. = 38%;  $R_f$  = 0,17 (cloroformo).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3013, 2928, 2856, 1738, 1456, 1153, 1078, 916, 712.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,19-1,32 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,54-1,77 (m, 3H,  $2\text{H}_3$ ,  $\text{H}_{4a}$ ), 1,95-2,16 (m, 5H,  $\text{H}_{4b}$ ,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,32 (t, 2H,  $J$  = 7,8 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,50-2,64 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 2,78-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,56 (dd, 1H,  $J$  = 8,8, 5,6 Hz, H-C-O), 3,69-4,13 (m, 5H, H-C-O), 5,26-5,41 (m, 8H, H vinílicos).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,5, 24,7, 25,6 (3C), 26,5, 27,2, 29,0, 29,3, 31,5, 33,6, 38,3, 65,7, 67,7, 70,5, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 128,9, 130,5, 173,4.

5.1.3.14. ( $\pm$ )-(5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de 1-(fur-2-il)etilo **15**



Método A y método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (7:3).

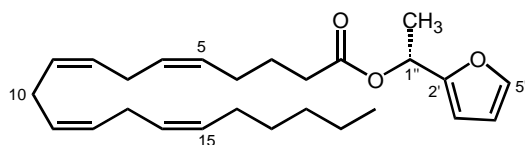
Rto. = 30% (método A) y 68% (método B);  $R_f$  = 0,16 (hexano:cloroformo, 3:2).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3013, 2957, 2930, 2856, 1736, 1456, 1375, 1244, 1153, 1055, 1011.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,87 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,24-1,36 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,56 (d, 3H,  $J$  = 6,9 Hz,  $\text{CH}_3$ -CH), 1,68 (qt, 2H,  $J$  = 7,5 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,11 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,30 (t, 2H,  $J$  = 7,5 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,74-2,83 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 5,28-5,42 (m, 8H, H vinílicos), 5,96 (q, 1H,  $J$  = 6,6 Hz,  $\text{H}_{1'}$ ), 6,28-6,32 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ), 7,35-7,36 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 18,2, 22,6, 24,8, 25,6 (3C), 26,5, 27,2, 29,3, 31,5, 33,8, 64,8, 107,6, 110,2, 127,5, 127,9, 128,2 (2C), 128,6, 128,8, 128,9, 130,4, 142,4, 153,6, 172,7.

5.1.3.15. (+)- (*R*)- (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de 1-(fur-2-il)etilo **16**



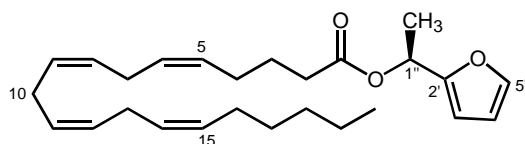
Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (7:3).

Rto. = 55%

Los datos de **16** coinciden con los del racémico **15** exceptuando la rotación óptica con un valor de  $[\alpha]_D^{20} = +29,6$  ( $c = 3,0$ , etanol).

5.1.3.16. (-)- (*S*)- (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de 1-(fur-2-il)etilo **17**



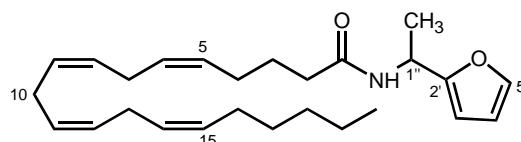
Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (7:3).

Rto. = 55%

Los datos de **17** coinciden con los del racémico **15** exceptuando la rotación óptica con un valor de  $[\alpha]_D^{20} = -31,7$  ( $c = 2,9$ , etanol).

5.1.3.17. ( $\pm$ )-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-[1-(Fur-2-il)etil]icosa-5,8,11,14-tetraenamida **18**



Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (1:1).

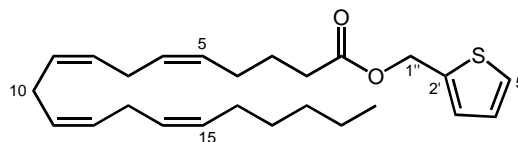
Rto. = 72%;  $R_f = 0,22$  (cloroformo).

IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3327, 3013, 2959, 2930, 2856, 1662, 1506, 1452, 1375, 1227, 1151, 1096, 1072, 1013.

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,90 (t, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,24-1,39 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,48 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ -CH), 1,68-1,79 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 2,03-2,22 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,78-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 5,23 (q, 1H,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{H}_{1'}$ ), 5,32-5,42 (m, 8H, H vinílicos), 5,68 (da, 1H,  $J = 7,8$  Hz, NH), 6,18 (dt, 1H,  $J = 3,3$ , 0,8 Hz,  $\text{H}_3$ ), 6,32 (dd, 1H,  $J = 3,3$ , 1,9 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,35 (dd, 1H,  $J = 1,8$ , 0,7 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 13,9, 19,5, 22,4, 25,2, 25,4 (2C), 25,5, 26,4, 27,0, 29,1, 31,3, 35,9, 42,6, 105,4, 110,0, 127,3, 127,7, 128,0 (2C), 128,4, 128,6, 128,9, 130,3, 141,7, 155,2, 171,6.

5.1.3.18. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de (tien-2-il)metilo **19**



Método A.

Cromatografía: hexano:acetato de etilo (30:1) y éter etílico:hexano (1:10).

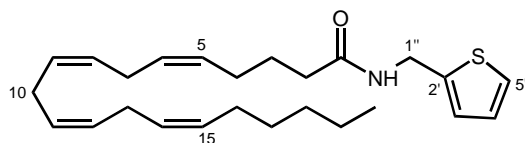
Rto. = 49%;  $R_f = 0,66$  (cloroformo).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3013, 2926, 2858, 2856, 1736, 1439, 1230, 1146, 702.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,88 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,25-1,37 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,70 (qt, 2H, *J* = 7,5 Hz, 2H<sub>3</sub>), 2,01-2,13 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,33 (t, 2H, *J* = 7,8 Hz, 2H<sub>2</sub>), 2,75-2,84 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 5,26 (s, 2H, 2H<sub>1</sub>), 5,28-5,42 (m, 8H, H vinílicos), 6,97 (dd, 1H, *J* = 5,1, 3,6 Hz, H<sub>4</sub>), 7,08 (d, 1H, *J* = 3,3 Hz, H<sub>3</sub>), 7,30 (d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,0, 22,6, 24,7, 25,6 (3C), 26,5, 27,2, 29,3, 31,5, 33,6, 60,4, 126,7, 126,8, 127,5, 127,9, 128,0, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 128,9, 130,5, 138,1, 173,2.

5.1.3.19. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-(Tien-2-ilmetil)-icosa-5,8,11,14-tetraenamida 20



Método A.

Cromatografía: cloroformo:acetato de etilo (9,5:0,5).

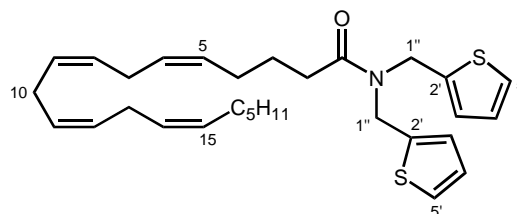
Rto. = 72%; R<sub>f</sub> = 0,39 (cloruro de metileno:éter etílico, 9,5:0,5).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3319, 2930, 2858, 1713, 1651, 1545, 1529, 1458, 1431, 1367, 1223, 1159, 1043, 852, 702.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,92 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,22-1,33 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,75 (qt, 2H, *J* = 7,4 Hz, 2H<sub>3</sub>), 2,05-2,17 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,22 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, 2H<sub>2</sub>), 2,82-2,85 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 4,61 (d, 2H, *J* = 5,4 Hz, 2H<sub>1</sub>), 5,32-5,39 (m, 8H, H vinílicos), 6,08 (sa, 1H, NH), 6,96 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>), 7,22-7,24 (m, 1H, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,0, 22,6, 25,4, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 35,9, 38,3, 125,2, 126,0, 126,9 (2C), 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 129,0, 130,5, 141,0, 176,0.

5.3.1.20. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-Bis(tien-2-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida 21



Método A.

Cromatografía: cloroformo:éter etílico (100:1→20:1) y cloroformo:hexano (9,5:0,5)→cloroformo.

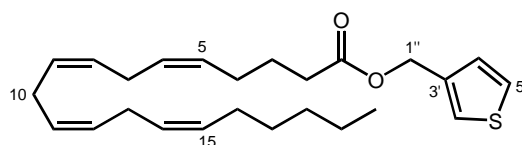
Rto. = 27%; R<sub>f</sub> = 0,21 (cloroformo:hexano, 4:1).

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3055, 2961, 2930, 2856, 1713, 1636, 1420, 1364, 1094.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,88 (t, 3H, *J* = 6,8 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,25-1,29 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,76-1,89 (m, 2H, 2H<sub>3</sub>), 2,02-2,16 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,46 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz, 2H<sub>2</sub>), 2,79-2,82 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 4,61 (s, 2H, 2H<sub>1</sub>), 4,74 (s, 2H, 2H<sub>1</sub>), 5,30-5,46 (m, 8H, H vinílicos), 6,93-6,99 (m, 4H, 2H<sub>3</sub>, 2H<sub>4</sub>), 7,25-7,27 (m, 2H, 2H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,0, 22,6 (2C), 25,1, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 32,4, 33,6, 127,5, 127,9 (2C), 128,1 (2C), 128,2, 128,3, 128,4, 128,6, 128,7, 129,3 (2C), 130,5 (2C), 139,8 (2C), 176,1.

5.1.3.21. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de (tien-3-il)metilo 22



Método A.

Cromatografía: éter etílico:hexano (1:10) y hexano:acetato de etilo (25:1).

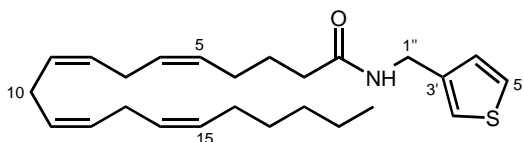
Rto. = 89%; R<sub>f</sub> = 0,22 (hexano:acetato de etilo, 25:1).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3016, 2957, 2930, 2856, 1730, 1439, 1251, 1157.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,88 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,25-1,37 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,71 (qt, 2H, *J* = 7,5 Hz, 2H<sub>3</sub>), 2,01-2,13 (m, 4H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>), 2,34 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, 2H<sub>2</sub>), 2,75-2,84 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 5,11 (s, 2H, 2H<sub>1</sub>), 5,30-5,41 (m, 8H, H vinílicos), 7,07 (dd, 1H, *J* = 4,8, 1,2 Hz, H<sub>4</sub>), 7,28-7,31 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,0, 22,6, 24,7, 25,6 (3C), 26,5, 27,2, 29,3, 31,5, 33,6, 61,0, 124,2, 126,2, 127,5, 127,6, 127,9, 128,1, 128,2, 128,6, 128,9 (2C), 130,5, 136,9, 173,3.

5.1.3.22. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-(Tien-3-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida 23



Método B.

Cromatografía: cloroformo: hexano (9:1).

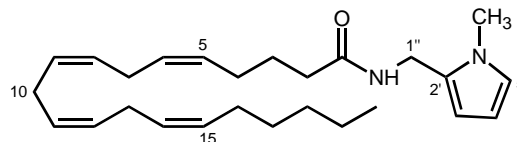
Rto. = 40%; R<sub>f</sub> = 0,48 (cloroformo:éter etílico, 9:1).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3352, 3018, 2930, 2858, 1718, 1655, 1522, 1458, 1420, 1049, 908.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,88 (t, 3H, *J* = 6,6 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,25-1,39 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,74 (qt, 2H, *J* = 7,1 Hz, 2H<sub>3</sub>), 2,00-2,24 (m, 6H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>, 2H<sub>2</sub>), 2,76-2,86 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 4,44 (d, 2H, *J* = 5,6 Hz, 2H<sub>1</sub>), 5,26-5,46 (m, 8H, H vinílicos), 5,68 (sa, 1H, NH), 7,02 (dd, 1H, *J* = 4,9, 1,2 Hz, H<sub>4</sub>), 7,12-7,15 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7,29 (dd, 1H, *J* = 4,9, 2,9 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,0, 22,5, 25,5, 25,6 (3C), 26,7, 27,2, 29,3, 31,5, 36,0, 38,7, 122,3, 126,4, 127,3, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 129,1, 130,5, 139,1, 172,5.

5.1.3.23. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-(1-Metilpirrol-2-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida 24



Método A.

Cromatografía: cloroformo:acetato de etilo (9,5:0,5) y hexano:acetato de etilo (7:3).

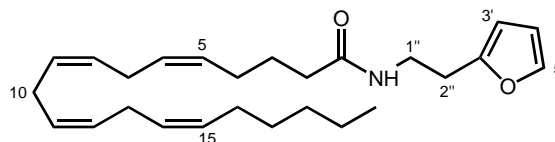
Rto. = 48%; R<sub>f</sub> = 0,34 (hexano:acetato de etilo, 3:2).

IR (CHCl<sub>3</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3018, 2926, 2854, 1655, 1508, 1425, 930.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 0,88 (t, 3H, *J* = 6,0 Hz, 3H<sub>20</sub>), 1,25-1,39 (m, 6H, 2H<sub>17</sub>, 2H<sub>18</sub>, 2H<sub>19</sub>), 1,72 (qt, 2H, *J* = 7,3 Hz, 2H<sub>3</sub>), 2,00-2,24 (m, 6H, 2H<sub>4</sub>, 2H<sub>16</sub>, 2H<sub>2</sub>), 2,79-2,86 (m, 6H, 2H<sub>7</sub>, 2H<sub>10</sub>, 2H<sub>13</sub>), 3,57 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 4,43 (d, 2H, *J* = 5,1 Hz, 2H<sub>1</sub>), 5,30-5,41 (m, 8H, H vinílicos), 5,43 (sa, 1H, NH), 6,06 (d, 2H, *J* = 2,4 Hz, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>), 6,61 (t, 1H, *J* = 2,2 Hz, H<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>-δ): 14,0, 22,5, 25,5, 25,6 (3C), 26,7, 27,2, 29,3, 31,5, 33,7, 35,1, 36,0, 107,0, 108,7, 123,1, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6 (2C), 128,8, 129,0, 130,5, 172,0.

5.1.3.24. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-[2-(Fur-2-il)etil]icosa-5,8,11,14-tetraenamida 25



Método B.

Cromatografía: cloruro de metileno:acetato de etilo (9,5:0,5) y cloroformo.

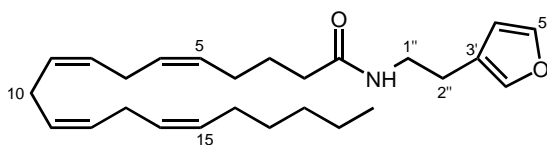
Rto. = 29%;  $R_f$  = 0,60 (cloruro de metileno:acetato de etilo, 9:1).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3350, 2924, 2854, 2361, 2343, 1641, 1545, 1439, 1377, 1068, 1026.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,82 (t, 3H,  $J$  = 6,7 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,18-1,36 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,62 (qt, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 1,93-2,12 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,71-2,80 (m, 8H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ,  $2\text{H}_2'$ ), 3,47 (q, 2H,  $J$  = 6,3 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,20-5,37 (m, 8H, H vinílicos), 5,54 (sa, 1H, NH), 6,00 (dd, 1H,  $J$  = 3,0, 0,7 Hz,  $\text{H}_3$ ), 6,24 (dd, 1H,  $J$  = 3,0, 1,9 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,27 (dd, 1H,  $J$  = 1,5, 0,7 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,1, 22,6, 25,5, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 28,2, 29,3, 31,5, 36,1, 38,0, 106,4, 110,3, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,7, 129,1, 130,5, 141,6, 153,0, 174,0.

5.1.3.25. (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[2-(Fur-3-il)etil]icosa-5,8,11,14-tetraenamida 26



Método B.

Cromatografía: cloroformo y cloroformo:hexano (9:1).

Rto. = 42%;  $R_f$  = 0,38 (cloroformo:éter etílico, 9:1).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296, 3011, 2955, 2928, 2856, 1643, 1553, 1502, 1454, 1439, 1161, 1066, 1026, 874.

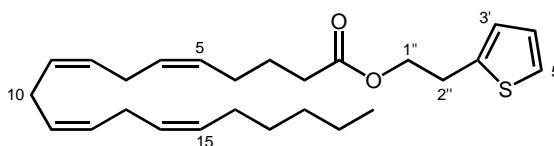
$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,89 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,25-1,39 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,62 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,18 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,63 (t, 2H,  $J$  = 6,8 Hz,  $2\text{H}_2'$ ), 2,78-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,46 (q, 2H,  $J$  = 6,8 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,33-5,41 (m, 9H, H vinílicos, NH), 6,28-6,29 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,26-7,27 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7,38 (t, 1H,  $J$  = 1,7 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,1, 22,6, 25,0, 25,5, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 36,2, 39,4, 110,8, 121,8, 127,6,

127,9, 128,2, 128,3, 128,6, 128,8, 129,1, 130,6, 139,6, 143,3, 172,8.

MS (ESI): 420,6 (M+Na; 100), 398,6 (M+1).

5.1.3.26. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de 2-(tien-2-il)etilo 27



Método A.

Cromatografía: cloroformo:hexano (3:7) y hexano:acetato de etilo (9,5:0,5).

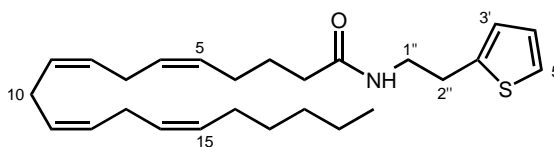
Rto. = 40%;  $R_f$  = 0,18 (hexano:acetato de etilo, 9:1).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3055, 2957, 2932, 2860, 1732, 1421, 1173, 897.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,89 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,40 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,70 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,01-2,16 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,34 (t, 2H,  $J$  = 7,6 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,78-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,15 (td, 2H,  $J$  = 6,7, 0,7 Hz,  $2\text{H}_2'$ ), 4,30 (t, 2H,  $J$  = 6,7 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,27-5,47 (m, 8H, H vinílicos), 6,84-6,87 (d, 1H,  $J$  = 3,4 Hz,  $\text{H}_4$ ), 6,92-6,96 (dd, 1H,  $J$  = 5,1, 3,4 Hz,  $\text{H}_3$ ), 7,16 (dd, 1H,  $J$  = 5,1, 1,2 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,6, 24,7, 25,6 (2C), 26,5, 27,2, 29,3 (2C), 30,9, 31,5, 33,6, 64,6, 124,0, 125,5, 126,8, 127,5, 127,8, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 128,9, 130,5, 140,0, 173,5.

5.1.3.27. (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[2-(Tien-2-il)etil]icosa-5,8,11,14-tetraenamida 28



## Método A.

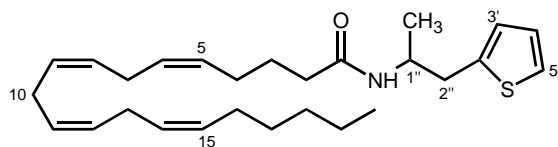
Cromatografía: cloroformo:hexano (3:2) y cloroformo:éter etílico (9,5:0,5).

Rto. = 42%;  $R_f$  = 0,26 (cloroformo:éter etílico, 9,5:0,5).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3292, 3011, 2955, 2928, 2856, 1645, 1553, 1435, 1032, 850, 822, 694.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,82 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,21-1,42 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,71 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,05-2,19 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,80-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,04 (t, 2H,  $J$  = 6,6 Hz,  $2\text{H}_{2'}$ ), 3,54 (q, 2H,  $J$  = 6,3 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,25-5,47 (m, 8H, H vinílicos), 5,49 (sa, 1H, NH), 6,82-6,84 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 6,95 (dd, 1H,  $J$  = 5,1, 3,4 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,17 (dd, 1H,  $J$  = 5,1, 1,2 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,6, 25,5, 25,6 (3C), 26,7, 27,2, 29,3, 30,0, 31,5, 36,1, 40,7, 123,9, 125,3, 127,0, 127,5, 127,8, 128,2 (3C), 128,6, 128,8, 129,1, 130,5, 173,0.

5.1.3.28. ( $\pm$ )-(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[1-Metil-2-(tien-2-il)etil]icosa-5,8,11,14-tetraenamida **29**

## Método B.

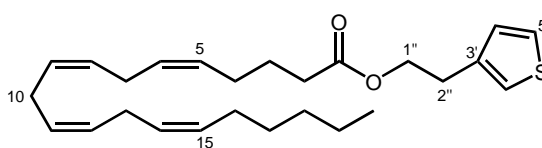
Cromatografía: cloroformo:hexano (3:2).

Rto. = 40%;  $R_f$  = 0,30 (cloroformo).

IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3300, 3013, 2957, 2928, 2856, 1645, 1545, 1514, 1454, 1377, 1258, 1159, 1034, 976.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,14 (d, 3H,  $J$  = 6,8 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,25-1,39 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,62 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,18 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,78-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 2,90-3,10 (m, 2H,  $2\text{H}_{2'}$ ), 4,21-4,34 (m, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ), 5,23-5,38 (m, 9H, H vinílicos, NH), 6,81 (dd, 1H,  $J$  = 3,4, 1,0 Hz,  $\text{H}_3$ ), 6,94 (dd, 1H,  $J$  = 5,1, 3,4 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7,15 (dd, 1H,  $J$  = 5,1, 1,0 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 19,8, 22,5, 25,5, 25,6 (3C), 26,7, 27,2, 29,3, 31,5, 36,1, 36,3, 45,5, 124,1, 126,3, 126,9, 127,5, 127,8, 128,2 (2C), 128,6, 128,7, 129,1, 130,5, 139,4, 171,9.

5.1.3.29. (5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de 2-(tien-3-il)etilo **30**

## Método A.

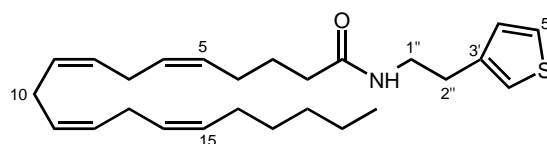
Cromatografía: hexano:cloroformo (7:3).

Rto. = 73%;  $R_f$  = 0,18 (hexano:cloroformo, 3:2).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3018, 2957, 2932, 2860, 1728, 1458, 1414, 1381, 1175.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,86 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,23-1,37 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,65 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 1,99-2,10 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,28 (t, 2H,  $J$  = 7,6 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,75-2,82 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 2,93 (t, 2H,  $J$  = 6,9 Hz,  $2\text{H}_{2'}$ ), 4,25 (t, 2H,  $J$  = 6,9 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,26-5,41 (m, 8H, H vinílicos), 6,93 (dd, 1H,  $J$  = 4,8, 1,2 Hz,  $\text{H}_4$ ), 6,98 (d, 1H,  $J$  = 2,7 Hz,  $\text{H}_2$ ), 7,23 (dd, 1H,  $J$  = 4,6, 3,0 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,2, 22,6, 24,8, 25,6 (2C), 26,5, 27,2, 29,3, 29,6, 31,5, 33,7, 34,5, 64,3, 121,5, 125,6, 127,6, 127,9, 128,1, 128,2 (2C), 128,6, 128,8, 128,9, 130,5, 138,2, 173,6.

5.1.3.30. (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[2-(Tien-3-il)etil]icosa-5,8,11,14-tetraenamida **31**

## Método A.

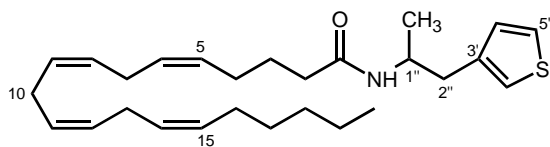
Cromatografía: cloruro de metileno:hexano (2:3) y éter etílico:hexano (3:7).

Rto. = 60%;  $R_f$  = 0,24 (éter etílico:hexano, 7:3).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3327, 3053, 3013, 2957, 2930, 2858, 1713, 1668, 1518, 1439, 895.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,86 (t, 3H,  $J$  = 6,7 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,23-1,36 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,66 (qt, 2H,  $J$  = 7,4 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 1,99-2,14 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,75-2,84 (m, 8H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ,  $2\text{H}_{2'}$ ), 3,49 (q, 2H,  $J$  = 6,5 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,26-5,40 (m, 8H, H vinílicos), 5,47 (sa, 1H, NH), 6,92 (dd, 1H,  $J$  = 4,9, 1,3 Hz,  $\text{H}_4$ ), 6,97-6,98 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7,26 (dd, 1H,  $J$  = 4,8, 3,0 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 22,6, 25,5, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 30,2, 31,5, 36,1, 39,8, 121,3, 126,0, 127,5, 127,8, 128,0, 128,1, 128,2, 128,6, 128,8, 129,1, 130,5, 139,3, 173,0.

5.1.3.31. ( $\pm$ )-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-*N*-[1-Metil-2-(tien-3-il)etil]licos-5,8,11,14-tetraenamida **32**

## Método B.

Cromatografía: hexano:éter etílico (7:3) y cloruro de metileno:éter etílico (100:1→1:1).

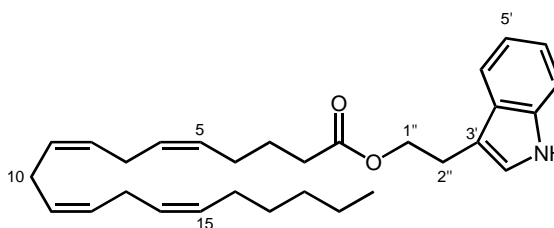
Rto. = 55%;  $R_f$  = 0,15 (cloroforno).

IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3327, 3013, 2960, 2928, 1653, 1508, 1456, 1097, 1020.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,88 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,12 (d, 3H,  $J$  = 6,6 Hz,  $\text{CH}_3$ -CH), 1,26-1,39 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,66 (qt, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,16 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,79-2,86 (m, 8H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ,  $2\text{H}_{2'}$ ), 4,20-4,34 (m, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ), 5,25-5,46 (m, 8H, H vinílicos), 6,93

(dd, 1H,  $J$  = 4,9, 1,2 Hz,  $\text{H}_4$ ), 6,96-6,98 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7,26 (dd, 1H,  $J$  = 4,9, 2,9 Hz,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,0, 20,3, 22,6, 25,5, 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 36,2, 36,8, 45,2, 121,9, 125,5, 127,5, 127,8, 128,2 (2C), 128,6, 128,7 (2C), 129,1, 130,5, 138,1, 172,0.

5.1.3.32. (5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoato de 2-(1*H*-indol-3-il)etilo **33**

## Método B.

Cromatografía: cloroforno:hexano (4:1).

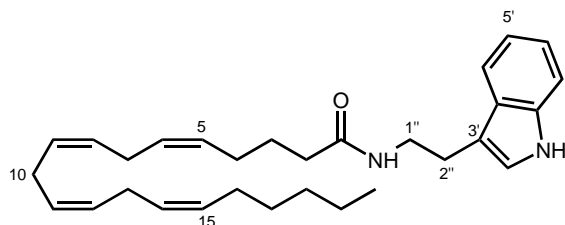
Rto. = 65%;  $R_f$  = 0,38 (cloruro de metileno:hexano, 4:1).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3412, 3013, 2957, 2928, 2856, 1728, 1458, 1225, 704.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,89 (t, 3H,  $J$  = 6,8 Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,27-1,37 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,72 (qt, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $2\text{H}_3$ ), 1,93-2,07 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,35 (t, 2H,  $J$  = 7,3 Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,79-2,86 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,02 (td, 2H,  $J$  = 7,2, 0,6 Hz,  $2\text{H}_{2'}$ ), 4,28 (t, 2H,  $J$  = 7,2 Hz,  $2\text{H}_{1'}$ ), 5,20-5,40 (m, 8H, H vinílicos), 6,94 (d, 1H,  $J$  = 2,3 Hz,  $\text{H}_2$ ), 7,10-7,26 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ), 7,37 (d, 1H,  $J$  = 7,6 Hz,  $\text{H}_7$ ), 7,66 (d, 1H,  $J$  = 7,6 Hz,  $\text{H}_4$ ), 8,07 (sa, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,1, 22,6, 24,8 (2C), 25,6 (3C), 26,6, 27,2, 29,3, 31,5, 33,8, 64,3, 111,1, 112,1, 118,8, 119,4, 122,0, 122,1, 127,4, 127,5, 127,9, 128,2 (2C), 128,6, 128,8, 129,0, 130,5, 136,0, 173,6.

5.1.3.33. (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-[2-(1H-Indol-3-il)etil]icososa-5,8,11,14-tetraenamida **34**



Método B.

Cromatografía: cloroformo:hexano (3:7) y cloroformo:éter etílico (9,5:0,5).

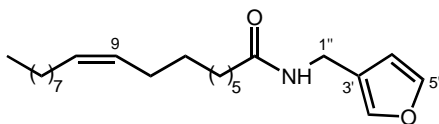
Rto. = 69%;  $R_f = 0,24$  (cloroformo:éter etílico, 9:1).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3408, 3292, 3011, 2926, 2854, 1651, 1526, 1456, 1434, 1229.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,90 (t, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,27-1,37 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,68 (qt, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $2\text{H}_3$ ), 2,01-2,18 (m, 6H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_2$ ), 2,78-2,84 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 2,97 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $2\text{H}_{2''}$ ), 3,60 (q, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,27-5,42 (m, 8H, H vinílicos), 5,67 (sa, 1H,  $\text{NH-CO}$ ), 7,00 (sa, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7,08-7,25 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ), 7,38 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 7,60 (d, 1H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 8,48 (sa, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 13,9, 22,4, 25,4, 25,6 (4C), 26,7, 27,2, 29,1, 31,3, 36,0, 39,6, 111,2, 112,6, 118,5, 119,2, 121,9, 127,4, 127,5, 127,9 (2C), 128,2 (2C), 128,6, 128,7, 129,1, 130,4, 136,3, 172,8.

5.1.3.34. (9Z)-N-(Fur-3-ilmetil)octadec-9-enamida **35**



Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (2:3) y hexano:éter etílico (9:1→1:1).

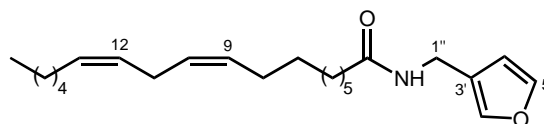
Rto. = 55%;  $R_f = 0,18$  (hexano:cloroformo, 1:4).

IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296, 2928, 2854, 1657, 1514, 1466, 1385, 1161, 1070, 1022.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,87 (t, 3H,  $J = 6,6$  Hz,  $3\text{H}_{18}$ ), 1,26-1,29 (m, 20H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_5$ ,  $2\text{H}_6$ ,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{12}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ,  $2\text{H}_{14}$ ,  $2\text{H}_{15}$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_{17}$ ), 1,58-1,66 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 1,95-2,01 (m, 4H,  $2\text{H}_8$ ,  $2\text{H}_{11}$ ), 2,17 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz,  $2\text{H}_2$ ), 4,20 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,30-5,36 (m, 2H, H vinílicos), 5,74 (sa, 1H, NH), 6,34-6,35 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,34-7,37 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,1, 22,6, 25,7, 27,1, 27,2, 29,1, 29,2 (2C), 29,3 (2C), 29,5, 29,7 (2C), 31,9, 34,3, 36,7, 110,4, 122,5, 129,8, 130,1, 140,2, 143,5, 173,1.

5.1.3.35. (9Z,12Z)-N-(Fur-3-ilmetil)octadeca-9,12-dienamida **36**



Método B.

Cromatografía: cloroformo:hexano (9:1).

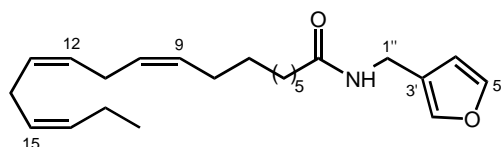
Rto. = 65%;  $R_f = 0,22$  (cloroformo).

IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3294, 3009, 2928, 2854, 2245, 1643, 1545, 1504, 1466, 1433, 1387, 1271, 1161, 1022, 874.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,82 (t, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $3\text{H}_{18}$ ), 1,19-1,35 (m, 14H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_5$ ,  $2\text{H}_6$ ,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{15}$ ,  $2\text{H}_{16}$ ,  $2\text{H}_{17}$ ), 1,53-1,60 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 1,93-1,99 (m, 4H,  $2\text{H}_8$ ,  $2\text{H}_{14}$ ), 2,11 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz,  $2\text{H}_2$ ), 2,70 (t, 2H,  $J = 5,6$  Hz,  $2\text{H}_{11}$ ), 4,21 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,19-5,38 (m, 4H, H vinílicos), 5,63 (sa, 1H, NH), 6,28-6,30 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,30-7,31 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 13,9, 22,4, 25,4, 25,5, 27,0 (2C), 28,9 (2C), 29,1, 29,2, 29,4, 31,3, 34,2, 36,5, 110,1, 122,1, 127,7, 127,8, 129,8, 130,0, 139,9, 143,3, 172,9.



5.1.3.36. (9Z,12Z,15Z)-N-(Fur-3-ilmetil)octadeca-9,12,15-trienamida **37**

## Método B.

Cromatografía: éter etílico:hexano (3:7→2:3).

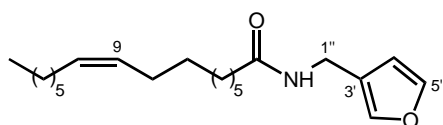
Rto. = 60%;  $R_f = 0,14$  (cloroformo).

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296, 3011, 2926, 2852, 1634, 1543, 1159, 1022, 876.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,96 (t, 3H,  $J = 7,6$  Hz,  $3\text{H}_{18}$ ), 1,23-1,34 (m, 8H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_5$ ,  $2\text{H}_6$ ,  $2\text{H}_7$ ), 1,59-1,69 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 2,00-2,21 (m, 6H,  $2\text{H}_2$ ,  $2\text{H}_8$ ,  $2\text{H}_{17}$ ), 2,80 (t, 4H,  $J = 5,6$  Hz,  $2\text{H}_{11}$ ,  $2\text{H}_{14}$ ), 4,27 (d, 2H,  $J = 5,6$  Hz,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,23-5,46 (m, 6H, H vinílicos), 5,69 (sa, 1H, NH), 6,34-6,35 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,34-7,35 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,3, 20,6, 25,5, 25,6, 25,7, 27,2, 29,1, 29,2 (2C), 29,6, 34,4, 36,8, 110,3, 122,5, 127,1, 127,7, 128,2, 128,3, 130,2, 132,0, 140,2, 143,5, 173,0.

MS: 380 (M+Na, 100), 358 (M+1).

5.1.3.37. (9Z)-N-(Fur-3-ilmetil)hexadec-9-enamida **38**

## Método B.

Cromatografía: hexano:cloroformo (2:3) y hexano:éter etílico (9:1→éter etílico).

Rto. = 65%;  $R_f = 0,17$  (hexano:cloroformo, 1:4).

IR ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3296, 2926, 2854, 1643, 1543, 1466, 1159, 1022, 876.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,88 (t, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $3\text{H}_{16}$ ), 1,28-1,29 (m, 16H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_5$ ,  $2\text{H}_6$ ,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{12}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ,  $2\text{H}_{14}$ ,  $2\text{H}_{15}$ ),

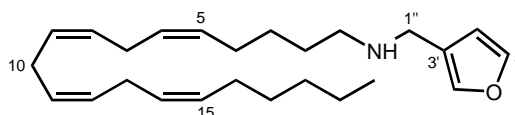
1,59-1,66 (m, 2H,  $2\text{H}_3$ ), 1,98-2,01 (m, 4H,  $2\text{H}_8$ ,  $2\text{H}_{11}$ ), 2,17 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $2\text{H}_2$ ), 4,21 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz,  $2\text{H}_{1''}$ ), 5,25-5,42 (m, 2H, H vinílicos), 5,64 (sa, 1H, NH), 6,34-6,36 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ) 7,35-7,38 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,1, 22,6, 25,7, 27,1, 27,2, 29,0, 29,1, 29,2 (2C), 29,7 (2C), 31,8, 34,4, 36,7, 110,2, 122,4, 129,7, 130,0, 140,1, 143,4, 173,0.

## 5.1.4. Síntesis de aminas I

\* (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(Fur-3-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenilamina **9**

A una suspensión de 20,5 mg (0,54 mmol) de hidruro de litio y aluminio en 1,0 mL de THF se le añade, gota a gota y en atmósfera de argón, una disolución de 70 mg (0,18 mmol) de la amida **7** en 1,0 mL de THF, agitándose a temperatura ambiente durante diez minutos. A continuación, la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante tres horas, tras las cuales se deja enfriar hasta temperatura ambiente agitándose durante seis horas más. Por último se añaden gota a gota y en frío (en baño de hielo) 0,1 mL de agua, 0,05 mL de una disolución de hidróxido sódico al 15% y otros 0,25 mL más de agua y se agita durante cuarenta y cinco minutos. Las sales se filtran, se lavan con éter etílico y los extractos etéreos se secan sobre sulfato sódico. El disolvente se elimina a presión reducida y la amina se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo:acetato de etilo, 9:1→1:1) obteniéndose 45 mg (68%) de **9** (aceite).



$R_f = 0,31$  (cloroformo:metanol, 9:1).

IR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3352, 3013, 2928, 2856, 1458, 1161, 1024.

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 0,89 (t, 3H,  $J = 6,8$  Hz,  $3\text{H}_{20}$ ), 1,22-1,36 (m, 6H,  $2\text{H}_{17}$ ,  $2\text{H}_{18}$ ,  $2\text{H}_{19}$ ), 1,40-1,59 (m, 4H,  $2\text{H}_2$ ,  $2\text{H}_3$ ), 1,92 (sa, 1H, NH), 2,00-2,13 (m, 4H,  $2\text{H}_4$ ,  $2\text{H}_{16}$ ), 2,64 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $2\text{H}_1$ ), 2,78-2,84 (m, 6H,  $2\text{H}_7$ ,  $2\text{H}_{10}$ ,  $2\text{H}_{13}$ ), 3,66 (s, 2H,  $2\text{H}_{11}$ ), 5,30-5,44 (m, 8H, H vinílicos), 6,39-6,41 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7,37-7,38 (m, 2H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_5$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $\delta$ ): 14,1, 22,6, 25,7 (4C), 27,2, 27,4, 27,5, 29,3, 31,5, 44,2, 49,2, 110,6, 123,5, 127,5, 127,9, 128,0, 128,1, 128,3, 128,5, 130,0, 130,5, 140,0, 143,2.

## 5.2. PERFIL IN VITRO DE LOS DERIVADOS DE ÁCIDOS GRASOS I

Tanto el experimento de recaptación de anandamida como los ensayos de afinidad receptoral, con la excepción del receptor  $\text{VR}_1$ , que se realiza en tubos eppendorf, se llevan a cabo en tubos de borosilicato previamente siliconizados con Sigmacote (Sigma). En la realización de estos experimentos se ha utilizado un contador de centelleo líquido  $\beta$  Packard 2500 TR o Beckman LS3801, filtros Whatman GF/C, líquido de centelleo EcoLite, un pH-metro CRISON (micro pH 2001) y una centrífuga Beckman XL-90.

Como radioligandos se han utilizado  $^3\text{H}$ anandamida marcada en el fragmento de ácido araquidónico ( $^3\text{H}$ AEA) (American Radiolabeled Chemicals, Inc., USA, 200  $\text{ci}/\text{mmol}$ , 1  $\text{mci}/\text{mL}$ ) o en el fragmento de etanolamida ( $^3\text{H}$ AEA) (American Radiolabeled Chemicals, Inc., USA, 60  $\text{ci}/\text{mmol}$ ),  $^3\text{H}$ WIN552122 (New England Nuclear, USA, 180  $\text{ci}/\text{mmol}$ , 1  $\text{mci}/\text{mL}$ ),  $^3\text{H}$ CP55940 (New England Nuclear, USA, 180  $\text{ci}/\text{mmol}$ , 1  $\text{mci}/\text{mL}$ ) y  $^3\text{H}$ RTX (New England Nuclear, USA, 48  $\text{ci}/\text{mmol}$ , 0,2  $\text{mci}/\text{mL}$ ). La línea celular HEK293EBNA transfectada con el receptor humano  $\text{CB}_2$  ha sido adquirida en Receptor Biology, Inc. (USA). El resto de reactivos se han adquirido con alto grado de pureza en Aldrich, Gibco, Invitrogen, Merck, Panreac, Sigma o Tocris.

Los valores de  $\text{CI}_{50}$  y  $K_i$  obtenidos corresponden a la media y desviación estándar de experimentos individuales realizados de dos a cuatro veces por triplicado.

### 5.2.1. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida

La determinación de la capacidad de los compuestos sintetizados para inhibir la recaptación de  $^3\text{H}$ AEA se ha llevado a cabo en la línea celular de linfoma humano U937, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación, basado en el descrito por Macarrone *et al.*<sup>230</sup> aunque con ciertas modificaciones.

Las células U937 se cultivan en medio RPMI 1640, suplementado con Hepes 25 mM, piruvato sódico 2,5 mM, 100  $\text{u}/\text{mL}$  de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomina y suero fetal bovino al 10%, inactivado por calor. Las células se mantienen a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de  $\text{CO}_2$ .

El ensayo de recaptación de anandamida se realiza con células intactas en medio RPMI 1640 a una concentración de  $10^6$  células/mL. Las suspensiones de células (1 mL) se preincuban a 37 °C durante 10 minutos en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones ( $5 \cdot 10^{-5}$ - $10^{-7}$  M) del compuesto objeto de estudio en tampón Krebs-HEPES pH = 7,4 (NaCl 118 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,3 mM,  $\text{NaHCO}_3$  20 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,4 mM, KCl 4,7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM,  $\text{EDTANa}_2$  3,98  $\mu\text{M}$ , ácido ascórbico 110  $\mu\text{M}$ , glucosa 11,1 mM y HepesNa 10 mM). A continuación las muestras se incuban a 37 °C durante 7 minutos con una mezcla de anandamida radiactiva (0,45 nM) y fría, a una concentración final de 100 nM.

La recaptación se finaliza por filtración a vacío sobre filtros previamente equilibrados en una disolución de BSA al 0,25%. Los filtros se lavan tres veces con 5 mL de una disolución de BSA al 1% libre de ácidos grasos en tampón Krebs-HEPES pH = 7,4 a 4 °C. Por último, se adicionan 4

<sup>230</sup> Véase nota 55(a).

mL de líquido de centelleo y una vez que los filtros se hayan disuelto se mide la radiactividad retenida utilizando para ello un contador de centelleo  $\beta$ .

La recaptación específica se calcula como la diferencia entre la recaptación total y la inespecífica, determinada con experimentos control realizados a 4 °C.

El porcentaje de recaptación, tomando como 100% la radiactividad retenida en ausencia de inhibidor, se ajusta mediante regresión no lineal a una curva sigmoidea obtenida con el programa Prism (GraphPad).

### 5.2.2. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la actividad hidrolítica de la enzima FAAH

La determinación de la capacidad de los compuestos sintetizados como inhibidores de la actividad amido hidrolasa de la enzima FAAH se ha determinado en homogeneizado cerebral de rata utilizando [Et-<sup>3</sup>H]AEA como trazador siguiendo el protocolo desarrollado por Fowler *et al.*<sup>231</sup>

Los animales de experimentación (ratas adultas Sprague-Dawley) se sacrifican y los cerebros (excepto el cerebelo) se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -70 °C. Para la preparación de las membranas, el tejido es homogeneizado en tampón HEPES 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH = 7,0 a 4 °C con un homogeneizador de vidrio y centrifugado a 36000g durante veinte minutos a 4 °C. A continuación, el sobrenadante se desprecia y el sedimento se lava nuevamente en las condiciones descritas. El sedimento final así obtenido se resuspende en tampón Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, pH = 7,4, se determina la concentración de proteína y se conserva a -70 °C hasta el momento de su utilización.

El día del análisis, las fracciones de membrana se resuspenden en tampón de incubación (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, BSA libre de ácidos grasos 1%, pH = 7,6) y se incuban durante 10 minutos a 37 °C con [Et-<sup>3</sup>H]AEA 2  $\mu$ M en presencia o ausencia de un intervalo de

concentraciones ( $10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-7}$  M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 0,2 mL. La reacción se detiene por inmersión de las muestras en baño de hielo seguido de la adición de 0,4 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (1:1). Tras agitar, las fases orgánica y acuosa se separan por centrifugación y se determina, mediante contaje de centelleo líquido con corrección de desactivación (*quenching*), la radiactividad presente en 200  $\mu$ L de fase acuosa. Los valores de CI<sub>50</sub> se obtienen a partir de sus correspondientes resultados de pI<sub>50</sub>, determinados mediante ajuste a una curva sigmoidea por el programa Prism (Graphpad). Los datos corresponden a la media y desviaciones estándar de al menos tres experimentos realizados de forma independiente.

### 5.2.3. Determinación de la afinidad receptorial

En todos los casos, el cálculo de la CI<sub>50</sub> se realiza mediante regresión no lineal de la curva de desplazamiento, obtenida con el programa Prism (GraphPad). La conversión de CI<sub>50</sub> a K<sub>i</sub> se ha llevado a cabo con la ecuación de Cheng-Prusoff:<sup>232</sup>  $K_i = CI_{50}/(1 + L/K_D)$  donde L es la concentración de radioligando y K<sub>D</sub> su constante de disociación.

#### 5.2.3.1. Ensayo de afinidad por los receptores CB<sub>1</sub>

La afinidad de los ligandos por el receptor CB<sub>1</sub> se ha determinado siguiendo el procedimiento experimental descrito por Houston *et al.*<sup>233</sup> con algunas modificaciones, utilizando [<sup>3</sup>H]WIN552122 como radioligando y cerebelo como tejido cerebral.

Los animales de experimentación (ratas albinas machos adultas, *Rattus norvegicus albinus*), de raza Wistar, se mantienen en condiciones controladas de luz (08:00-20:00 h) y temperatura (23  $\pm$  1 °C) y con acceso libre a comida (Panlab, Barcelona, España) y agua. Se sacrifican por decapitación a las 8-10 semanas de su

<sup>231</sup> Véase nota 199.

<sup>232</sup> Véase nota 206.

<sup>233</sup> Véase nota 203.

nacimiento (peso aproximado 250 g), los cerebros se extirpan rápidamente, se diseccionan sobre hielo y los cortes de cerebelo se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

El día del análisis el correspondiente tejido es pesado y homogeneizado con un Polytron durante 20 segundos en 5 mL de tampón Tris-HCl 50 mM, 4  $^{\circ}\text{C}$ , pH = 7,4 y se centrifuga a 48000g durante diez minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Tras el primer lavado, el sobrenadante se desprecia y el sedimento se lava nuevamente en las condiciones descritas. El sedimento final así obtenido se resuspende en 20 volúmenes de tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM y BSA libre de ácidos grasos 5 mg/mL, pH = 7,4).

A continuación, fracciones de membrana de 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión final de membranas (5 mg/mL de proteína) se incuban durante 90 minutos a 30  $^{\circ}\text{C}$  con [ $^3\text{H}$ ]WIN552122 0,5 nM en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 0,5 mL de tampón (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM y BSA libre de ácidos grasos 5 mg/mL, pH = 7,4). La unión no específica se determina con SR141716A 10  $\mu\text{M}$ . El ligando radiactivo unido se separa del libre por filtración a vacío utilizando un aparato de filtración múltiple a vacío Brandel Harvester sobre filtros previamente equilibrados en tampón Tris-HCl 50 mM, BSA 1 mg/mL y pH = 7,4. Los filtros se lavan tres veces con 5 mL del mismo tampón a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Por último, se adicionan 4 mL de líquido de centelleo y una vez disueltos los filtros se mide la radiactividad unida a las membranas mediante espectrometría de centelleo líquido.

La unión específica de los compuestos se calcula como la diferencia entre la unión en ausencia y en presencia de SR141716A.

### 5.2.3.2. Ensayo de afinidad por los receptores CB<sub>2</sub>

La afinidad de los ligandos por el receptor CB<sub>2</sub> se ha determinado siguiendo el procedimiento experimental descrito por Griffin *et al.*<sup>234</sup> con algunas modificaciones utilizando como radioligando [ $^3\text{H}$ ]CP55940 y como tejido membranas de células HEK293EBNA transfectadas con el receptor CB<sub>2</sub> humano.

Las membranas se resuspenden en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, EGTA 2,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y BSA libre de ácidos grasos 1 mg/mL, pH = 7,5). Fracciones de la suspensión final de membranas (1,44 mg/mL de proteína, aproximadamente) se incuban durante 90 minutos a 30  $^{\circ}\text{C}$  con [ $^3\text{H}$ ]WIN552122 0,3 nM en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 0,2 mL de tampón (Tris-HCl 50 mM, EGTA 2,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y BSA libre de ácidos grasos 1 mg/mL, pH = 7,5). La unión no específica se determina con CP55940 5  $\mu\text{M}$ . El ligando radiactivo unido se separa del libre por filtración a vacío utilizando un aparato de filtración múltiple a vacío Brandel Harvester sobre filtros previamente equilibrados en una disolución de polietilenoimina al 0,05%. Los filtros se lavan tres veces con 5 mL del mismo tampón (Tris-HCl 50 mM, EGTA 2,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y BSA libre de ácidos grasos 1 mg/mL, pH = 7,5) a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Por último, se adicionan 4 mL de líquido de centelleo y una vez disueltos los filtros se mide la radiactividad unida a las membranas mediante espectrometría de centelleo líquido.

La unión específica de los compuestos se calcula como la diferencia entre la unión en ausencia y en presencia de CP55940.

### 5.2.3.3. Ensayo de afinidad por los receptores VR<sub>1</sub>

La afinidad de los ligandos por el receptor VR<sub>1</sub> se ha determinado siguiendo el procedimiento experimental

---

<sup>234</sup> Véase nota 204.

descrito por Szallasi *et al.*<sup>235</sup> con algunas modificaciones utilizando [<sup>3</sup>H]RTX como radioligando y médula espinal de rata como tejido.

Las membranas son homogeneizadas en tampón HEPES (HEPES 10 mM, KCl 5 mM, NaCl 5,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, sacarosa 320 mM y pH = 7,4) y se centrifugan a 1000g durante diez minutos a 4 °C. El sobrenadante se desprecia y el sedimento se centrifuga nuevamente a 35000g durante treinta minutos a 4 °C. El sedimento final así obtenido se resuspende en 10 volúmenes de tampón HEPES.

A continuación, fracciones de membrana de la suspensión final de membranas (1 mg/mL de proteína) se incuban durante 60 minutos a 37 °C con [<sup>3</sup>H]RTX 25 pM en presencia o ausencia de un intervalo de concentraciones (10<sup>-5</sup>-10<sup>-10</sup> M) del compuesto objeto de estudio en un volumen final de 0,5 mL de tampón de incubación (HEPES 10 mM, KCl 5 mM, NaCl 5,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, sacarosa 320 mM y BSA libre de ácidos grasos 0,25 mg/mL, pH = 7,4). La unión no específica se determina con RTX 1 μM.

La reacción se detiene por enfriamiento en baño de hielo de la mezcla de reacción. A continuación se añaden 100 μg de α<sub>1</sub>-glicoproteína ácida bovina disueltos en 50 μL de tampón, con objeto de minimizar la unión inespecífica. El ligando radiactivo unido se separa del libre por centrifugación. Para ello, las muestras se centrifugan durante 15 minutos a 20000 r.p.m. y a 4 °C. El sobrenadante se retira por aspiración, y, tras secar cuidadosamente el sedimento, el extremo del tubo eppendorf se corta con una cuchilla, se le adicionan 4 mL de líquido de centelleo y se mide la radiactividad unida a las membranas mediante espectrometría de centelleo líquido.

La unión específica de los compuestos se calcula como la diferencia entre la unión en ausencia y en presencia de RTX.

---

<sup>235</sup> Véase nota 205.

### 5.3. RECAPTACIÓN DE ANANDAMIDA EN NEURONAS FAAH<sup>+/+</sup> Y FAAH<sup>-/-</sup>

Los reactivos empleados se adquirieron en Sigma, Roche, Amersham o Gibco (cultivos celulares). La anandamida se sintetizó siguiendo procedimientos estándar,<sup>236</sup> el antagonista SR141716A fue suministrado por el NIDA (National Institute on Drug Abuse, USA) y la [<sup>3</sup>H]AEA fue adquirida en Moravec Biochemicals, Inc., CA, USA, (200 c/mmol).

#### 5.3.1. Cultivos neuronales

Los cultivos neuronales se obtuvieron por disección de la zona cortical del cerebro de embriones de ratón (E-15) FAAH<sup>+/+</sup> y FAAH<sup>-/-</sup> (C57BL/6), generados de acuerdo al procedimiento descrito por Cravatt *et al.*<sup>237</sup>

Una vez disociadas, las neuronas corticales se siembran en placas de cultivo de seis pocillos pretratadas con poli-D-lisina y laminina y se cultivan en medio Eagles' MEM suplementado con suero fetal bovino (5%), suero de caballo (5%), glutamina 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2 g/L y glucosa 20 mM. Las células se mantienen a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y se utilizan tras 5 ó 6 días en cultivo.

#### 5.3.2. Análisis de la expresión de FAAH

La expresión de la enzima FAAH se analiza mediante *western blot*. Las proteínas se obtienen por homogeneizado de tejido cerebral o por lisis de las neuronas en cultivo. El cerebro se homogeneiza en tampón Tris-HCl (50 mM, pH = 7,6). Las lisis de las neuronas se lleva a cabo por incubación, durante cinco minutos a 4 °C, en tampón TBS, pH = 7,6, con glicerol 10%, Nonidet P-40 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e inhibidores de proteasas seguida de sonicación del lisado. Los extractos celulares se centrifugan en una microfuga a 4 °C durante 15 minutos (15000 r.p.m.) obteniéndose así

---

<sup>236</sup> Véase nota 49(a).

<sup>237</sup> Véase nota 122.

los sobrenadantes con las proteínas. A continuación se determina la concentración de proteína y se resuelven cantidades iguales de proteína total (100 µg) mediante electroforesis desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa llevándose a cabo un análisis estándar mediante *western blot*. Así, tras bloquear los sitios de unión inespecífica con TBS con Tween-20 al 0,1% y leche en polvo al 3% durante una hora a temperatura ambiente, la membrana se incuba durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal obtenido en conejo frente a FAAH<sup>238</sup> (dilución 1:500). A continuación la membrana se lava exhaustivamente con TBS con Tween-20 al 0,1% y a continuación se incuba durante una hora a temperatura ambiente en presencia del correspondiente anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, BioRad, Hercules, CA, USA, dilución 1:5000). Por último, y tras lavar la membrana con TBS con Tween-20 al 0,1%, se revela la peroxidasa mediante quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones del fabricante (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

### 5.3.3. Determinación de la capacidad inhibitoria sobre la recaptación de anandamida

La incorporación de anandamida en las neuronas se realizó basándonos en el protocolo descrito por Beltramo *et al.*<sup>239</sup>

Las neuronas se incuban en medio DMEM en presencia de una mezcla de anandamida radiactiva (0,45 nM) y fría, a una concentración final de 100 nM en presencia o ausencia de distintas concentraciones de BSA libre de ácidos grasos, UCM707 y SR141716A tal y como se indica en los experimentos respectivos.

La acumulación de anandamida se detiene por enfriamiento de las placas de cultivo en baño de hielo y aspiración rápida del medio. Las células se lavan tres

veces con 1,5 mL de tampón Krebs-HEPES, pH = 7,4 (NaCl 118 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,3 mM, NaHCO<sub>3</sub> 20 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,4 mM, KCl 4,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1 mM, EDTANA<sub>2</sub> 3,98 µM, ácido ascórbico 110 µM, glucosa 11,1 mM y HepesNa 10 mM) con 1% BSA. A continuación los lípidos se extraen con metanol y la radiactividad presente en los extractos celulares se determina mediante conteo de centelleo líquido.

En el caso del inhibidor UCM707 y del antagonista SR141716A, las células se preincuban durante diez minutos en presencia de estos compuestos y después se realiza el experimento en la forma anteriormente descrita.

La recaptación celular de anandamida se calcula como la diferencia entre la acumulación total y la inespecífica, determinada con experimentos control realizados en paralelo empleando placas de cultivo sin células.

El porcentaje de recaptación, tomando como 100% la radiactividad retenida en ausencia de inhibidor, se ajusta mediante regresión no lineal a una curva sigmoidea obtenida con el programa Prism (GraphPad), calculándose así el valor de CI<sub>50</sub> correspondiente.

Los datos representan la media y desviaciones estándar obtenidas a partir de un mínimo de dos experimentos independientes realizados en duplicado.

### 5.4. MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE DEL VIRUS DE THEILER

Los reactivos y materiales comunes empleados se adquirieron en Sigma, Tocris, Roche, Amersham o Invitrogen (cultivos celulares). Los antagonistas SR141716A y SR144528 fueron suministrados por Sanofi Recherche (Montpellier, Francia). La manipulación de los animales se lleva a cabo bajo la normativa de la Unión Europea 86/609/EEC.

<sup>238</sup> Véase nota 122.

<sup>239</sup> Véase nota 48(a).

#### 5.4.1. Animales e inoculación del virus

Se emplearon ratones hembras SJL/L susceptibles a la infección del virus y por tanto al desarrollo de la enfermedad desmielinizante inducida por éste.

Los animales de experimentación se mantienen en condiciones controladas de luz (fotoperíodo de doce horas) y temperatura y con acceso libre a comida y agua.

Los ratones son infectados con el virus a las cuatro semanas de edad. La inoculación ( $10^6$  unidades formadoras de placas de la cepa BeAn del virus de Theiler disueltos en  $30 \mu\text{L}$  de medio DMEM suplementado con un 5% de suero fetal de ternera) se realiza mediante inyección intracraneal en el hemisferio derecho.<sup>240</sup>

#### 5.4.2. Evaluación de la funcionalidad motora

Noventa días después de la inoculación del virus, se evalúa la disfunción neurológica de los animales mediante un aparato rotarod (Ugo Basile, Comerio, Italia). Todos los animales fueron sometidos a un período previo de familiarización con el aparato a velocidad constante antes de la realización de los experimentos. Éstos se realizaron a aceleración constante un día antes del inicio del tratamiento y un día después, finalizándose el experimento cuando el ratón no era capaz de sostenerse sobre el rodillo giratorio o tras un intervalo máximo de cinco minutos.

La evaluación de la actividad motora (en concreto los parámetros de actividad horizontal y vertical) de los animales se llevó a cabo en dos intervalos consecutivos de cinco minutos utilizando el sistema de registro Activity Monitor System (Omnitech Electronics, Columbus, OH). Los datos recogidos son representativos de los diez minutos en conjunto, ya que no se observaron variaciones significativas en el comportamiento de los animales en los intervalos considerados por separado.

Los datos corresponden a las medias y desviaciones estándar obtenidas para 14 ratones por

grupo (antes del tratamiento) y 7 ratones por grupo (después del tratamiento). El análisis estadístico de los datos se lleva a cabo mediante la utilización del criterio de la *t* de Student.

#### 5.4.3. Tratamiento

Los ratones fueron clasificados en cuatro grupos de siete ratones cada uno, dos de estos grupos habían sido infectados con el virus de Theiler mientras que los otros dos fueron empleados como control. Uno de los grupos control y otro de los grupos infectados recibieron una dosis diaria de 5 mg/Kg de UCM707 administrada por inyección intraperitoneal durante doce días, mientras que los restantes animales recibieron únicamente vehículo (Tween 80:PBS, 1:14) en las mismas condiciones.

Tras finalizar el tratamiento, se evaluó la actividad motora vertical y horizontal así como las disfunciones neurológicas mediante el rotarod en todos los animales. A continuación éstos fueron sacrificados para analizar histológicamente el estado de su médula espinal.

#### 5.4.4. Histología

Los ratones fueron sacrificados por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso) seguida de perfusión transcardíaca con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M (pH = 7,4).

Las médulas espinales fueron extraídas y mantenidas en esta misma disolución durante cuatro horas a 4 °C y, tras tres lavados de una hora en PB, se crioprotegen por inmersión a 4 °C durante dos días en una disolución de sacarosa al 30% en PB 0,1 M. A continuación, las médulas se dividen en segmentos representativos de las distintas zonas (cervical, torácica y lumbar) y se hacen secciones transversales de cada una de ellas de aproximadamente un milímetro de grosor. Estos fragmentos se embeben en Tissue-Tec y se conservan a -20 °C. Posteriormente se cortan en secciones transversales de 35  $\mu\text{M}$  con un criostato (Leica

<sup>240</sup> Véase 181(e).

CM1900) a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las secciones así obtenidas se mantienen a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en disolución crioprotectora de Olmos (sacarosa 30%, polivinilpirrolidona 1% y etilenglicol 30% en PB 0,01 M) hasta el momento de su utilización.

Los cortes empleados para inmunohistoquímica de fluorescencia se procesan siguiendo el procedimiento detallado a continuación. Las secciones se extraen de la disolución de Olmos y se lavan tres veces durante cinco minutos en tampón TBS y otras tres veces de diez minutos cada una en tampón TBS con Tritón X-100 al 0,1% (TBS-T). A continuación se bloquean las uniones inespecíficas por incubación en tampón de bloqueo (TBS-T con un 5% de suero de la misma especie que de la que proceda el anticuerpo secundario correspondiente) durante treinta minutos a temperatura ambiente. Después las secciones se incuban con el anticuerpo primario, se lavan tres veces con TBS-T durante cinco minutos cada una, se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (a partir de este punto el resto del procedimiento se realiza protegiendo las secciones de la luz), se lavan nuevamente tres veces durante diez minutos con TBS-T y se montan sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Finalmente se recubren con medio de montaje para microscopía de fluorescencia (Shandon, Pittsburg, USA) y se recubren con un cubreobjetos. Las preparaciones se conservan a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y protegidas de la luz hasta el momento de su análisis utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert (Oberkochen, Alemania).

Las imágenes han sido obtenidas por microscopía confocal con la intensidad del haz de láser y la sensibilidad del fotodetector constantes y corresponden a imágenes representativas de los resultados obtenidos en ratones infectados con el TMEV tras los doce días de administración de vehículo o de UCM707.

En el caso de la inmunohistoquímica utilizando la reacción de la peroxidasa, las secciones se procesan como se indica a continuación. Los cortes se sacan de la disolución de Olmos y se lavan cuatro veces durante diez

minutos cada una en PB 0,1 M con Tritón X-100 0,1% y  $\text{pH} = 7,4$ . A continuación se inhibe la peroxidasa endógena por incubación de las secciones en metanol con un 2% de peróxido de hidrógeno durante veinte minutos a temperatura ambiente. Los cortes se someten a un lavado en PB 0,1 M ( $\text{pH} = 7,4$ ) durante diez minutos seguido de otros tres lavados de diez minutos cada uno en PB 0,1 M con Tritón X-100 al 0,1%. Seguidamente se incuban con la lectina de tomate conjugada con biotina (Sigma) a una dilución 1:200 en PB 0,1 M con 0,5% de Tritón X-100 durante cuarenta y ocho horas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los cortes se lavan dos veces durante diez minutos en PB 0,1 M con 0,2% de Tritón X-100 y se incuban con avidina conjugada con peroxidasa (Sigma, dilución 1:800) en PB 0,1 M y 0,2% de Tritón X-100 durante dos horas a temperatura ambiente. Después, las secciones se lavan primero en PBS, dos veces durante diez minutos cada una, y luego en PB 0,1 M durante diez minutos más. La unión del anticuerpo se revela en presencia de clorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por incubación (durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente) en una disolución de 50 mg de DAB y  $33\text{ }\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno en 100 mL de PB 0,1 M. Las secciones se lavan en PB 0,1 M, dos veces, durante diez minutos cada una, y luego otra vez más durante diez minutos con agua destilada. A continuación las secciones se montan en portaobjetos, se tiñen con azul de toluidina durante veinte minutos a temperatura ambiente para mejorar el contraste y se deshidratan y diferencian por lavados secuenciales de cinco minutos cada uno de ellos en disoluciones de etanol de concentraciones crecientes (desde etanol al 30% hasta etanol al 100%). Finalmente, se aclaran en xileno con dos lavados de cinco minutos cada uno, se montan en DPX y se recubren con un cubreobjetos.

En todos los casos se realizaron controles negativos de los análisis inmunohistoquímicos utilizando procedimientos idénticos pero omitiendo los anticuerpos primarios.



#### 5.4.5. Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos de fluorescencia

En los análisis inmunohistoquímicos de fluorescencia se emplearon los siguientes anticuerpos en las condiciones que se detallan a continuación. Como anticuerpos primarios se utilizaron el anticuerpo marcador de microglía anti-CD11b de ratón (Mac-1, Serotec, Oxford, UK, dilución 1:250, incubación durante veinticuatro horas a 4 °C) y el anticuerpo anti 2-A para el estudio de la expresión de moléculas MHC de clase II (Serotec, dilución 1:150, incubación durante veinticuatro horas a 4 °C). La unión de estos anticuerpos se visualizó mediante incubación (dos horas a temperatura ambiente, dilución 1:1000) con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con los fluoróforos Alexa-488 o Alexa-594 (Molecular Probes, Eugene, OR).

#### 5.4.6. Cultivos de microglía e inmunocitoquímica

Los cultivos de microglía se obtuvieron por disección de cerebros de ratas Wistar (P0-1) siguiendo el protocolo descrito por Molina-Holgado *et al.*<sup>241</sup>

Una vez disociado mecánicamente, el homogeneizado se filtra a través de una malla de nylon de 150 µm y las células se siembran en frascos de 75 cm<sup>2</sup> pretratados con poli-D-lisina y se cultivan en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino previamente inactivado por calor (10%), manteniéndose a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras diez días en cultivo los frascos se agitan a 37 °C durante dos horas a 225 r.p.m. subcultivándose la microglía desprendida.

Para el análisis inmunocitoquímico, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio y fijadas en paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M (pH = 7,4) durante veinte minutos a temperatura ambiente. A continuación, tras lavar dos veces (cinco minutos cada una) los cubreobjetos en PB 0,1 M, pH = 7,4, éstos se incuban durante doce horas a 4 °C en presencia del anticuerpo

OX-42 (Serotec, dilución 1:150 en PB con 5% suero y 0,1% de Tritón X-100). Posteriormente, los cubreobjetos se lavan con PB dos veces (cinco minutos cada una) y se incuban con el anticuerpo secundario fluorescente (Molecular Probes) durante dos horas a temperatura ambiente y a una dilución 1:1000 en PB con 5% suero y 0,1% de Tritón X-100. Los núcleos se tiñen por incubación en presencia de bis-bencimida (Hoechst 33258; 1 µg/mL) durante quince minutos a temperatura ambiente. Por último, tras dos lavados de cinco minutos cada uno en PB y una rápida inmersión en agua destilada, los cubreobjetos se montan utilizando medio de montaje para microscopía de fluorescencia sobre portaobjetos de vidrio. Una vez secas, las preparaciones se conservan a 4 °C y protegidas de la luz y se analizan utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert (Oberkochen, Alemania).

#### 5.4.7. Determinación de los niveles de NO y de IL-1β e IL-6

Los niveles de NO presentes se valoran en forma de nitritos totales empleando el método de Griess.<sup>242</sup> Para ello, a una alícuota de 100 µL de medio de cultivo tomada en las condiciones de interés se le añaden 100 µL del reactivo de Griess (solución de ácido fosfórico al 5% con sulfanilamida al 1% y dihidrocloruro de (1-naftil)etilendiamina al 0,1%), se incuba en oscuridad durante diez minutos y la reacción colorimétrica se cuantifica midiendo la absorbancia a 550 nm. Estos valores son interpolados en una recta de calibrado previamente realizada a partir de soluciones estándar de nitrito sódico en medio de cultivo para determinar las concentraciones de nitritos presentes bajo las condiciones experimentales analizadas.

Los niveles de IL-1β y de IL-6 se cuantifican mediante el empleo de enzoinmunoensayos (ELISA)

<sup>241</sup> Molina-Holgado, E.; Vela, J. M.; Arévalo-Martín, A.; Almazán, G.; Molina-Holgado, F.; Borrell, J.; Guaza, C. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 9742.

<sup>242</sup> Véase nota 227.

comerciales (Genzyme, Cambridge, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5.4.8. Análisis de la expresión de proteínas: inmunodetección de proteínas transferidas a membranas

La expresión de las proteínas iNOS y  $\alpha$ -tubulina se analiza mediante *western blot*. Las proteínas se obtienen mediante lisis de las células microgliales en cultivo. Para ello se aspira el medio de cultivo, las células se lavan con PBS a 4 °C y se lisan por incubación, durante cinco minutos a 4 °C, en tampón Tris (TBS), pH = 7,6, con glicerol 10%, Nonidet P-40 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e inhibidores de proteasas. El lisado se homogeneiza por sonicación centrifugándose a continuación en una microfuga a 4 °C durante 15 minutos (15000 r.p.m.) obteniéndose así los sobrenadantes con las proteínas. A continuación se determina la concentración de proteína y se resuelven cantidades iguales de proteína total (30  $\mu$ g) mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Pharmacia Biotech) llevándose a cabo un análisis estándar mediante *western blot*.<sup>243</sup> Tras bloquear los sitios de unión inespecífica con TBS con Tween-20 al 0,1% y leche en

polvo al 5% durante una hora a temperatura ambiente, la membrana se incuba durante doce horas a 4 °C con el anticuerpo primario de interés y a continuación con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente, ambos disueltos en tampón de bloqueo. Por último, tras lavar exhaustivamente la membrana en TBS con Tween-20 al 0,1%, la peroxidasa se revela mediante quimioluminiscencia (ECL, Amershan Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las membranas se expusieron a los distintos anticuerpos primarios de forma secuencial tras eliminación (*stripping*) del complejo antígeno-anticuerpo anterior mediante incubación de las membranas en una solución de Tris-HCl 62,5 mM, pH = 6,8, con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 7%, durante treinta minutos en baño de agua a 70 °C.

Los anticuerpos primarios empleados han sido obtenidos en ratón frente a iNOS (BD Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA) o frente a  $\alpha$ -tubulina (Sigma) y empleados a diluciones de 1:2500 y 1:30000, respectivamente. Como anticuerpo secundario se ha utilizado en ambos casos un anticuerpo de cabra frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa (BioRad) a una dilución de 1:8000 y 1:10000, respectivamente.

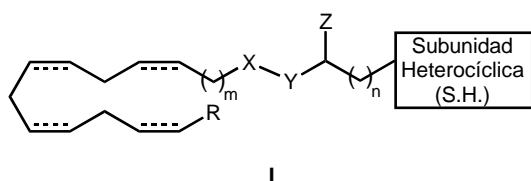
---

<sup>243</sup> Véase nota 241.



## 6. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos derivados de ácido graso de estructura general I.



2. Mediante experimentos in vitro se ha determinado la capacidad de los compuestos sintetizados para inhibir la recaptación de anandamida así como su selectividad frente a los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, la enzima FAAH y los receptores de vanilloides VR<sub>1</sub>. La mayoría de los compuestos sintetizados han sido caracterizados como potentes inhibidores de la recaptación de anandamida (CI<sub>50</sub> = 0,8 – 25 μM) resultando además selectivos frente al resto de proteínas analizadas (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, FAAH, VR<sub>1</sub>).

3. El análisis cualitativo de relación estructura-actividad ha permitido profundizar en los requerimientos estructurales necesarios para una interacción óptima con el proceso de recaptación de anandamida. Este estudio ha culminado en la identificación de la (5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(fur-3-ilmetil)icosa-5,8,11,14-tetraenamida **7** (UCM707) como el inhibidor más potente de la recaptación de anandamida (CI<sub>50</sub> = 0,8 μM) descrito hasta la fecha. Junto con su elevada potencia, el hecho de que el UCM707 exhiba una gran selectividad respecto al resto de proteínas analizadas, especialmente frente a la enzima FAAH (CI<sub>50</sub> = 30 μM), completa el prometedor perfil in vitro de este compuesto, haciendo de él una valiosa herramienta para estudiar en mayor profundidad el proceso de recaptación de anandamida y evaluar su aplicabilidad terapéutica.

4. El empleo del UCM707 en preparaciones carentes de FAAH ha permitido estudiar la contribución de esta enzima al proceso de recaptación de anandamida. Este proceso constituye un fenómeno complejo en el que intervienen distintas proteínas y también, aunque en menor extensión, la difusión simple a través de la membrana. Dentro del componente proteico, aunque existe contribución de algunas de las proteínas constituyentes del SCE, tales como CB<sub>1</sub> y FAAH, destaca la existencia de una entidad proteica independiente de éstas que es sensible al UCM707 y es responsable de aproximadamente el 50% de la internalización de anandamida y que podría corresponder a una proteína citosólica transportadora de lípidos.

5. El UCM707 produce importantes beneficios terapéuticos en la esclerosis múltiple, empleando como modelo de esta patología la enfermedad desmielinizante inducida por infección con el virus de Theiler. La administración de UCM707 mejora significativamente las disfunciones motoras características de la progresión de la enfermedad, potenciando la movilidad, la coordinación y el equilibrio. Estos efectos se deben a la disminución que el UCM707 ejerce sobre la reactividad microglial y la expresión de los antígenos MHC de clase II junto con el resto de los factores proinflamatorios producidos por las células microgliales (síntesis de NO, expresión de iNOS e interleuquinas IL-1β e IL-6), todos ellos reducidos significativamente en presencia de este compuesto. Además, el UCM707 es capaz de potenciar los efectos de una dosis subefectiva de anandamida, lo que indica la capacidad de este compuesto para aumentar el tono cannabinoide endógeno. En conjunto, estos resultados confirman la inhibición de la recaptación de anandamida como un objetivo de interés para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la prometedora aplicabilidad de este tipo de agonistas indirectos como posibles fármacos de nueva generación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que aún en la actualidad adolecen de terapias adecuadas y realmente efectivas a largo plazo.