

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**NUEVAS APORTACIONES AL ESTUDIO DE LOS
CANNABINOIDES:
1) EFECTOS VASCULARES
2) CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS**

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

María Teresa Dannert Alsasua

Bajo la dirección de las Doctoras:

Ángela Alsasua del Valle
María Isabel Martín Fontelles

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2603-8

A mi Beli

A Julián

A mi Familia

En estas páginas quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a la conclusión de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Angela Alsasua, directora de esta tesis doctoral, el haberme abierto la puerta del mundo de la investigación y por haber sido, no solo una gran directora, sino una gran amiga. Durante estos cuatro años hemos pasado buenos y malos momentos pero siempre contando la una con la otra. Gracias por haber estado siempre ahí.

Quiero agradecer a la Dra. Maria Isabel Martín Fontelles por haber co-dirigido esta tesis doctoral, por toda la ayuda y el tiempo que me ha dedicado y por no perder nunca el sentido del humor. Además quiero agradecer a todo el equipo de la Universidad Rey Juan Carlos: Raquel Abalo, Carlos Goicoechea, David Pascual, Eva Maria Sánchez, Rocío Girón, Gema Vera, Antonio José Rivera y, en especial, a Esperanza Herradón y a la Dra. Visitación López-Miranda por ser el mejor equipo de trabajo, y a Margarita Suardíaz García por haber sido además de una gran compañera, una amiga, con la que siempre he podido contar, muchas gracias.

Agradecer también a mis compañeros de la Universidad Complutense Maria José Borrego y Pablo Reina por haber sufrido y reído conmigo día tras día en el laboratorio y por las horas de conversaciones en las que intentamos arreglar el mundo.

Al equipo de química médica del CSIC dirigido por el Dr. Elguero y la Dra. Pilar Goya responsables de la síntesis de nuestros productos LHs, a Nadine Jagerovich, Laura Hernandez, Cristina Cano y al resto del equipo por toda su colaboración.

A la directora del animalario, la Dra. Pilar Bringas, y a todo el personal del mismo, por la labor prestada.

A la secretaria del departamento Maria Elena Vicente, por todos los papeleos.

A los técnicos Maria Luisa, Manolo y Fernando por su trabajo y por ser tan atentos siempre.

Quiero agradecer a toda mi familia, a mis padres por haber confiado siempre en mí y por haberme querido siempre incondicionalmente, sin ellos nunca habría podido realizar esta tesis doctoral. A mis hermanos, Ana y Jorge, por haberme aguantado todo este tiempo y a Ana además por haberme ayudado con "Vord", gracias por haberte preocupado tanto. A mis tías, Tita y Pilu, por estar ahí para tranquilizarme y animarme, y por mantenernos siempre unidos, y a mi Oma. Sois la mejor familia que se puede tener.

En especial me gustaría agradecer a toda la familia Ruperez-Arroyo, Consuelo, Maripi, Juanjo, Nena, Juanan, Seve, Yeye y Marta del Hierro por todo el apoyo y cariño que me han dado en estos últimos diez años, por haberme hecho sentir como una más de la familia, muchas gracias.

Agradecer sobre todo a la persona que más me ha ayudado, querido, apoyado, que me ha hecho la persona más feliz del mundo, que siempre me ha animado a seguir y me ha obligado cuando ya había tirado la toalla, Julián, sin ti nunca habría podido llegar hasta aquí, gracias por todo.

Quiero agradecer su apoyo a todos mis amigos, Paqui, Rafa, Isabel, Carlos, Arturo, Iñaki, Ricardo, Rosa, Tati y en especial a Carmen María Álvarez Sancho, su amistad ha sido para mí un salvavidas en muchas ocasiones y nunca me ha fallado. Gracia Mary.

Por último querría dar las gracias a mi abuela, Beli, porque aunque no ha estado aquí para animarme yo sé que estaría muy orgullosa de esta tesis doctoral.

INTRODUCCIÓN	1
1 HISTORIA.....	1
2 SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO	6
2.1 RECEPTORES.....	6
2.1.1 Receptores cannabinoides	6
2.1.2 Receptores vanilloides.....	10
2.1.3 Cannabinoides endógenos	13
2.1.4 Síntesis, liberación recaptación y degradación de anandamida.....	15
3 TERMINOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES.....	20
3.1 AGONISTAS CANNABINOIDES	21
3.1.1 Clásicos:	21
3.1.2 No clásicos:	22
3.1.3 Aminoalquilindoles:	23
3.1.4 Eicosanoides:.....	24
3.2 ANTAGONISTAS CANNABINOIDES	25
3.2.1 Diarilpirazoles:.....	25
3.3 INHIBIDORES DE RECAPTACIÓN Y DEGRADACIÓN DE ENDOCANNABINOIDES ..	26
4 EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES.....	28
4.1 EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS.....	28
4.1.1 Sensación dolorosa.....	28
4.1.2 Actividad locomotora.....	30
4.1.3 Emesis	30
4.1.4 Proliferación celular	31
4.1.5 Efectos neuroprotectores	31
4.1.6 Otros efectos.....	32
A Regulación de la ingesta	32
B Presión intraocular	32
C Función inmunológica	33
4.2 EFECTOS ADVERSOS	33
5 POSIBILIDADES DE APLICACIÓN TERAPEÚTICA	35
5.1 ANTIEMÉTICOS:	35
5.2 ANALGESIA:.....	36
5.3 PATOLOGÍAS MOTORAS	36
D Enfermedad de Parkinson.....	36
E Corea de Huntington.....	37
5.4 EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS.....	38
5.5 REGULACIÓN DE LA INGESTA	38
5.6 GLAUCOMA.....	39
6 EFECTOS VASCULARES DE LOS CANNABINOIDES.....	40
6.1 FARMACOLOGÍA VASCULAR	40
6.1.1 Regulación endotelial del tono vascular.....	42
6.1.2 Sustancias vasodilatadoras derivadas del endotelio	42
7 EFECTOS DE CANNABINOIDES SOBRE EL APARATO CARDIOVASCULAR	46
7.1 EFECTOS CARDIOVASCULARES DE LOS ENDOCANNABINOIDES.....	46
7.2 EFECTOS EN HUMANOS	50
7.3 EFECTOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	51
I EFECTOS <i>IN VIVO</i>	51
II EFECTOS <i>IN VITRO</i>	53
III EFECTOS EN CULTIVOS CELULARES.....	55
8 REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES DE LOS ANÁLOGOS DE CANNABINOIDES SINTÉTICOS.....	56
8.1 DISEÑO DE NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE TRIAZOLES (LHs).....	57
9 ENSAYOS CON CANNABINOIDES	58
9.1 ENSAYOS " <i>IN VIVO</i> ".....	59
9.2 ENSAYOS " <i>IN VITRO</i> "	60

OBJETIVOS	61
ESTUDIAR EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS CANNABINOIDES SOBRE AORTA AISLADA DE RATA.....	61
VALORACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CANNABINOIDE.....	61
MATERIAL Y MÉTODOS	62
1.1 MATERIAL	62
1.1.1 Fármacos y reactivos utilizados.....	62
1.1.2 Preparación de la Solución Fisiológica de Krebs	64
1.1.3 Disolución de los fármacos	65
A Disolución de cannabinoides.....	65
B Disolución de antagonistas.....	65
1.2 APARATOS.....	66
1.2.1 Baño de órganos y sistema de registro de contractilidad vascular	66
1.2.2 Sistema de registro de contractilidad vascular	66
1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	66
1.4 MÉTODOS	68
1.4.1 Obtención de las preparaciones.....	68
A Aislamiento de anillos de aorta de rata.....	68
1.4.2 Protocolo experimental	68
A Preparaciones de aorta de rata.....	68
2.1 ENSAYOS IN VITRO : CONDUCTO DEFERENTE DE RATÓN	71
2.1.1 Material	71
A Fármacos y reactivos utilizados.....	71
I Disolución de los Fármacos Cannabinoides	72
B Aparatos	73
I Baño de órganos	73
C Animales de experimentación	73
2.1.2 Métodos.....	73
A Obtención de las preparaciones.....	73
I Aislamiento de la preparación conducto deferente de ratón.....	73
II Montaje de las preparaciones.....	74
B Protocolo experimental	75
I Valoración de la actividad farmacológica de los nuevos compuestos	75
2.2 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA (IN VIVO).....	78
2.2.1 Material	78
A Fármacos y reactivos utilizados.....	78
B Condiciones experimentales.....	78
2.2.2 Métodos.....	79
A Tétrada.....	79
I TEMPERATURA:	79
II NOCICEPCIÓN:	79
III CATALEPSIA:	80
IV ACTIVIDAD LOCOMOTORA:.....	80
B Protocolo experimental	81

DISCUSIÓN.....	84
ESTUDIO DE LOS EFECTOS PARCIALMENTE DE LOS CANNABINOIDES.....	84
RESULTADOS.....	83
1 MECANISMO DE ACCIÓN VASODILATADOR DE R(+)-METANANDAMIDA Y WIN 55,212-2 EN ANILLOS DE ARTERIA AORTA DE RATA.....	83
1.1 Efecto de DMSO 0.5%.....	83
1.2 Efecto de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 sobre arteria aorta de rata precontraída con fenilefrina.....	83
1.3 Efecto de toxina pertussis.....	87
1.4 Efecto de L-NAME.....	88
1.5 Efecto de INDOMETACINA.....	89
1.6 Efecto de SR141716A, SR144528 y ambos asociados en bolo.....	90
1.7 Efecto de capsazepina.....	92
1.8 Efecto de la desensibilización con capsaicina.....	93
1.9 Efecto de CGRP 8-37.....	94
1.10 Efecto de charibdotoxina y apamina.....	95
1.11 Efecto de PMSF.....	96
1.12 Efecto de AM404.....	98
1.13 Efecto de 17-ODYA.....	99
2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS NUEVOS COMPUESTOS SOBRE LA PREPARACION DE CONDUCTO DEFERENTE DE RATON.....	100
2.1 Efecto de Win 55,212-2.....	101
2.2 Efecto inhibitorio de AM251.....	102
2.3 Efecto inhibitorio de SR141716A.....	102
2.4 Efecto inhibitorio de LH1.11.....	103
2.5 Efecto inhibitorio de LH1.20.....	103
2.6 Efecto inhibitorio de LH1.21.....	104
2.7 Efecto de anandamida.....	105
2.8 Efecto inhibitorio de AM251.....	106
2.9 Efecto inhibitorio de SR141716A.....	106
2.10 Efecto inhibitorio de LH1.11.....	107
2.11 Efecto inhibitorio de LH1.20.....	107
2.12 Efecto inhibitorio de LH1.21.....	108
3 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA (IN VIVO).....	109
3.1 Efecto de agonistas y antagonistas cannabinoideos sobre la temperatura corporal del ratón.....	110
3.2 Efecto de agonistas y antagonistas cannabinoideos sobre la actividad locomotora.....	111
3.3 Catalepsia producida por agonistas y antagonistas cannabinoideos.....	112
3.4 Analgesia producida por agonistas y antagonistas cannabinoideos.....	113

DISCUSIÓN	114
1 ESTUDIO DE LOS EFECTOS VASCULARES DE LOS CANNABINOIDES.	114
1.1 MECANISMOS	116
1.1.1 <i>Dependencia del endotelio</i>	116
1.1.2 <i>Mecanismos mediados por receptores</i>	118
A Efecto de los antagonistas de receptores cannabinoides.....	119
B Efecto del bloqueo de receptores vanilloides	122
1.1.3 <i>Mecanismos intracelulares</i>	124
A Mecanismos mediados por NO	125
B Inhibición del metabolismo de R(+)-metanandamida	125
I Inhibición de la FAAH:.....	126
II Inhibición de COX	127
III Inhibición del CYP450:.....	128
C Mecanismos mediados por EDHF.....	128
D Inhibición del transporte de anandamida por AM404:.....	129
2 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE NUEVAS MOLÉCULAS DE NATURALEZA CANNABINOIDE.	131
2.1 ENSAYOS " <i>IN VITRO</i> "	132
2.2 ENSAYOS " <i>IN VIVO</i> "	134
CONCLUSIONES	135
1 Efectos vasculares de R(+)-metanandamida y Win 55,212-2	135
2 Caracterización Farmacológica de nuevos Cannabinoides	136
BIBLIOGRAFÍA	137

- Ach: Acetilcolina
- AEA: Anandamida
- AMPc: Adenil monofosfato cíclico
- ANOVA: Análisis de la varianza
- ANUC: Animalario de la Universidad Complutense
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ATP: Adenin trifosfato
- CB1: Receptor de Cannabinoides 1
- CB2: Receptor de Cannabinoides 2
- CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- EEM: Error estándar de la media
- ED₅₀: Dosis eficaz 50
- EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
- FAAH: Amidohidrolasa de ácido grasos
- GMPc: Guanosin monofosfato cíclico
- HETE: ácidos hidroxi-epoxi-eicosa-tri-enoicos .
- Hz: Herzio
- IQM: Instituto de Química Médica
- L-NAME: N-nitro-L-arginina metil ester
- M: Molar
- MAPK: protein-kinasas activadas por mitógenos
- NAPE: N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina
- NKA: Neurokinina A
- NO: Óxido Nítrico
- PIO: Presión intraocular
- PLC: Fosfolipasa C
- PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoride
- SNC: Sistema Nervioso Central
- SNP: Sistema Nervioso Periférico
- VR₁: Receptor vanilloide 1
- Δ^9 Tetrahidrocannabinol: Δ^9 THC
- 2AG: 2-araquidonilglicerol

INTRODUCCIÓN

1 HISTORIA

El origen de la planta *Cannabis sativa*, cuyos componentes se denominan **cannabinoides**, se sitúa por algunos autores en el Asia Central. La utilización de los preparados de esta planta a lo largo de la historia ha presentado aspectos muy variables.

El *Cannabis* tiene una larga historia médica que va desde su uso empírico y/o anecdótico en la antigüedad, hasta las prescripciones médicas del siglo XIX y principios del XX. En la actualidad hay una gran controversia sobre su utilidad clínica, y generalmente el uso que se hace de los derivados de la planta es ilícito o empleado como automedicación.

Uno de los principales inconvenientes de su uso son los efectos psíquicos que producen y que fueron utilizados en ocasiones como complemento en prácticas religiosas, o simplemente para la búsqueda de placer. A lo largo del tiempo, los cannabinoides han pasado por etapas de uso generalizado, por otras de un uso más restringido o incluso por largas etapas de prohibición.

La *Cannabis sativa* fue utilizada en China hace unos cinco mil años. Su cultivo en este país estuvo generalmente relacionado con la obtención de fibra de tallos y hojas, así como del aceite de sus semillas. Existen diversos escritos, procedentes de aquella época, en los que se indica la relación que tuvo esta planta con la medicina en aquel país. En estos libros, el Cannabis era recomendado para tratar la malaria, el beri-beri, el estreñimiento o las alteraciones menstruales. Sin embargo, también se indicaba que la ingestión excesiva de los frutos del cañamo podía producir “visiones diabólicas”.

En la India la planta es descrita como una hierba sagrada. Es de destacar el grado de conocimiento que alcanzaron los hindúes sobre las propiedades curativas de los componentes de la *Cannabis sativa*. Las drogas derivadas del cannabis fueron usadas como tónico general y en el tratamiento de calambres, convulsiones infantiles, para calmar el dolor (especialmente de cabeza entre los que se incluye la migraña), histeria, neuralgia, ciática, tétanos, fiebre, para aliviar la fatiga, actuar como diurético, reducir el *delirium tremens*, disminuir la hinchazón de los testículos o actuar como afrodisiaco. El uso del *Cannabis* se extendió desde la India a Persia y Asiria ocho siglos antes de Cristo, y existen evidencias de que su uso tanto médico como religioso fue considerable.

En el antiguo Egipto, aunque algunos autores consideran que el *Cannabis* no era conocido, otros han indicado su utilización en el incienso y como medicina administrada por vía oral.

Sin embargo, aunque tanto los griegos como los romanos cultivaron el cañamo por su fibra, que era utilizada para la fabricación de cuerdas y de velas, los textos clásicos no contienen ningún dato significativo sobre sus efectos farmacológicos.

Al principio de la era cristiana se indican sus usos medicinales. Varios autores, como Plinio “el viejo” y Dioscórides, describieron su uso en sus obras, “*Nature historiarum Libri XXXVII*” y “*De Materia Médica*” respectivamente.

En relación con el Islam, el profeta Mahoma, que había prohibido el vino, no dijo nada sobre los derivados de *Cannabis*, lo que permitió la expansión de su consumo en los territorios conquistados desde Persia hasta la península Ibérica. “Hashish”, que significa hierba en árabe, fue el nombre utilizado para designar al extracto resinoso de esas variedades.

En el siglo XIX aparecen los primeros datos contrastados sobre el *Cannabis*. Su uso se popularizó en Gran Bretaña por sus propiedades curativas. El divulgador de su aplicación terapéutica fue O'Shaughnessy que había residido en la India como médico del ejército colonial inglés. Sus estudios facilitaron la incorporación del cañamo hindú a la farmacopea inglesa y posteriormente, aunque en menor extensión a la de los Estados Unidos. Los médicos norteamericanos imitaron a sus colegas ingleses en la prescripción de *Cannabis* en el tratamiento de diversas enfermedades como cólera, epilepsia, convulsiones, coreas, histeria, depresión, demencia, neuralgias, reumatismo, tétanos, gota, calambres menstruales y hemorragia uterina. En el "Index Merck" de 1896 aparecían 6 tipos de preparaciones diferentes que lo contenían.

Durante las primeras décadas del siglo XX empezó a declinar el uso médico de las preparaciones de *Cannabis*. Hacia 1932 fue eliminada de la Farmacopea Británica y diez años después, lo fue de la de los Estados Unidos y posteriormente de la Farmacopea India.

Esto pudo ser debido a que, al no haberse conseguido el aislamiento de los principales componentes, había que usar preparaciones de la planta natural o de sus extractos. Una de las consecuencias de la utilización de este tipo de preparados era el que no siempre se podían obtener resultados clínicos reproducibles, por la gran cantidad de compuestos presentes en la planta, su diferente composición química y sus diversos efectos farmacológicos, así como su rápido deterioro. La controversia sobre sus acciones alucinógenas había eclipsado sus posibles usos médicos (Evans, 1997).

Desde 1971, el uso del *Cannabis* fue controlado por la denominada "Acta de drogas de abuso", que prohibía la utilización médica tanto de la hierba como de sus constituyentes activos, los cannabinoides. A pesar de ello esta especie ha sido ampliamente estudiada hasta la actualidad y se han realizado

importantes avances en el conocimiento de sus compuestos activos y actividad farmacológica.

Los compuestos químicos identificados en la *Cannabis sativa* son más de cuatrocientos. Todos ellos varían en número y en cantidad dependiendo de la variedad cultivada, clima, tipo de suelo, e incluso de la forma en que se haya realizado su cultivo. Aproximadamente sesenta de estos compuestos, presentan unas características estructurales comunes y han sido identificados como pertenecientes al grupo de los cannabinoides.

En el año 1964 fue caracterizada la estructura química del principal componente psicoactivo del cannabis, el Δ^9 Tetrahidrocannabinol (Δ^9 THC) por Mechoulam y Gaoni.

Este descubrimiento abrió las puertas a la investigación científica y al desarrollo de derivados con capacidad terapéutica, en los que se trata de separar las propiedades farmacológicas de los efectos psicoactivos.

Transcurrieron casi 30 años hasta la caracterización y clonación de un receptor cerebral para cannabinoides que se denominó CB₁ (Devane y cols., 1988). Tres años más tarde fue clonado un segundo receptor para cannabinoides denominado CB₂, relacionado con el sistema inmune (Munro y cols., 1993). No se puede excluir la existencia de otros subtipos de receptores para cannabinoides que pudieran explicar algunos de los efectos producidos por estos compuestos y para los que todavía no se ha encontrado una explicación a nivel molecular (Pertwee, 1999).

Estos dos receptores se diferencian tanto en su secuencia de aminoácidos como en sus mecanismos de transducción de señales y su distribución tisular.

La existencia de agonistas endógenos de estos receptores se demostró en 1992 y 1995. Estos agonistas que reciben el nombre de **endocannabinoides** son la anandamida (araquidoniletanolamida) (Devane y cols., 1992) y el 2-araquidonilglicerol (Mechoulam y cols., 1995; Stella y cols., 1997). En la actualidad se conocen algunos compuestos más con estas características aunque estos son los mejor estudiados.

La síntesis en 1994 de un antagonista para el receptor CB₁, denominado SR 141716A, (Rinaldi-Carmona y cols.,1995) y para el CB₂, denominado SR 144825 (Rinaldi-Carmona y cols.,1998), abrió una nueva página en la investigación sobre estos receptores.

Aunque la *Cannabis sativa* ha sido utilizada en el siglo XX mas por sus efectos psicotrópicos que los medicinales, sus derivados pueden tener un papel en la medicina moderna, aunque su utilidad está aun sin establecer, pero la evidencia que tenemos hasta el momento sugiere que tanto sus agonistas como sus antagonistas, podrían ser valiosos agentes terapéuticos, particularmente como coadyuvantes, para controlar síntomas para los cuales los fármacos estándar no son completamente efectivos (Ashton, 1999)

2 SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

El sistema cannabinoide endógeno está formado por ligandos endógenos (endocannabinoides) y receptores que median su acción biológica y que están acoplados a mecanismos extra e intracelulares.

Los receptores de cannabinoides caracterizados hasta el momento son dos, CB₁ y CB₂, y los ligandos endógenos son: Araquidoniletanolamida (anandamida) y 2 araquidonilglicerol. Se han descrito otros compuestos endógenos de naturaleza cannabinoide: palmitoiletanolamida, noladin eter, homo- γ -linolenoiletanolamida, docosatetraenoiletanolamida, virodhamina, N-araquidonil-dopamina (NADA) y oleamida (Howlett y cols., 2002; Di Marzo, 2003).

2.1 RECEPTORES

2.1.1 *Receptores cannabinoides*

Los receptores de cannabinoides más conocidos son dos, CB₁ y CB₂, aunque se postula la existencia de un posible nuevo receptor cannabinoide no CB₁/CB₂, cuya caracterización podría explicar algunos de los efectos producidos por estos compuestos (Zygmunt y cols., 1999; Jarai y cols., 1999; Bukoski y cols., 2002; Zygmunt y cols., 2002; Ho, W-s.V y Hiley, 2003; Offertaler y cols., 2003).

El **receptor CB₁** es un polipéptido de 476 aminoácidos que fué caracterizado farmacológicamente utilizando el cannabinoide sintético (-)-CP-55.940. Este receptor media, entre otros, los efectos psicoactivos de los

cannabinoides (Devane y cols., 1988). En humanos, su gen se encuentra localizado en la región q14-q15 del cromosoma 6.

Localización: Es un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ que se inserta en la membrana plasmática, donde se une tanto al Δ^9 THC como a los endocannabinoides (Matsuda y cols., 1990). Ha sido localizado en hipocampo, corteza, ganglios basales y cerebelo a muy altas concentraciones (Fig. 1), siendo el receptor más abundante de los acoplados a proteínas G en el cerebro de los mamíferos. En menor concentración, se encuentra en hipotálamo y médula espinal. También se expresa en sistema nervioso periférico, testículos, sistema inmune, glándula adrenal, médula ósea, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, próstata, timo, amígdalas y bazo. (Ramos Atance y Fernandez Ruiz, 2000; Howlett y cols., 2002).

El receptor CB_1 se expresa principalmente como receptor presináptico, y su efecto fundamental es modificar la liberación de algunos neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina, glutamato, y serotonina. (Ishac y cols., 1996; Khatmann y cols., 1999; Nakazi y cols., 2000; Shen y cols., 1996; Szabo y cols., 1999)

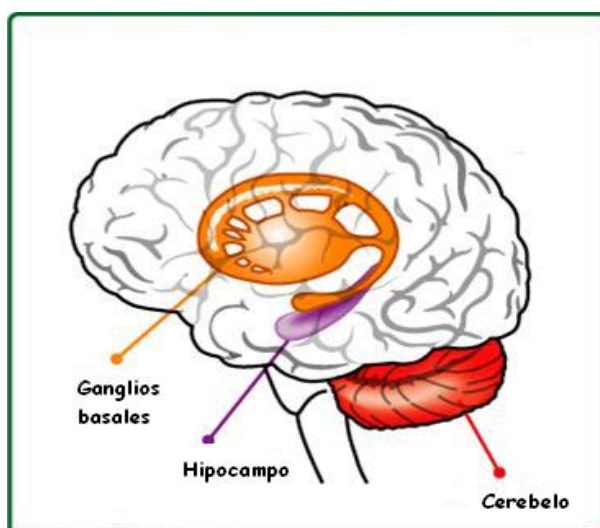


Fig. 1: Núcleos con mayor densidad de receptores CB_1 en cerebro

El **receptor CB₂** es un polipéptido de 360 aminoácidos que también pertenece al grupo de receptores unidos a proteínas G_{i/o} (Munro y cols., 1993).

Localización: Ha sido localizado en órganos linfoides como: bazo, timo, amígdalas, médula ósea y páncreas, en células mieloides, macrófagos y monocitos de bazo, en leucocitos de sangre circulante y en una gran variedad de líneas de células inmunes en cultivo (células mieloides y eritroides, macrófagos, mastocitos y linfocitos T y B). (Pertwee, 1997,1998; Howlett y cols., 2002). También ha sido propuesta su presencia en microglia (Carlisle y cols., 2002) y corazón (Joyeux y cols., 2002; Bouchard y cols., 2003; Lepicier y cols., 2003). Además ha sido detectado por secuenciado molecular en células endoteliales aisladas de arterias pulmonares de carnero (Zoratti y cols., 2003).

Al contrario que el receptor CB₁ su activación no modifica la liberación de neurotransmisores.

Mecanismos moleculares: La investigación biológica ha demostrado una serie de vías celulares a través de las cuales pueden actuar los cannabinoides (Fig 2).

Tanto el receptor CB₁ como el CB₂ son receptores acoplados a proteínas G (G_{i/o}), que actúan inhibiendo al enzima adenilato ciclasa y que conducen a la disminución de los niveles de AMPc y las actividades celulares dependientes de este, como apertura de canales de potasio, y bloqueo de canales de Ca⁺⁺ del tipo N (Mackie y Hille,1992) y P/Q (Twichel y cols., 1997; Devane y cols., 1988).

En algunos casos, se ha visto que los agonistas endógenos del receptor de cannabinoides estimulan la formación de AMPc posiblemente activando proteínas Gs (Glass y Felder,1997)

Recientemente se ha demostrado que los cannabinoides pueden inhibir también los canales de Ca^{++} tipo L en la musculatura lisa de arterias, lo que se correlaciona con el papel vasodilatador que pueden tener estos compuestos (Howlett y Mukhopadhyay, 2000).

Los cannabinoides, tanto a través de las proteínas G, como de segundos mensajeros como ceramidas, pueden actuar también sobre la cascada de protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), activada por señales extracelulares o por estrés y mediante este mecanismo controlar la supervivencia o muerte celular (Guzmán y cols., 2001).

El receptor CB1 puede inactivarse por fosforilación. Este podría ser el mecanismo utilizado por las neuronas para revertir la inhibición producida por los cannabinoides sobre la liberación de neurotransmisores.

Además, los cannabinoides inducen la expresión de genes tales como KroX-24, a través de una vía no dependiente de AMPc (Rinaldi-Carmona y cols., 1998)

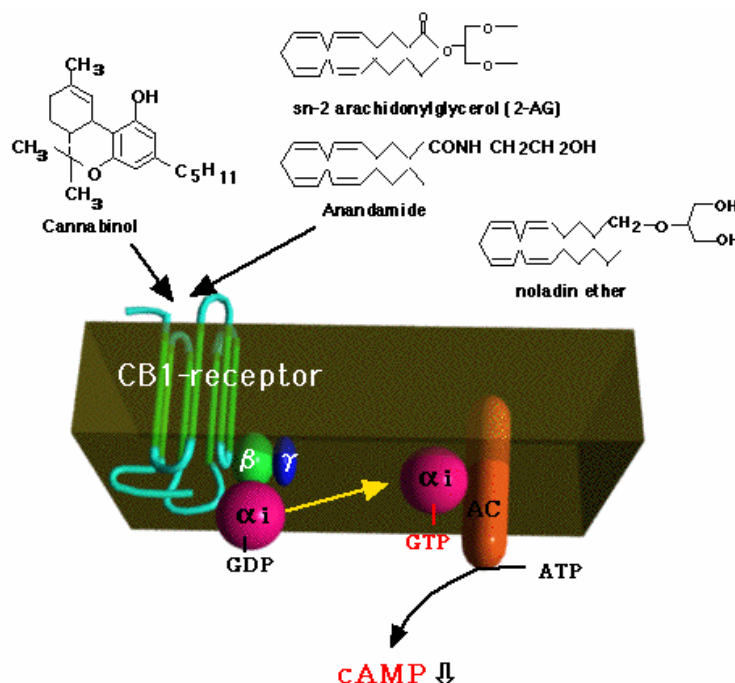


Fig.2 Mecanismos celulares de la activación de receptores cannabinoides

A pesar de que los cannabinoides median sus efectos actuando sobre receptores cannabinoides, también son capaces de activar receptores vanilloides.

2.1.2 Receptores vanilloides

Hasta el momento solo un receptor vanilloide ha sido clonado (VR_1), aunque hay evidencias farmacológicas y bioquímicas de la existencia de otros receptores de esta familia que se denominan VRs (Szallasi y Blumberg, 1999).

Localización: el receptor VR_1 ha sido clonado (Caterina, 1999) y se encuentra principalmente en neuronas sensoriales, diversos núcleos cerebrales (Acs y cols., 1996; Sasamura y cols., 1998), tejidos no neuronales (como mastocitos), células gliales (Biró y cols., 1998) y en fibras aferentes primarias de pequeño diámetro.

También se encuentra en el aparato cardiovascular, tanto en el corazón como en la adventicia de los vasos sanguíneos. Es estimulado por calor, protones, capsaicina y anandamida, y al activarse libera: péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P, neurokinina A (NKA) y ATP. Estas sustancias producen taquicardia, vasodilatación y extravasación de proteínas plasmáticas.

Mecanismo: VR_1 forma parte de una familia de receptores acoplados a canales iónicos y su activación puede desencadenar una serie de respuestas como la liberación de NO (Deutsch y cols., 1997), excitación de neuronas perivasculares sensoriales en la pared de los vasos que liberan CGRP. (Zygmunt y cols 1999; Smart y cols., 2000; Ross, 2001; Mukhopadhyay y cols., 2002; Ralevic y cols., 2002) y efectos cardiovasculares (ver mas adelante),

sobre el sistema inmunológico y modulación de la sensación dolorosa (Li y cols., 1999).

El receptor de vanilloides VR₁ posee una estructura tridimensional donde se observan seis segmentos transmembrana completos y otro parcial, que es el que se supone está asociado a un canal de Ca⁺⁺. En el extremo N-terminal existen tres zonas sensibles a la fosforilación por protein-kinasa A.

La incubación prolongada con capsaicina produce un fenómeno de *desensibilización in vitro*, debido a depleción de neurotransmisores, que consiste en una pérdida de actividad de los agonistas, seguida de un prolongado periodo refractario. No es un proceso bioquímico sencillo, sino más bien una cascada de eventos que probablemente inducen cambios conformacionales en el receptor, lo que trae como consecuencia el cierre del canal de Ca⁺⁺. Otro mecanismo que puede jugar un papel en la desensibilización es la fosforilación de protein kinasa A.

Agonistas vanilloides: La capsaicina, el ingrediente activo de la guindilla (*Hot pepper*), es el principal agonista de receptores vanilloides VR. Fue aislada por primera vez por Thersh en 1846, en 1919 Nelson determinó su estructura química, y en 1930 se consiguió su síntesis completa. En la actualidad se dispone de análogos sintéticos extraordinariamente potentes de capsaicina (Szallasi y Blumberg, 1990) y de antagonistas competitivos del receptor vanilloide VR₁ como la capsazepina (Bevan y cols., 1991).

La anandamida se comporta también como un agonista vanilloide. La similitud funcional entre capsaicina y anandamida para activar los receptores VR ha abierto un gran debate y múltiples ensayos farmacológicos para dilucidar esta controversia (Melck y cols., 1999; Zygmunt y cols., 1999; Smart y cols., 2000); Ross, 2003).

Este receptor es también activado por otros vanilloides, por R(+)-metanandamida y otros compuestos cannabinoides. También se ha sugerido que uno de los productos de la degradación de anandamida, el ácido araquidónico, al ser metabolizado por la enzima lipooxigenasa da lugar a metabolitos como el 12-hidroxi-peroxi-eicosa-tetra-enoicos (12-HPETE) que podrían activar el receptor VR₁(Di Marzo, 2001; Ralevic y cols.,2002; Szallasi, 2002).

Antagonistas vanilloides: La capsazepina es el más conocido antagonista competitivo del receptor VR₁. Su uso está limitado por su potencia moderada, ya que a concentraciones micromolares (las necesarias para inhibir las respuestas de capsaicina) también bloquea canales de Ca⁺⁺ y receptores nicotínicos (Liu y Simon, 1997).

El antagonista SR141716A, a concentraciones superiores a 10 µM, de una manera inespecífica, inhibe la respuesta vasodilatadora a capsaicina mediada por VR₁ (Zygmunt y cols 1999; Hillard, 2000; Smart y cols., 2000; Malinowska y cols., 2001; Ralevic y cols., 2002; Ross, 2003).

Algunos estudios sugieren que existen receptores VR insensibles a capsazepina (Liu y cols., 1998), y otros sugieren la existencia de un receptor de naturaleza vanilloide, sensible a capsazepina y a SR141716A, que sería activado tanto por capsaicina como por los cannabinoides Win55,212-2 y CP 55940. (Pertwee, 2003).

2.1.3 Cannabinoides endógenos

Los ligandos endógenos más conocidos y estudiados hasta el momento son: anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG). Son sintetizados, liberados, recaptados y degradados en las células nerviosas, lo que confirma su posible función como neuromoduladores y producen efectos farmacológicos similares a los del Δ^9 THC pero con una duración de acción mucho más corta.

En 1992 se caracterizó, a partir de cerebro de cerdo, la araquidoniletanolamida, que se denominó **anandamida**. Este compuesto está formado por ácido araquidónico unido por un enlace amida a etanolamina (Devane y cols., 1992). El estímulo fisiológico para la producción y liberación de anandamida no está del todo establecido.

Ha sido identificada en cerebro y en tejidos periféricos humanos y de rata. En ambas especies se ha detectado en hipocampo, estriado y cerebelo, regiones ricas en receptores CB₁, así como en tálamo, donde la expresión de este receptor es mucho más baja. Cantidades importantes de anandamida también se han localizado en el bazo, donde hay altos niveles de receptores CB₂. Hay pequeñas cantidades en corazón humano y aparecen trazas en suero, plasma y líquido cefalorraquídeo humanos. Produce una serie de efectos fisiológicos, tanto centrales como periféricos, por su efecto agonista parcial de receptores CB₁ aunque también tiene afinidad por el receptor CB₂ (Lake y cols., 1997).

El 2-AG, está formado por ácido araquidónico unido por un enlace éster a glicerol. Inicialmente fue aislado en intestino de perro y posteriormente en bazo y páncreas, lo que hizo pensar que se trataba de un ligando periférico (Mechoulam y cols., 1995; Martin y cols., 1999). Más tarde fue identificado en cerebro (Sugiura y cols., 1995), donde se encuentra a las máximas

concentraciones en tronco cerebral, estriado e hipocampo y las más bajas en corteza, diencéfalo y cerebelo (Bisogno y cols., 1999). El 2-AG tiene efecto hipotensor que no es mediado por receptores CB1. Este efecto es atenuado por los inhibidores de la ciclooxigenasa, indicando que puede ser mediado por ácido araquidónico u otros metabolitos (Jarai y cols., 2000). También está implicado en diversos procesos fisiopatológicos como activación de la agregación plaquetaria (Macarrone y cols., 2003).

2.1.4 Síntesis, liberación, recaptación y degradación de anandamida

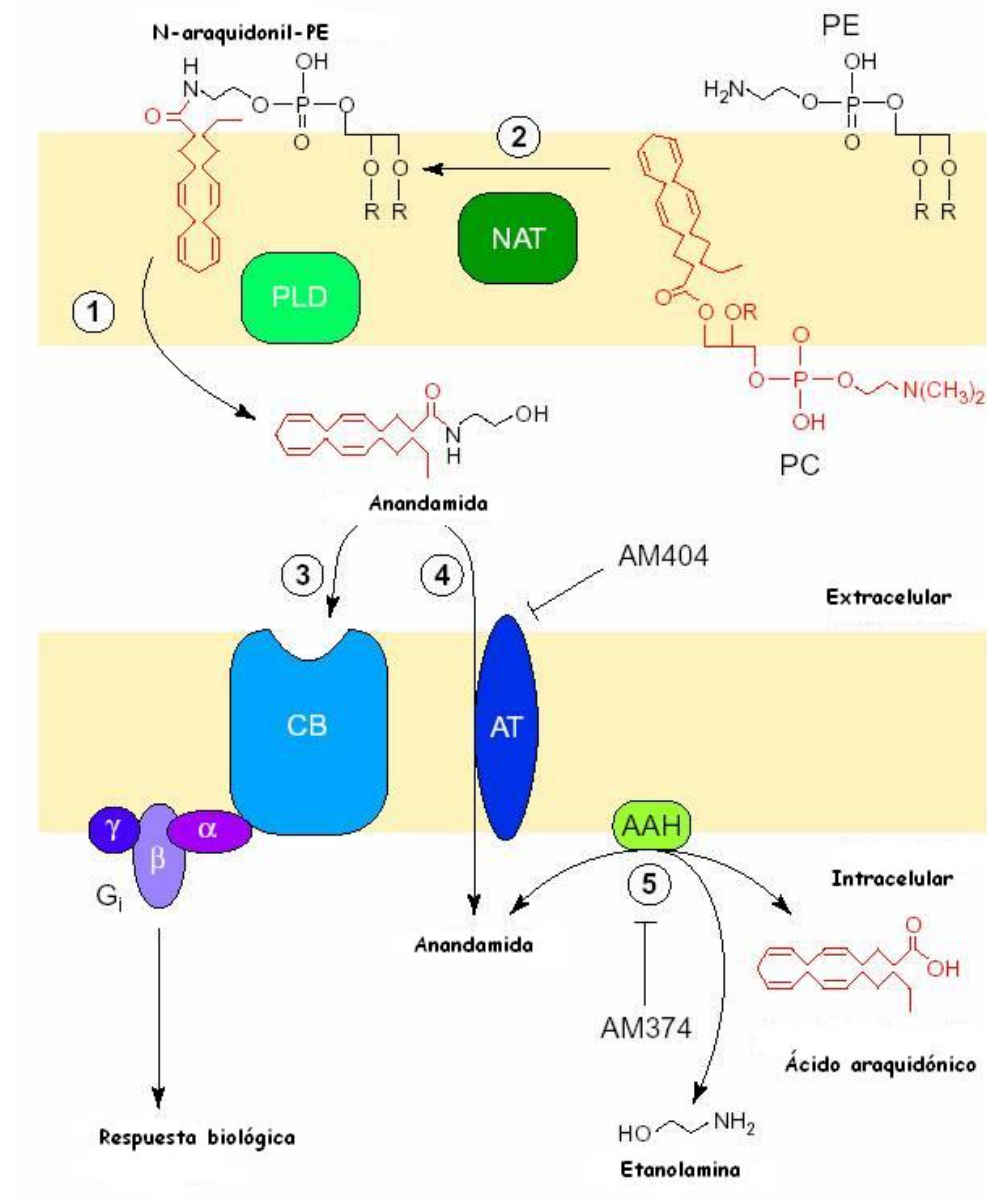


Fig. 3 Esquema de la síntesis, recaptación y degradación de la Anandamida (1) Hidrólisis de NAPE por la PLD (2) Síntesis de AEA por una N-aciltransferasa. (3) Interacción con el receptor CB (4) Recaptación por el transportador de Anandamida (AT) (5) Degradación por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Piomelli y cols., 2000).

Síntesis: La anandamida se sintetiza y libera en la neurona por un mecanismo Ca^{++} -dependiente. La síntesis de anandamida se produce mediante la hidrólisis de un precursor fosfolipídico presente en la membrana celular, la N-acil-fosfatidiletanolamina (NAPE), por efecto del enzima fosfolipasa D que libera ácido fosfatídico y los correspondientes tipos de N-aciletanolaminas, una de las cuales es la anandamida (Fig.3). La síntesis de anandamida se produce a demanda en el organismo, es decir, que al contrario de los neurotransmisores clásicos que se almacenan en vesículas, la anandamida es sintetizada “en el momento” en el que se va a liberar.

Almacenamiento: Los endocannabinoides no se almacenan en el interior de vesículas como ocurre con los neurotransmisores clásicos, probablemente por su naturaleza hidrófoba. Su almacenamiento se produce en forma de un precursor (fosfolípido de membrana) que es acilado e hidrolizado posteriormente y se sintetiza cuando su acción es necesaria.

Los endocannabinoides podrían ser otro tipo de intermediario metabólico lipídico, que, como los eicosanoides y el factor activador de plaquetas, se sintetizan por la hidrólisis de un fosfolípido, actuando cerca del sitio de producción, donde también se degradan rápidamente. Su solubilidad en lípidos les permitiría difundir libremente a través de las membranas y actuar como moduladores de diversas actividades biológicas.

Liberación: La anandamida podría ser liberada al espacio intersináptico, por un mecanismo de difusión facilitada bidireccional, realizada a favor de un gradiente de concentración (Hillard y cols., 1997).

Recaptación: La anandamida es recaptada de forma selectiva tanto por neuronas como por células gliales, donde es degradada a etanolamina y el correspondiente ácido graso (ácido araquidónico). Existe una gran controversia

sobre si este proceso de recaptación es mediado por un transportador específico o no. (Beltramo y cols., 1997; Glaser y cols., 2003).

La existencia del transportador ha sido y sigue siendo cuestionada por numerosos autores, puesto que aún no ha sido clonado ni ha sido aislada su proteína constituyente, por lo que no se puede asegurar que este transportador exista (Glaser y cols., 2003).

Este mecanismo de recaptación es rápido, temperatura-dependiente, saturable y con selectividad por el sustrato. Incluso se han sintetizado sustancias con posible efecto inhibitor de la recaptación en neuronas y astrocitos como un derivado fenólico, N(4-hidroxifenil)araquidonamida (AM404), que inhibiría la recaptación de anandamida, lo que hace pensar en la existencia de un transportador específico.

Metabolismo: La anandamida es metabolizada muy rápidamente por lo que la duración de su efecto es muy corta. La utilización de inhibidores de su degradación puede prolongar la duración de su efecto farmacológico.

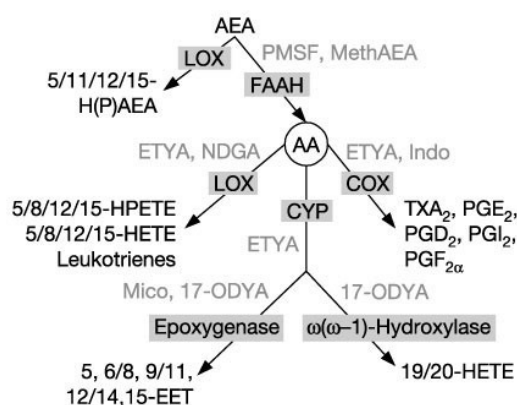


Fig.4. Principales rutas metabólicas de anandamida (Watanabe y cols., 2003)

La anandamida se metaboliza por tres mecanismos principales:

1) Hidrólisis producida por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) que transforma la anandamida en ácido araquidónico (AA) y etanolamina (Fig.4) y además cataliza el proceso inverso transformando el AA+etanolamina en anandamida. La FAAH ha sido purificada, clonada y secuenciada (Cravatt y cols., 1996).

Esta enzima actúa también sobre análogos de anandamida como 2AG, palmitoiletanolamida y oleamida y sobre la R(+)-metanandamida (Lang y cols., 1999; Fowler y cols., 2001), aunque la afinidad del enzima FAAH por R(+)-metanandamida es menor que la de anandamida (Lang y cols., 1999).

El ácido araquidónico resultante de esta reacción, puede ser metabolizado por la COX a PGs.

2) Citocromo P450 (CYP450): La anandamida puede ser oxidada en el hígado por el CYP450 3A transformándose en unos veinte metabolitos activos. Además el CYP450 es capaz de metabolizar el ácido araquidónico formado por la FAAH al hidrolizar la anandamida, dando lugar a un gran número de compuestos como los ácidos hidroxí-epoxi-eicosa-tri-enoicos (HETE) (Bornheim y cols., 1995).

3) Oxidación por Ciclooxigenasa 2 (COX₂): Recientemente se ha demostrado que la anandamida puede ser sustrato de la COX₂ que la transforma en prostaglandina E₂-etanolamida y D₂-etanolamida (Kozak y cols., 2002; Ross y cols., 2002). Estos productos han sido denominados “**prostamidas**” (Chen y cols., 2001). La prostamidaE₂ tiene un perfil de acción

parecido a la PGE₂ ya que se une a los cuatro receptores EP solo que de manera menos potente, no se une al receptor CB₁ y se une al CB₂ con muy baja afinidad (Ross y cols., 2002).

Más interesante es el hecho de que el 2AG puede ser transformado por acción de la COX₂ en PGH₂-G, compuesto inestable, que sería transformado en diferentes PGs (F₂alfa, E₂, I₂ D₂) y tromboxanos, siguiendo la cascada de la síntesis de PGs. (Kozak y cols., 2002).

4) Lipooxigenasa (LOX): La lipooxigenasa puede actuar directamente sobre la anandamida produciendo 5/11/12/15-H(P)-anandamida (Watanabe y cols., 2003): Asimismo puede metabolizar el ácido araquidónico producto de la hidrólisis de anandamida.

3 TERMINOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CANNABINOIDES

Los cannabinoides son un grupo de sustancias con estructuras químicas diferentes que tienen en común sus efectos sobre alguno de los elementos constituyentes del sistema endocannabinoide.

Cannabinoides vegetales (derivados de la Cannabis Sativa):
delta ⁹ -tetrahidrocannabinol cannabidiol cannabinol
Cannabinoides sintéticos:
análogos de los cannabinoides clásicos: CP55,940 y HU-210 análogos de la pravadolina (aminoalquilindoles): WIN-55,212-2 agonistas selectivos CB ₁ : ACEA y ACPA agonistas selectivos CB ₂ : HU-308 y JWH-133
Cannabinoides endógenos (eicosanoides):
Araquidoniletanolamida (anandamida) 2-araquidonilglicerol
Antagonistas de los receptores de cannabinoides:
SR141716, LY320135 y AM251 (antagonistas selectivos del receptor CB ₁) SR144528 (antagonista selectivo del receptor CB ₂)
Inhibidores del proceso de terminación de la actividad biológica de los endocannabinoides:
inhibidores de la recaptación: AM404 y VDM11 inhibidores de la degradación (actividad FAAH): PMSF y AM374

Tabla 1. Clasificación de compuestos activos sobre el sistema endocannabinoide

El conocimiento de las relaciones existentes entre la estructura y la actividad de los cannabinoides ha permitido el diseño de análogos sintéticos que han sido de gran utilidad en el estudio farmacológico y fisiológico de estos compuestos.

3.1 AGONISTAS CANNABINOIDES

En cuanto a su estructura química hay cuatro grupos principales de agonistas cannabinoides:

3.1.1 Clásicos:

Este grupo de cannabinoides lo forman derivados de dibenzopiranos ABC-tricíclicos, los cuales son compuestos obtenidos de la planta *Cannabis sativa*, productos procedentes de su biotransformación, o derivados sintéticos de los mismos. Todos estos compuestos tienen actividad cannabimimética tanto *in vivo* como *in vitro* (Howlett y cols., 2002).

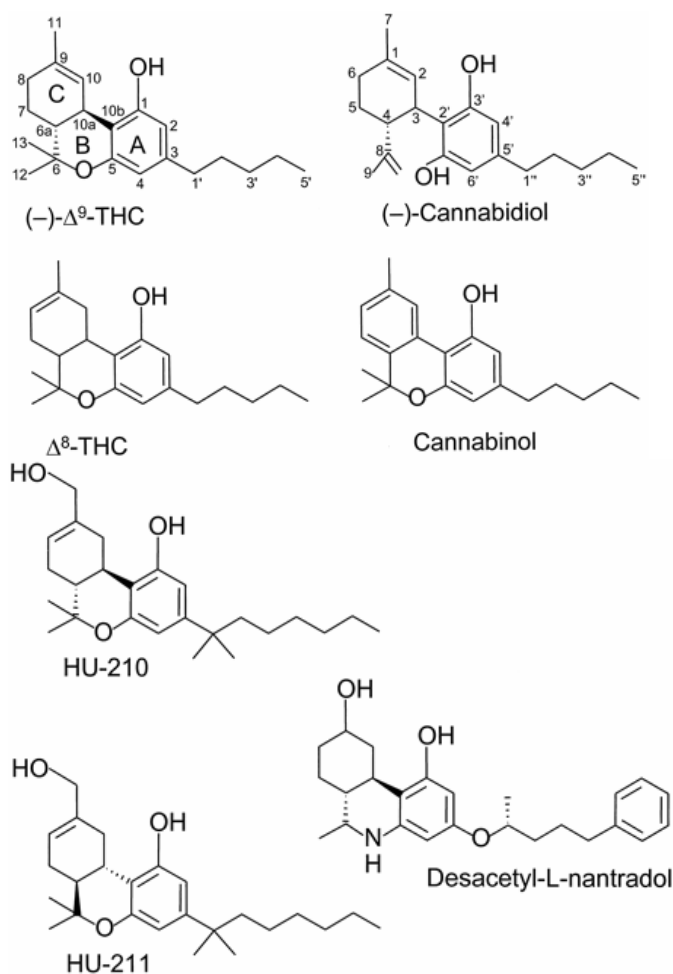


Fig.5: Estructura química de cannabinoides clásicos

El Δ^9 Tetrahidrocannabinol (Δ^9 THC) es el principal componente psicoactivo del *Cannabis*, cuya estructura química fue caracterizada en el año 1964, por Mechoulam y Gaoni. Este compuesto tiene una afinidad semejante por los dos receptores de cannabinoides CB₁ y CB₂.

Los compuestos Δ^8 Tetrahidrocannabinol (Δ^8 THC), Cannabinol y Cannabidiol son también componentes psicoactivos del *Cannabis*, mientras que HU-210 (y su enantiómero (+) HU-211) y Desacetil-L-nantradol son cannabinoides sintéticos.

La afinidad del Δ^8 THC por los receptores cannabinoides es muy parecida a la del Δ^9 THC, mientras que su análogo sintético HU-210 tiene una afinidad y una actividad intrínseca mucho más alta que el Δ^9 THC. Por lo tanto se trata de un agonista particularmente potente de los receptores cannabinoides y además sus efectos “in vivo” son especialmente duraderos.

3.1.2 No clásicos:

El representante principal de este grupo es el (-)-CP-55,940, que permitió el descubrimiento y la caracterización del receptor de cannabinoides CB₁ (Devane y cols., 1988). El CP55,940 es un compuesto con una afinidad similar por los dos subtipos de receptores de cannabinoides, menos lipófilo y de 10 a 50 veces más potente in vivo que el Δ^9 THC.

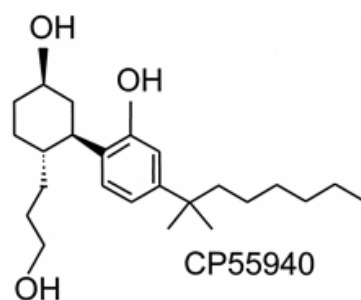


Fig. 6: Estructura química de CP55940

3.1.3 Aminoalquilindoles:

Esta nueva familia de compuestos con actividad cannabimimética fue descubierta por los investigadores de Sterling Winthrop al desarrollar análogos estructurales de pravadolina. El compuesto mas estudiado de esta familia es el R-(+)-Win 55,212-2. El cual tiene una afinidad ligeramente superior por el receptor CB2. In vivo produce los mismos efectos farmacológicos que el Δ^9 THC.

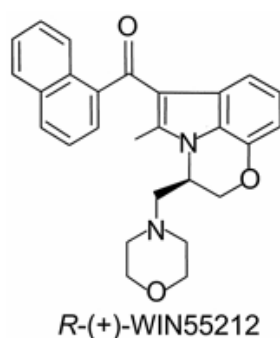


Fig.7: Estructura química de R-(+)-Win 55,212-2

3.1.4 Eicosanoides:

Son derivados de ácidos grasos, cuyo representante principal es el endocannabinoide Anandamida. La R(+)-metanandamida es un análogo sintético de la anandamida resistente a la degradación enzimática. Estos dos compuestos son agonistas de receptores CB₁, CB₂ y VR1. El 2-araquidonilglicerol se comporta como agonista de receptores, CB₁ y CB₂.

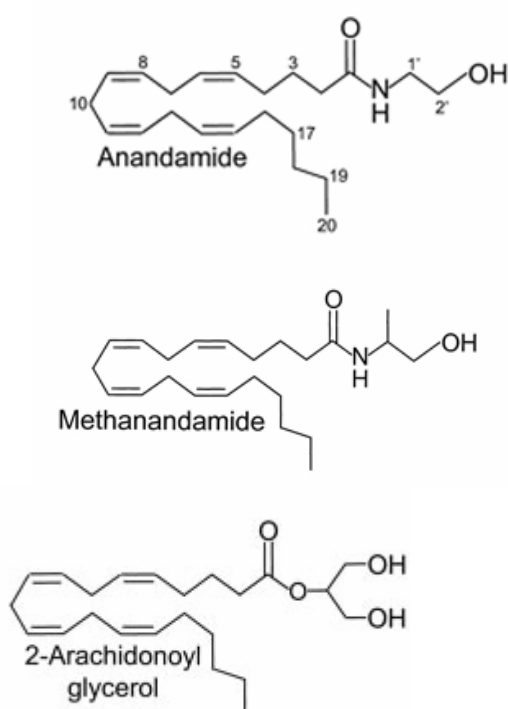


Fig.8: Estructura química de anandamida, R(+)-metanandamida y 2-araquidonil glicerol

3.2 ANTAGONISTAS CANNABINOIDES

3.2.1 *Diarilpirazoles:*

Los representantes más característicos de este grupo son los compuestos de Sanofi Research: SR141716A, un potente antagonista del receptor CB₁, y SR144528, un potente antagonista del receptor CB₂.

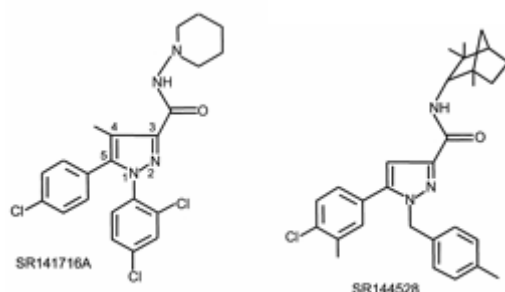


Fig.9: Estructura química de SR141716A y SR144528

Pueden comportarse como agonistas inversos cuando se administran en ausencia de agonistas, (Bouaboula y cols., 1998; Portier y cols., 1998; Rhee and Kim, 2002), y SR144528 autoactiva receptores CB₂ e inhibe la actividad de proteínas Gi (Bouaboula y cols., 1998).

En cuanto a su especificidad, esta es dosis-dependiente: el SR141716A a altas concentraciones es capaz de bloquear el receptor de vanilloides VR₁ (Zygmunt y cols., 1999; Bouaboula y cols., 1998; Portier y cols., 1998; Rhee y Kim, 2002), activar directamente canales de K⁺ e inhibir de manera no selectiva la movilización de Ca⁺⁺ en arteriolas cerebrales de conejo (Ellis y cols., 1995). Existen otros antagonistas del receptor CB₁ como AM251, que también se comporta como un agonista inverso cuando se administra solo. (Izzo y cols., 2000).

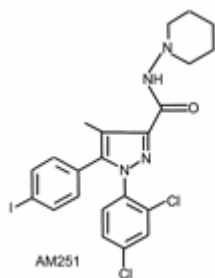


Fig.10: Estructura química de AM251

3.3 INHIBIDORES DE RECAPTACIÓN Y DEGRADACIÓN DE ENDOCANNABINOIDES

- Inhibidor del transportador de anandamida: Es el compuesto N(4-hidroxifenil)araquidonamida (AM 404) que bloquea la entrada de anandamida a la célula aumentando la concentración en el espacio intersináptico. Además de este efecto es capaz de bloquear el receptor de vanilloides VR1.

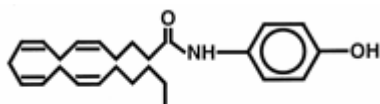


Fig.11: Estructura química de AM404

- Inhibidores de la degradación de anandamida:
 - Inhibidores de la FAAH:* como el compuesto fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) o los antiinflamatorios no esteroideos como ibuprofeno, aspirina e indometacina. Estos compuestos inhibirían la rápida degradación de la anandamida en el interior de la célula (Compton y Martin, 1997) y podrían emplearse en terapéutica para potenciar los efectos de los cannabinoides endógenos.

- II. *Inhibidores de CYP450*: Se utilizan como herramientas farmacológicas para el estudio del metabolismo de los endocannabinoides. Los más utilizados son: 17-ODYA (inhibidor de CYP450 epooxigenasa y CYP450 ω / ω -1- hidroxilasa responsables de la producción de ácidos 19/20-HETEs y 5,6/8,9/11,12/14,15-epoxi-eicosa-tri-enoicos (5,6/8,9/11,12/14,15-EET) y miconazol (Zygmunt y cols., 1996; Ishioka y Bukoski, 1999; Watanabe y cols., 2003).
- III. *Inhibidores de la COX2*: Los inhibidores de la ciclooxigenana 2 (rofecoxib, celecoxib) inhiben la COX₂ de manera específica, mientras que los antiinflamatorios no esteroideos como ibuprofeno, aspirina e indometacina producen una inhibición inespecífica de ambas ciclooxigenasas. Al ser también inhibidores de la FAAH, serían de gran utilidad en el tratamiento del dolor. (Fowler y cols., 2001).

4 EFECTOS DE LOS CANNABINOIDES

4.1 EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS

Las bases moleculares de los efectos fisiológicos de cannabinoides endógenos y exógenos han comenzando a conocerse recientemente. En el SNC, los endocannabinoides participan en la regulación de la sensación dolorosa (cerebro y médula espinal), actividad motora, aprendizaje y memoria, y desempeñan un papel notable durante el desarrollo cerebral. Además están implicados en la regulación del vómito, apoptosis neuronal y neuroprotección. Periféricamente disminuyen la presión intraocular y regulan la ingesta de comida.

Los dos mecanismos más estudiados son la interacción con sus receptores y la modulación de otros sistemas neurotransmisores. Pueden regular sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos, relacionados con el control de la actividad motora, la secreción de hormonas adenohipofisarias y mecanismos de recompensa cerebral. También interaccionan con aminoácidos neurotransmisores, relacionados tanto con el control de la actividad motora y de la secreción de hormonas adenohipofisarias (GABA), como con la memoria y el aprendizaje (GABA y glutamato). Su interacción con el sistema opioide, contribuye al control de la nocicepción y ha sido ampliamente estudiado.

4.1.1 *Sensación dolorosa*

Probablemente, una de las funciones del sistema cannabinoide endógeno sea la de modular la transmisión dolorosa por disminución de la respuesta sensorial de las neuronas en el tracto espinotalámico (Martin y cols., 1996;

Monhenius y cols., 2001). Asimismo suprimen la hiperexcitabilidad neuronal, hiperalgesia y alodinia a través de receptores CB₁ y CB₂.

En modelos experimentales los cannabinoides son analgésicos tanto en dolores agudos inflamatorios como neuropáticos (Campbell y cols., 2001).

Se postulan 4 mecanismos de acción mediante los cuales los cannabinoides producen su efecto antinociceptivo:

1) Efectos mediados a través de receptores cannabinoides:

a) **CB₁**: Se ha demostrado que la administración a ratones del antagonista cannabinoide SR 141716A produce hiperalgesia, lo que sugiere la existencia de un tono cannabinoide basal, cuya inhibición sería la responsable de esta hiperalgesia. (Richardson y cols., 1998).

b) **CB₂**: La estimulación de estos receptores inhibe las respuestas dolorosas. (Malan y cols., 2002; Clayton y cols., 2002) por lo que el uso de agonistas CB₂ puede ser una posibilidad para el tratamiento de dolores tanto agudos como crónicos sin efectos psicoactivos. Esto sería especialmente relevante para el tratamiento de dolores neuropáticos (Malan y cols., 2003)

2) Efectos mediados a través de receptores vanilloides VR₁. Los receptores vanilloides están involucrados en dolores agudos y crónicos tanto a nivel espinal como periférico. Hay evidencia de interacción entre receptores CB₁ y VR₁.

3) Por interacción con el sistema opioide. El Δ^9 -THC libera dinorfina A y Leu-ENK e interacciona con canales de K⁺ liberando endorfinas. (Mason y cols 1999). Además, los cannabinoides actúan sobre receptores kappa opioides, ya que tanto la naloxona como la norbinaltorfimina, (antagonista opioide kappa)

bloquean la antinocicepción producida por Δ^9 -THC de forma dosis-dependiente (Smith y cols., 1994).

4) Modulando la liberación y actividad de neurotransmisores especialmente noradrenérgicos y glutamatérgicos, alterando la percepción del estímulo doloroso (Litchman y Martin, 1991; Pertwee, 2001).

4.1.2 *Actividad locomotora*

La alta densidad de receptores CB₁ en los ganglios basales y cerebelo, y la presencia en grandes cantidades de anandamida y 2-araquidonilglicerol, sugieren un papel importante del sistema endocannabinoide en el control de los movimientos voluntarios y por tanto en los trastornos motores.

Los receptores CB₁ se localizan presinápticamente en neuronas estriadas, subtalámiconigrales, cerebelo y corteza cerebral. Los endocannabinoides modulan la liberación y recaptación de GABA y glutamato (Maneuf y cols., 1996; Romero y cols., 1998; Szabo y cols., 2000) y producen efectos indirectos sobre dopamina, afectando sobre todo a la síntesis de este neurotransmisor (Romero y cols., 1995).

4.1.3 *Emesis*

Controlan el vómito actuando sobre receptores CB₁ localizados en el centro del vómito del tronco cerebral en el SNC, y en las terminaciones nerviosas de los plexos mientérico y submucoso del estómago, duodeno y colon, disminuyendo la motilidad por bloqueo de la liberación de acetilcolina en esas áreas (Croxford, 2003; DiCarlo e Izzo, 2003).

4.1.4 Proliferación celular

Tanto la anandamida como el 2-araquidonilglicerol ejercen acciones antiproliferativas en cultivos celulares de células tumorales (Guzman, y cols 2002). Modulan varias vías de crecimiento celular como protein-quinasas activadas por agentes mitógenos y las kinasas activadas por estrés, que tienen un papel importante en el control del crecimiento celular y su diferenciación. En células de glioma C6 los cannabinoides producen apoptosis a través de los dos tipos de receptores cannabinoides. El efecto parece estar mediado en parte por ceramidas, con implicación especial del receptor CB₂ de cannabinoides y del receptor vanilloide VR₁. (Williamson y Evans, 2000).

4.1.5 Efectos neuroprotectores

Los agonistas cannabinoides son capaces de reducir la excitotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo por tanto, potenciales agentes neuroprotectores. La capacidad de los cannabinoides de inhibir la neurotransmisión glutamatérgica, permitiría asegurar que el sistema endocannabinoide juega un papel fundamental en la regulación de la neurotransmisión excitadora y por tanto, también, de la excitotoxicidad.

El efecto neuroprotector de los cannabinoides se ha demostrado con dos agonistas cannabinoides WIN55212-2 y CP55940. Ambos protegen de la muerte neuronal inducida por glutamato en cultivos celulares de neuronas de hipocampo. Aunque este efecto es bloqueado por SR141716A, no ha sido demostrado que el receptor implicado sea el CB₁, lo que sugiere la presencia de otro subtipo de receptor de naturaleza cannabinoide y sensible a SR141716A. (Shen y cols.,1996; Shen y Thayer 1998). También se ha propuesto que los agonistas CB₁ sean neuroprotectores por su capacidad antioxidante.

4.1.6 Otros efectos

A Regulación de la ingesta

El sistema endocannabinoide puede formar parte de los mecanismos que regulan la conducta alimentaria, a través de su interacción con el sistema de señalización nutricional hipotalámico mediado por la leptina. Esta hormona secretada por el tejido adiposo tiene un papel clave en el mantenimiento del peso corporal. Un incremento de la masa grasa aumenta los niveles de leptina, y ésta disminuye los niveles hipotalámicos de los endocannabinoides Anandamida y 2-Araquidonilglicerol.

Por otro lado, la oleamida, un análogo natural de la anandamida que no activa receptores CB₁, es sintetizada en el intestino delgado en respuesta a la ingesta y parece causar en modelos animales un efecto anorexígeno mediado por fibras vagales que estimulan áreas del SNC como el núcleo paraventricular o el núcleo del tracto solitario.

Así pues, el sistema endocannabinoide participa en la regulación de la conducta alimentaria y del peso corporal formando parte de una compleja serie de señales periféricas y centrales, orexígenas y anorexígenas.

B Presión intraocular

Análisis inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de receptores de cannabinoides CB₁ en el polo anterior del ojo en el epitelio pigmentado ciliar. Los cannabinoides podrían actuar sobre la producción del humor acuoso, y sobre el drenaje en el sistema trabecular y el canal de Schlemm, disminuyendo la presión intraocular (PIO) (Straiker y cols., 1999).

Además de la presencia de receptores cannabinoides, también se ha detectado en el ojo la existencia de las fosfodiesterasas necesarias para la

síntesis de anandamida a partir de su precursor la NAPE (Matsuda y cols, 1997).

C Función inmunológica

No es del todo conocida, pero a dosis altas pueden actuar por varias vías inhibiendo o estimulando las respuestas inmunológicas. El receptor CB₂ se encuentra en tejidos inmunes como bazo, timo, médula osea, amígdalas y células circulantes (monocitos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos T y B. El contenido de mRNA para CB₂ en estas células, es equivalente al de CB₁ en cerebro. Los cannabinoides disminuyen el AMPc intracelular que normalmente está aumentado cuando se activan los linfocitos y de esta manera producen efectos inmunosupresores. Además activan otras vías moleculares como el factor kB nuclear.

4.2 EFECTOS ADVERSOS

La principal dificultad técnica para el uso de cannabinoides en terapéutica es la incapacidad de separar los efectos colaterales psicotrópicos indeseables de los efectos terapéuticos beneficiosos, especialmente la tolerancia y la dependencia. Solo muy recientemente se ha avanzado en el estudio de los mecanismos moleculares y farmacológicos de los compuestos activos cannabinoides encontrados en la marihuana.

Los efectos secundarios más importantes de los cannabinoides son sus efectos psicotrópicos como euforia, bienestar, desinhibición, locuacidad, sedación, pérdida de memoria, alucinaciones, distorsión de la imagen corporal y de la percepción sensorial. A veces pueden producir ataques de pánico, ideas paranoides, y exacerbación de los síntomas de la esquizofrenia. No aparecen

siempre, y su presentación depende de muchos factores, entre los que se encuentran la personalidad previa del individuo y el ambiente.

Hay muchos problemas para medir la contribución de cada uno de los constituyentes de los extractos de *Cannabis sativa*. Además, el efecto placebo es difícil de medir, y si la persona está informada de lo que va a ingerir, presenta mas respuestas agradables, pero también una taquicardia mas pronunciada, comparándolos con el grupo de pacientes no informados. Si se consigue aliviar el dolor crónico, aunque la administración sea inhalatoria y las personas conozcan los peligros, se tolera relativamente bien (Williamson y Evans, 2000).

Otros efectos secundarios no relacionados con el sistema nervioso incluyen: taquicardia, hipotensión postural, sequedad de boca, ataxia e inmunosupresión.

Los efectos secundarios de los antagonistas cannabinoideos son mucho menos conocidos.

Sería posible evitar la mayoría de estos efectos, tanto de los agonistas como de los antagonistas, con nuevos compuestos que actuaran selectivamente sobre un solo subtipo de receptor cannabinoide o bien sobre la liberación, recaptación o degradación de los cannabinoideos endógenos.

5 POSIBILIDADES DE APLICACIÓN TERAPEÚTICA

Existe un gran debate sobre los usos terapéuticos del *Cannabis*, y no debe generalizarse la idea de que su uso es inofensivo. Se debería emplear para determinados pacientes y bajo control médico.

En la actualidad se están llevando a cabo algunos ensayos clínicos con derivados sintéticos de cannabinoides. En algunos tratamientos muy concretos: como antiproliferativos, antiglaucomatosos o el empleo de Rimonabant® contra la obesidad y el tabaquismo.

5.1 ANTIEMÉTICOS:

Este es el efecto terapéutico para el cual los cannabinoides se utilizan con más frecuencia. Las náuseas y vómitos producidos por la quimioterapia, rebeldes a otros tratamientos, como, los antagonistas del receptor 5HT₃ de serotonina (ondansetron, granisetron, tropisetron) que son el tratamiento de elección en la actualidad; entre un 10-30% de los pacientes no mejoran con ellos. Por lo tanto, los cannabinoides podrían ofrecer algún beneficio, especialmente en determinados grupos de pacientes, como mujeres jóvenes con cáncer de mama, a pesar de que los efectos adversos que producen son más frecuentes que los producidos por los antagonistas del receptor 5HT₃ de serotonina.

Numerosos estudios realizados con Δ^9 -THC (Dronabinol®, Marinol®) y su análogo sintético Nabilona (Cesamet®) y con marihuana inhalada (fumada), en la década de los 70 y 80, demostraron la efectividad de estos compuestos como agentes antieméticos. La Nabilona, lleva 20 años siendo utilizada satisfactoriamente como antiemético en pacientes sometidos a quimioterapia

en el Reino Unido. (Lemberger, 1999) y tiene una potencia similar a la de antagonistas dopaminérgicos como metoclopramida y domperidona.

5.2 ANALGESIA:

El uso clínico de cannabinoides en el tratamiento del dolor se ha propuesto para el tratamiento de cefaleas, migrañas, dolores menstruales, dentales, neuropáticos, postquirúrgicos y dolor severo de espalda.

En general el efecto analgésico de los cannabinoides es irregular, existiendo variaciones importantes según el tipo de dolor y la receptividad del paciente. Ensayos llevados a cabo en humanos para comparar el efecto de Δ^9 -THC (20 mg) con el de Codeína (60-120 mg) en dolores crónicos asociados a neoplasias, han dado como resultado una actividad analgésica similar. También potencian los efectos de otros analgésicos y pueden ser asociados con opiáceos.

5.3 PATOLOGÍAS MOTORAS

Se consideran candidatos para ser tratados con agonistas cannabinoides: disquinesias, distonias, corea de Huntington (Glass y cols., 1993; Richfield y Herkenham, 1994), síndrome de Tourette (Muller-Vahl y cols., 1998) y esclerosis múltiple (Baker y cols., 2000), y con antagonistas la enfermedad de Parkinson (Sañudo-Peña y cols., 1998).

D Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una degeneración de la vía nigro-estriada que produce, entre otras alteraciones, un aumento del número de receptores CB₁ y una afectación del movimiento. El sistema endocannabinoide se vuelve, por lo tanto, hiperactivo. La L-dopa, tratamiento

de elección en esta patología, es capaz de revertir el incremento de los receptores CB₁, lo que indicaría que estos están bajo influencia inhibitoria de las neuronas dopaminérgicas.

Se podrían utilizar agonistas cannabinoides por su actividad neuroprotectora y antioxidante. Sin embargo los ensayos clínicos realizados hasta ahora con antagonistas no han sido concluyentes, y necesitarán ser ampliados en los próximos años (Fernández-Ruiz y cols., 2003)

Los antagonistas del receptor CB₁, que disminuirían esta hiperactividad, pueden ser beneficiosos sobre la aquinesia, uno de los síntomas característicos de esta enfermedad neurológica (Lastres-Becker y cols., 2001)

E Corea de Huntington

Estudios recientes han demostrado que hay una reducción marcada de receptores CB₁ en los ganglios de la base en esta enfermedad (Glass y cols., 2000), además, en los diferentes modelos animales de corea de Huntington se ha observado una hipofuncionalidad del sistema endocannabinoide (Lastres-Becker y cols., 2001). Diferentes estudios llevan a plantear que esta pérdida de los receptores CB₁ podría estar implicada en la propia patogénesis de la enfermedad.

En el tratamiento de esta enfermedad se podrían utilizar, tanto agonistas de receptores CB₁, como inhibidores de la recaptación, ya que son capaces de reducir la hiperquinesia y mejorar los déficits GABAérgicos en un modelo de ratas con enfermedad de Huntington. Nuevas hipótesis sugieren que, dada la posible alteración de los receptores CB₁ en etapas previas a la aparición de los síntomas, el tratamiento con cannabinoides podría ser utilizado como terapia protectora de la muerte neuronal que se produce en esta enfermedad (Fernández-Ruiz y cols., 2003).

5.4 EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS

En animales de experimentación tratados con dosis altas de Δ^9 -THC se ha comprobado que desaparecían tumores de mama, próstata, gliomas, epitelomas tiroideos y linfomas. Este efecto parece estar mediado por receptores CB₁, CB₂, y VR₁. Los cannabinoides estimulan las cascadas de MAPKs, ERK, kinasas activadas por estrés (JNK) y MAPK p38 (Rueda y cols., 2000; Derkinderen y cols., 2001). Actualmente se está investigando (ensayos en fase II) el efecto de la administración local de Δ^9 -THC sobre el crecimiento de glioblastoma multiforme en humanos (Guzman, 2003)

5.5 REGULACIÓN DE LA INGESTA

Aumentar la ingesta es deseable en determinadas situaciones clínicas entre las que se encuentran las inmunodeficiencias. Se ha llegado a sugerir que los agonistas cannabinoides en estas inmunodeficiencias no solo estimulan la sensación de apetito (Mechoulam, 1999) sino que además son efectivos para el tratamiento del dolor y la ansiedad que acompañan a estas patologías. (Watson y cols., 2000).

Los antagonistas cannabinoides podrían utilizarse para el tratamiento de la obesidad. Se ha demostrado que el agonista inverso del receptor CB₁, SR141716A, inhibe el aumento de la ingesta producido por la administración de anandamida (Williams y Kirkham, 1999). Es capaz de producir supresión del apetito y pérdida de peso al ser administrado a animales, y aunque se desarrolla tolerancia a la disminución del apetito, el peso de los animales tratados fue menor que el de los animales control durante todo el tiempo que duró el estudio (Colombo y cols., 1998). En el momento actual se encuentran

en marcha ensayos clínicos en humanos obesos con el antagonista selectivo rimonabant[®] (SR 141716A).

5.6 GLAUCOMA

La aplicación tópica de agonistas cannabinoides produce una disminución de la PIO. La administración sistémica de Δ^9 -THC no ha dado buenos resultados, pero actualmente se están desarrollando nuevos compuestos cannabinoides y profármacos, sin efectos sistémicos, para su aplicación tópica en el tratamiento del glaucoma (Buchwald y cols., 2000).

Los cannabinoides controlan la PIO en distintos tipos de glaucoma pero no son un tratamiento etiológico y han demostrado ser eficaces en glaucomas resistentes a tratamiento convencionales.

6 EFECTOS VASCULARES DE LOS CANNABINOIDES

Los efectos cardiovasculares de los cannabinoides y los mecanismos por los que se producen son numerosos y complejos. Entre todos los mecanismos postulados por la mayoría de los autores los principales son dependientes del endotelio. Debido a esto, se describen a continuación los más importantes mecanismos vasodilatadores producidos por factores derivados del endotelio.

6.1 FARMACOLOGÍA VASCULAR

La sangre es transportada desde el corazón a los tejidos a través de las arterias y las redes de capilares. Estas forman un amplio sistema de vasos que comienza con las arterias aorta y pulmonar, las cuales salen respectivamente del ventrículo izquierdo y derecho del corazón. Al irse alejando del corazón estos vasos se ramifican repetidamente dando con ello lugar a un gran número de arterias de calibre progresivamente decreciente.

La organización básica de la pared de todas las arterias es similar en cuanto a que se pueden distinguir tres capas concéntricas: 1) una capa interna, la *túnica íntima*, que consiste en un tubo endotelial cuyas células escamosas tienen su eje mayor orientado longitudinalmente.; 2) una capa intermedia, la *túnica media*, compuesta principalmente por células musculares lisas dispuestas circularmente; y 3) una capa externa, la *túnica adventicia*, constituida por fibroblastos y fibras colágenas asociadas que están orientadas en su mayor parte longitudinalmente. Esta capa externa se funde gradualmente con el tejido laxo alrededor de los vasos. El límite entre la túnica íntima y la túnica media está marcado por la *lámina elástica interna (elástica interna)*, la cual está especialmente bien desarrollada en las arterias de mediano calibre. Entre la túnica media y la túnica adventicia se puede distinguir en muchas arterias una más fina *lámina elástica externa (elástica externa)*.

Desde las arterias más grandes hasta los capilares existe una continua gradación en cuanto al diámetro y a las características de la pared vascular, pero las arterias generalmente se clasifican según su tamaño, el componente predominante de la túnica media y su función principal en 1) *arterias elásticas* (de conductancia), 2) *arterias musculares* (de distribución), y arteriolas.

La túnica adventicia de las grandes arterias elásticas, como la aorta, es relativamente fina y está constituida por fibroblastos, haces longitudinales de fibras colágenas y una red laxa de fibras elásticas finas. En su túnica media tienen paredes que poseen muchas capas fenestradas de elastina, mientras que la túnica íntima de estas arterias está formada por el *endotelio*, un epitelio fino escamoso separado de la elástica interna por un tejido conectivo laxo que contiene escasos fibroblastos, raras células musculares lisas y fibras finas de colágeno. El endotelio proporciona al vaso una capa de revestimiento lisa y una barrera parcialmente selectiva de difusión entre la sangre y las capas más externas de la pared vascular. Pero el endotelio no es solo una simple barrera o membrana de diálisis entre la sangre y los tejidos vecinos.

Si bien el endotelio actúa como una membrana semipermeable y además permite el transporte de macromoléculas desde la sangre al espacio intersticial, hoy día se lo reconoce como un sensor de los cambios de las fuerzas hemodinámicas y de los cambios de la concentración de hormonas circulantes o de sustancias locales vasoactivas. En respuesta a estos estímulos, las células endoteliales sintetizan y liberan diversas sustancias biológicamente activas. Los productos de secreción endotelial actúan como señales químicas que comunican a las células endoteliales no solo entre sí, sino con otras células de la pared vascular y con células de la sangre, y establecen una importante interrelación funcional.

Por medio de sus productos de secreción el endotelio vascular participa en la regulación del tono y la permeabilidad vascular, en la hemostasia, en respuestas proliferativas celulares y en mecanismos de defensa como las respuestas inflamatoria e inmune.

Todas estas propiedades funcionales convierten al endotelio vascular en un órgano regionalmente diferenciado del sistema cardiovascular. Este importante concepto obliga a considerar a las alteraciones funcionales del endotelio (disfunción endotelial) como mecanismos fisiopatológicos cruciales en el desarrollo de las enfermedades de dicho sistema.

6.1.1 Regulación endotelial del tono vascular

Una de las principales funciones del endotelio es mantener el tono vascular controlando la contracción y relajación del músculo liso subyacente. El endotelio vascular produce sustancias que al actuar sobre el músculo liso lo relajan (vasodilatadores) o lo contraen (vasoconstrictores).

6.1.2 Sustancias vasodilatadoras derivadas del endotelio

Las células endoteliales producen una serie de sustancias, algunas de ellas no del todo conocidas, que causan relajación del músculo liso vascular. Las más importantes son: óxido nítrico (NO), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y prostaciclina (PGI₂).

A) Óxido nítrico: Las células endoteliales, en respuesta a diferentes estímulos, producen una sustancia gaseosa que difunde y, al actuar sobre las células musculares lisas, causa su relajación.

Esta sustancia fue denominada por sus descubridores *factor relajante derivado del endotelio* (EDRF). La búsqueda de la identidad química del EDRF

se intensificó durante la década de los 80. Finalmente, los datos experimentales acumulados demostraron que el EDRF es el óxido nítrico (NO). El NO es sintetizado en la célula endotelial y difunde al músculo liso, al cual relaja. El efecto vasodilatador del NO es mediado por incremento de los niveles de GMPc que relaja al músculo liso al disminuir la concentración de Ca^{2+} en el citosol.

El NO se forma a partir de L-arginina por la acción de una enzima denominada *NO-sintasa* (NOS). La célula endotelial puede presentar dos isoformas de NOS:

1) NOS-constitutiva (cNOS), de la cual existen dos tipos: eNOS (NO-sintasa endotelial) y nNOS (NO-sintasa neuronal) ubicadas en la membrana celular y activadas por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Las cNOS transforman la L-arginina en L-citrulina liberando a su vez NO. Las cNOS son responsables de dos tipos de liberación de NO, una basal continua, que mantiene localmente el tono cuando los niveles del Ca^{2+} libre citosólico son bajos (50-140nM), y otra liberación estimulada, que ocurre en respuesta a estímulos fisiológicos que aumentan el Ca^{2+} libre citosólico. El NO formado disminuye la actividad de la enzima por un mecanismo de retroalimentación negativa, de modo que se convierte en un modulador de su propia síntesis. Diversas sustancias endógenas producen aumento del Ca^{2+} citosólico y conducen así a la liberación de NO.

1. NOS-inducible (iNOS), citosólica e independiente de Ca^{2+} . La síntesis de iNOS es inducida cuando actúan endotoxinas (lipopolisacáridos bacterianos) y citocinas sobre la célula endotelial. Esta síntesis es inhibida por los glucocorticoides. Una vez expresada, la enzima produce NO en forma sostenida.

B) Factor Hiperpolarizante derivado del endotelio:

Este factor que es liberado por el endotelio, hiperpolariza al músculo liso vascular y lo relaja. Aunque la identidad química del EDHF no está aún definida con exactitud, (Triggle y Ding, 2002) se sugiere que puede ser un metabolito del ácido araquidónico. No existe una liberación basal y continua de EDHF.

El EDHF abre canales de K^+ en la célula muscular lisa, lo que hace que ésta se hiperpolarice. Esta hiperpolarización cierra los canales de Ca^{2+} tipo L y disminuye la entrada de Ca^{2+} en la célula. Por tanto, la concentración de Ca^{2+} citosólico disminuye y esto provoca la relajación del músculo. Este efecto puede ser inhibido por distintas toxinas como charibdotoxina (bloqueante de canales de K^+ -voltaje dependientes y de Ca^{++} de alta conductancia activados por K^+), apamina (bloqueante de canales de Ca^{++} de baja conductancia activados por K^+), ouabaina, etc...

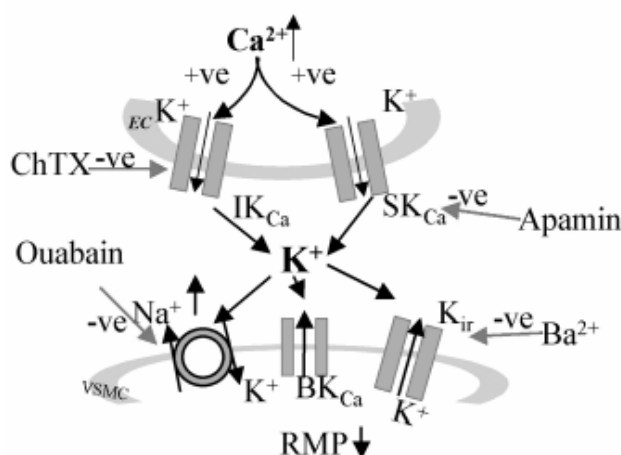


Fig. 12. Esquema del mecanismo de acción de bloqueantes de canales de K^+ . (Triggle y Ding, 2002)

C) Prostaciclina:

La prostaglandina I₂ (PGI₂), también llamada prostaciclina, fue el primer factor vasoactivo endotelial aislado e identificado por Moncada y colaboradores en 1976. La PGI₂ se sintetiza a partir del ácido araquidónico por medio de la acción de dos enzimas, primero la ciclooxigenasa y luego la PGI₂-sintasa. Al igual que el NO y el EDHF, la prostaciclina se sintetiza y libera en respuesta a estímulos fisiológicos que elevan el Ca²⁺ citosólico. El efecto vasodilatador de la PGI₂ es mediado por el aumento del AMPc en el músculo liso vascular. El AMPc relaja al músculo porque disminuye la concentración de Ca²⁺ en el citosol así como la afinidad de las proteínas contráctiles por el Ca²⁺.

7 EFECTOS DE CANNABINOIDES SOBRE EL APARATO CARDIOVASCULAR

En el aparato cardiovascular se han descrito varios tipos de células como fuente de endocannabinoides: células endoteliales, neuronas perivasculares, y células sanguíneas circulantes como plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos (Hillard, 2000).

Los macrófagos circulantes y las plaquetas activadas por hemorragias o endotoxinas sintetizan anandamida y otros cannabinoides que contribuyen a la producción de hipotensión (Varga y cols., 1998), especialmente en condiciones patológicas, como inflamación, shock séptico o migraña. En plaquetas la anandamida estimula la agregación plaquetaria.

7.1 EFECTOS CARDIOVASCULARES DE LOS ENDOCANNABINOIDES

Estos mecanismos han sido dilucidados al estudiar los efectos de cannabinoides, tanto endógenos como exógenos, en humanos, animales de experimentación, órganos aislados y cultivos celulares.

Múltiples estudios implican a los cannabinoides endógenos en la regulación cardiovascular. Sus efectos dependen del lecho vascular y de la especie animal y no pueden ser explicados por un mecanismo simple o por un solo lugar de acción. Hay evidencias farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas de que los cannabinoides regulan el tono vascular dependiente e independientemente del SNC. Recientemente se ha descrito que los endocannabinoides pueden proteger al corazón frente a la isquemia y reperfusión, reduciendo el tamaño de la zona infartada. Este efecto parece estar mediado a través de receptores CB₂ (Joyeux y cols., 2002; Bouchard y cols., 2003; Lepicier y cols., 2003).

El conocimiento del perfil fundamentalmente vasodilatador de los agonistas de receptores cannabinoides, y su potencial efecto cardioprotector, podría servir para establecer las bases de la función reguladora cardiovascular de estos compuestos y para desarrollar nuevos agentes terapéuticos útiles en patologías del aparato cardiovascular.

Aunque el mecanismo por el cual los cannabinoides atenúan o inhiben las contracciones producidas por varios agonistas vasoconstrictores (noradrenalina, fenilefrina, serotonina) no está del todo aclarado, mecanismos dependientes e independientes de receptores cannabinoides pueden estar implicados. Entre estos últimos se incluye hiperpolarización de la membrana, bloqueo de canales de Ca^{++} voltaje-dependientes (Gebremedhin y cols., 1999), e inhibición de la movilización del Ca^{++} de los depósitos intracelulares (Zygmunt y cols., 1997; White y Hiley, 1998).

Mecanismos dependientes de receptores cannabinoides

Se han propuesto varias localizaciones para los receptores:

1) Músculo liso vascular. Se ha descrito su presencia en el músculo liso vascular por ensayos de unión a receptores (Wagner y cols., 2001; Ho y Hiley, 2003; Sugiura y cols., 1998; Bilfinger y cols., 1998; Liu y cols 2000). En arterias cerebrales y mesentéricas de animales de experimentación, los cannabinoides estimulan directamente receptores CB_1 del músculo liso vascular reduciendo los flujos de Ca^{++} intracelulares y causando vasodilatación (Ellis y cols., 1995; Gebremedhin y cols., 1999; Ho y Hiley, 2003; Zoratti y cols., 2003). Esto concuerda con la evidencia de que la marihuana produce un aumento del flujo sanguíneo cerebral. Hay varios papeles fisiológicos posibles para este receptor, en arterias cerebrales que podría actuar como intermediario, acoplado la actividad metabólica de las neuronas al flujo sanguíneo cerebral (Hillard, 2000).

Este efecto podría ser de utilidad terapéutica para el tratamiento del vasoespasma cerebral.

2) Terminaciones nerviosas perivasculares. La presencia de estos receptores en las terminaciones nerviosas perivasculares del lecho mesentérico ha sido descrita por muchos autores (Ellis y cols., 1995; Zygmunt y cols., 1999; Ishioka y Bukoski, 1999; Högestätt y Zygmunt, 2002).

3) Endotelio Vascular. Finalmente, los receptores cannabinoides han sido identificados en las células del endotelio vascular: Esta localización es la más comúnmente aceptada y su estimulación el mecanismo mediador más probable de los efectos vasorrelajantes atribuidos a los cannabinoides (Deutsch y cols., 1997, Gebremedhin y cols., 1999; Sugiura y cols., 1998; Liu y cols., 2000; Wagner y cols., 2001).

Los receptores CB₁ han sido identificados en el endotelio por técnicas de RT-PCR en la vena umbilical humana (Sugiura y cols., 1998; Liu y cols., 2000) y por ensayos de unión a receptores (Sugiura y cols., 1998; Bilfinger y cols., 1998; Liu y cols 2000).

Asimismo la presencia de receptores CB₂ ha sido confirmada por secuenciado molecular en células endoteliales aisladas de arteria pulmonar de carnero (Zoratti y cols., 2003).

También se ha sugerido la presencia en estas células de un receptor para cannabinoides no CB₁/ no CB₂, llamado "receptor endotelial de anandamida" (Jarai y cols., 1999; Bukoski y cols., 2002, Offertaler y cols., 2003).

En 1999 Jarai y cols., propusieron la existencia de un receptor endotelial de anandamida diferente de CB₁ y CB₂, basándose en el hecho de que tanto la

anandamida como la metanandamida no producían hipotensión en ratones knock-out, pero sí vasodilatación en arterias mesentéricas aisladas de esos mismos ratones, efecto bloqueado por el antagonista CB₁, SR1417161A.

Utilizando un cannabinoide sintético denominado “cannabidiol anormal” (abn-cbd) que no se une al receptor CB₁ y carece de efectos psicotrópicos, pero que produce hipotensión en perros (Adams y cols., 1977), observaron que producía hipotensión dosis dependiente, sin afectar a la frecuencia cardíaca, tanto en ratones normales como en los carentes del gen del receptor CB₁, que también es bloqueada con SR1417161A.

Posteriormente se ensayó el abn-cbd en el lecho mesentérico perfundido de ratones carentes del receptor CB₁ y del CB₂ comprobando que producían vasodilatación, bloqueada también por SR1417161A.

En el lecho mesentérico perfundido de ratas normales con endotelio intacto obtuvieron los mismos resultados, llegando a la conclusión de la existencia de un receptor cannabinoide no CB₁ no CB₂ localizado en el endotelio ya que al eliminarlo este efecto desapareció. A pesar del tiempo transcurrido, aún no se ha llegado a caracterizar este nuevo receptor.

Mecanismos mediados por el receptor CB₁: La activación de los receptores CB₁ puede actuar directamente estimulando la cascada de la tirosin-kinasa (Liu y cols., 2000), canales de K⁺ (Randall y cols., 1996, 1997; Maingret y cols., 2001) y/o bloqueando canales de Ca⁺⁺ tipo L/Q (Gebremedhin y cols., 1999), o indirectamente modificando la liberación de factores derivados del endotelio: NO (Deutsch y cols., 1997; Stefano y cols., 1998; Macarrone y cols., 2000; Mendizabal y cols., 2001; Stefano y cols., 2003; Moezi y cols., 2004), prostaglandinas (PGs) (Ellis y cols., 1995; Pratt y cols., 1998), y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (Randall y cols., 1996; Randall y Kendall, 1998; Zygmunt y cols., 1998; Chaytor y cols., 1999).

Mecanismos independientes de receptor

Mecanismos diferentes a la activación de receptores cannabinoides han sido propuestos:

a) Activación de receptores VR_1 . Al activarse este receptor pueden ser liberadas sustancias vasodilatadoras como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la sustancia P y el ATP, que a su vez estimulan la liberación de prostanoïdes, NO y EDHF a nivel endotelial (Wagner y cols., 1997; Zygmunt y cols., 1999; Högestätt y Zygmunt, 2002; Ralevic y cols., 2002).

b) Biotransformación intracelular de anandamida a metabolitos vasoactivos por diversos enzimas: *FAAH*, *Citocromo P450*, *COX2* y *Lipooxigenasa*.

c) Activación de canales de K^+ . (Randall y cols., 1996; Randall y cols., 1997).

d) Bloqueo de canales de Ca^{++} (Gebremedhin y cols., 1999).

7.2 EFECTOS EN HUMANOS.

Los efectos de los cannabinoides en humanos son difíciles de determinar debido a su naturaleza subjetiva y a que solamente existen estudios limitados por razones éticas.

Los efectos cardiovasculares varían de unos individuos a otros. En general producen hipotensión y bradicardia. También dependen de la forma de administrarlos (aguda o continuada), de la vía de administración y del tono

simpático previo del individuo. La administración aguda, tanto cuando se fuma marihuana como cuando se administra Δ^9 -THC por vía intravenosa, produce pequeños aumentos de presión arterial y taquicardia (Dewey, 1986). Administrados crónicamente se produce vasodilatación y bradicardia, debido a una disminución del tono simpático del organismo por inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores.

7.3 EFECTOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El mecanismo de activación de los receptores CB₁, y su papel en la función vascular, ha sido extensamente estudiado mediante ensayos con cannabinoides, tanto naturales como sintéticos, en animales de experimentación.

I EFECTOS *IN VIVO*

El efecto común a todas las especies animales producido por la administración de cannabinoides es la hipotensión y la bradicardia. Han sido administrados en animales conscientes y anestesiados por vía intramuscular, intravenosa o intracerebral (Gardiner y cols., 2001). En estos ensayos en animales anestesiados, el anestésico empleado puede alterar la intensidad del efecto, fundamentalmente el pentobarbital (Vidrio y cols., 1996); también puede variar si el animal respira espontáneamente o con respiración asistida (Niederhoffer y Szabo, 2003).

Se han hecho estudios en ratas (Varga y cols., 1995; Malinowska y cols., 2001), ratones (Jarai y cols., 1999), conejos (Ralevic, 2003; Ishac y cols., 1996; Niederhoffer y Szabo, 1999; Niederhoffer y cols., 2003; Gardiner y cols., 2002) y perros (Lake y cols., 1997) y en todos ellos se produce hipotensión.

Estos efectos se producen por inhibición del tono simpático, mediados por el receptor CB₁, aunque no se puede descartar la activación del sistema nervioso parasimpático a través del nervio vago. En el ganglio cervical superior de la rata ha sido detectado mRNA para el receptor CB₁. lo que implicaría a estos receptores en la modulación de la presión arterial (Varga y cols., 1995).

Se han ensayado varios grupos de compuestos: cannabinoides clásicos (THC, HU-210 y HU-211); no clásicos (WIN55212-2, CP55940, JWH-015) y cannabinoides endógenos (anandamida y palmitoiletanolamina). Los resultados difieren dependiendo del tipo de cannabinoide usado. El orden de potencia hipotensora se correlaciona con la mayor actividad psicotrópica y con la afinidad de los ligandos por el receptor CB₁ (Lake y cols., 1997). La mayor potencia hipotensora (y menos bradicardizante) es la producida por HU-210 que a su vez es el que produce mas alteraciones de conducta. El enantiómero HU-211, carente de efectos psicotrópicos, no produce efectos sobre el aparato cardiovascular. (Wagner y cols., 2001).

En algunos casos se presenta una respuesta trifásica como en ratas anestesiadas: 1) Bradicardia y una disminución de la presión arterial que dura unos segundos. Esta fase es mediada a nivel vagal, via el reflejo de Bezold-Jarish, y también por los receptores vanilloides presentes en las terminaciones nerviosas. 2) Efecto presor transitorio y 3) Una segunda disminución de la presión arterial más duradera. Este efecto es mediado por el receptor de cannabinoides CB₁ y se produce por inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores a nivel periférico (Varga y cols., 1995). Malinowska y cols., (2001) demostraron que la fase I se debe a activación de receptores vanilloides y la fase III a la estimulación del receptor CB₁.

En ratas espontáneamente hipertensas (SHR) la activación de receptores vanilloides contribuye al efecto hipotensor de anandamida (Kaminsky y Wang, 2003). Este efecto se produce por liberación de CGRP por las terminaciones

nerviosas sensoriales. En SHR se ha demostrado un aumento de la expresión del receptor del CGRP que aumentaría la sensibilidad de la presión sanguínea a anandamida lo que actuaría como un mecanismo compensador neutralizando el incremento de la presión arterial que presentan las ratas SHR (Li y cols., 2003).

Ensayos en conejos desmedulados han demostrado que el efecto hipotensor puede deberse a inhibición presináptica de la actividad simpática o a efectos colinérgicos. WIN55,212-2 reduce la presión arterial y las concentraciones plasmáticas de NA de una manera dosis y SR141716A-dependiente (Ralevic, 2003). Se propone la existencia de un receptor CB₁ localizado en las terminaciones nerviosas simpáticas cardiacas, cuya estimulación inhibe la liberación de NA (Ishac y cols., 1996; Niederhoffer y Szabo, 1999; Niederhoffer y cols., 2003; Gardiner y cols., 2002).

Jarai y cols. (1999). propusieron la existencia de un receptor endotelial de anandamida diferente de CB₁ y CB₂. Recientemente se ha sintetizado un antagonista selectivo del receptor vascular endotelial, O-1918, que bloquea la vasorrelajación de las arterias mesentéricas producida por anandamida, interactuando con sitios distintos de los receptores CB₁ y CB₂, lo que apoya la teoría de la implicación de un receptor cannabinoide diferente de los conocidos hasta el momento (Offertáler y cols., 2003).

II EFECTOS *IN VITRO*

Los efectos vasculares dependen del tipo de arteria: en general en arterias de conductancia, como es la arteria aorta, se produce vasorrelajación, pero en arterias de resistencia como es la mesentérica los efectos son variables (O'Sullivan y cols., 2004).

El efecto relajante de los agonistas en la mayoría de los vasos sanguíneos se establece lentamente (entre 15-20 min), se completa en una

hora aproximadamente, y puede ser endotelio-dependiente e independiente (Lake y cols., 1997; Pratt y cols., 1998; Chaytor y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Gotopoulos y cols., 2001; Grainger y Boachie-Ansah, 2001; Wagner y cols., 2001).

En tiras precontraídas de arteria hepática de rata, basilar de cobayo y arteria cerebral de gato producen relajación endotelio-dependiente por activación de receptores CB₁ de la musculatura lisa y por apertura de canales de Ca⁺⁺ tipo L en las mismas células. Este efecto es bloqueado por toxina pertussis y por el antagonista del receptor CB₁ SR141716A. (Jarai y cols., 1999; Zygmunt y cols., 1999;). HU-210, anandamida y R(+)-metanandamida, producen relajación en arterias coronarias y cerebrales que es bloqueado por pretratamiento con SR141716A. Los mismos efectos son de menor intensidad en vasos renales (Lake y cols., 1997; Wagner y cols., 2001).

Hasta la fecha solamente se han realizado ensayos en aorta de conejo con R(+)-metanandamida, donde se produce relajación, mediada en parte por liberación de NO por el endotelio y en parte por activación de receptores vanilloides VR₁, no dependientes de proteínas G, como demuestra el hecho de que son insensibles al tratamiento con toxina pertussis. (Mukhopadhyay y cols. 2002).

Como prototipo de arterias de resistencia, las arterias mesentéricas aisladas y perfundidas de la rata han sido las mas estudiadas, (Wagner y cols., 1999;Ralevic y cols., 2000; Ralevic y cols., 2001; Ralevic y Kendall, 2001; Ralevic y Kendall, 2002). Se ha comprobado que el efecto de anandamida es mediado parcialmente por: a) el endotelio, o factores derivados del mismo, y b) parcialmente por mecanismos independientes de ambos y que podría ser indicativo de la activación de receptores vanilloides VR₁ (Zygmunt y cols., 1999).

Más recientemente O'Sullivan y cols (2004) han demostrado que el cannabinoide N-araquidonil-dopamina (NADA) produce relajación vascular en arterias aorta y mesentéricas de la rata. Solamente se estudió el mecanismo efector en mesentéricas. El efecto es distinto dependiendo de la rama mesentérica estudiada. En las pequeñas ramas de estas arterias el efecto se produce a través de receptores VR_1 y probablemente del receptor endotelial de anandamida, y en la mesentérica superior a través de CB_1 y VR_1 , lo que indica que en esta última el efecto es independiente del endotelio.

III EFECTOS EN CULTIVOS CELULARES

En cultivos celulares se han estudiado y propuesto diversos mecanismos mediadores de la actividad cannabinoide:

- En células endoteliales pulmonares bovinas se ha demostrado que la anandamida produce depleción de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico que es prevenida solamente por el antagonista del receptor CB_2 SR144528 (Zoratti y cols., 2003).
- En células endoteliales de vena umbilical humana varios autores proponen que, tanto el receptor CB_1 como el receptor endotelial de anandamida están acoplados a la cascada de MAPKs (Liu y cols., 2000; Offertáler y cols., 2003).
- En células de músculo liso vascular se produce bloqueo de canales de Ca^{++} tipo L, canales de K^+ , producción de AMPc y la liberación de Ca^{++} de los depósitos intracelulares (Van der Bossche y Vanheel, 2000).

8 REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES DE LOS ANÁLOGOS DE CANNABINOIDES SINTÉTICOS

Desde la caracterización del sistema endocannabinoide, se han realizado notables avances en la síntesis de compuestos con una acción selectiva sobre las proteínas-claves del funcionamiento de este sistema (receptores, transportador, enzimas) y que pudieran ser susceptibles de usarse en algunas patologías. Se han desarrollado agonistas:

(i) con una mayor estabilidad metabólica que la anandamida, como la R-R(+)-metanandamida

(ii) con afinidad selectiva por los diferentes subtipos de receptor para cannabinoides, como los compuestos HU-308 o JWH-133, que son los primeros agonistas selectivos de los receptores CB₂, y que aportan la novedad de carecer de efectos psicotrópicos al ser incapaces de unirse al receptor CB₁, pero ser capaces de producir diversos efectos periféricos como reducción de la presión sanguínea o inhibición de la motilidad intestinal, así como tener una acción antiinflamatoria y analgésica a nivel periférico

(iii) que mejoran las condiciones de solubilidad acuosa de los cannabinoides, como el O-1057 lo que deberá favorecer las formas de administración de estos compuestos cuyo carácter altamente hidrofóbico limitaba su uso terapéutico.

Otros compuestos sintetizados recientemente se comportan como inhibidores del supuesto transportador de endocannabinoides, como el AM404 o el VDM11, potenciando la acción de éstos. Se han desarrollado inhibidores de la actividad amidohidrolasa, como el AM374 y el PMSF, que también prolongan la actividad endocannabinoide.

Estos compuestos podrían ser útiles en aquellas patologías en las que se ha demostrado una pérdida de actividad endocannabinoide, y al actuar prolongando la presencia de los ligandos endógenos se minimizan los efectos psicotrópicos que se observan con el uso de agonistas directos CB₁. También se han desarrollado antagonistas selectivos de los receptores CB₁ y CB₂ capaces de bloquear las acciones *in vivo* e *in vitro* de los cannabinoides y que serían útiles en aquellas disfunciones en las que se postula una hiperactividad del sistema endocannabinoide.

8.1 DISEÑO DE NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE TRIAZOLES (LHs)

Los nuevos compuestos cannabinoides estudiados en este trabajo fueron sintetizados por el equipo de Química médica del CSIC dirigido por la doctora Pilar Goya. Para el diseño de estos compuestos se determinó un modelo de farmacóforo de los receptores cannabinoides.

Debido a que no se dispone en la actualidad de la estructura cristalográfica de ninguno de los dos receptores cannabinoides conocidos, la determinación del modelo de farmacóforo se ha basado en ligandos cannabinoides descritos en la bibliografía, y en estudios previos de los requisitos estructurales mínimos para la interacción con los receptores CB₁ y CB₂.

Los ligandos seleccionados pertenecen a distintas familias químicas. Concretamente fueron elegidos tres cannabinoides clásicos: el propio Δ^9 -THC, la nabilona y el cannabinoil; y tres heterocíclicos: el pirazol SR141716, el aminoalquilindol JWH018 y el aminoalquilpirrol JWH030.

Debido a los bajos rendimientos en el caso de estos compuestos, en la síntesis de los nuevos 3-alkil-1,5-diaril-1*h*-1,2,4-triazoles (denominados LHs)

se decidió emplear el método sintético descrito por Paulvannan y cols. (2000) vía cloruros de hidrazonilo.

9 ENSAYOS CON CANNABINOIDES

Para el estudio del sistema cannabinoide y los efectos de los diferentes compuestos cannabinoides existen múltiples ensayos clásicos. La evaluación farmacológica de los cannabinoides se inicia con estos ensayos aunque la interpretación de los resultados se complica por varios motivos:

1) El mayor problema que se presenta a la hora de estudiar los cannabinoides es la dificultad para disolverlos, debido a su gran lipofilia y su baja solubilidad en agua. Esto obliga a utilizar vehículos no acuosos como: etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), polivinilpirrolidona, tween 80, cremophor, emulphor y albúmina sérica bovina (BSA) (Lopez-Miranda y cols., 2004). Por lo tanto, es indispensable hacer experimentos control con el vehículo para descartar efectos debidos a él.

2) La mayoría de los compuestos con actividad cannabinoide producen mas de un efecto farmacológico, incluso independientemente de las dosis. Como ejemplo, la anandamida estimula tanto receptores cannabinoides como vanilloides; el WIN 55212-2 es un agonista de receptores CB₁ y CB₂ pero también se comporta como inhibidor del enzima COX2 responsable de la oxidación de anandamida; el AM404, inhibidor del transportador de anandamida activa también receptores vanilloides (Zygmunt y cols., 2000).

Tanto el antagonista selectivo de receptores CB₁, SR141716A, como el de receptores CB₂, SR144528, se comportan como agonistas inversos (Bouaboula y cols., 1999; Rhee y Kim, 2002). Además a altas dosis el SR141716A inhibe la respuesta vasodilatadora a capsaicina mediada por receptores vanilloides VR₁ (Zygmunt y cols., 1999; Hillard, 2000; Ralevic y cols., 2002).

9.1 ENSAYOS “*IN VIVO*”

Los cannabinoides producen un amplio rango de efectos farmacológicos en el ratón, aunque ninguno de ellos se puede considerar específico de los cannabinoides, pero si su aparición conjunta. Este es el primer ensayo que debe ser realizado para comprobar la actividad cannabinoide de un compuesto. Esta respuesta se conoce como “tetrada de actividad cannabinoide”:

Al administrar a un ratón agonistas cannabinoides el animal presenta un cuadro típico, con cuatro efectos, en el mismo espacio de tiempo: reducción de la actividad espontánea en el test de campo abierto, hipotermia rectal, analgesia en ditintos test (“tail flick, placa caliente”), inmovilidad si se coloca al ratón en un anillo (catalepsia) (Martin y cols., 1987; Compton y cols., 1993; Pertwee, 1972). Se ha demostrado que el SR141716A es muy efectivo bloqueando estos efectos, lo que confirma la implicación del receptor CB₁, en la producción de los mismos. Además el rango de potencia de los cannabinoides se correlaciona con su afinidad por el receptor CB₁.

2. Ataxia estática en el perro: Estos fueron los primeros ensayos en animales de experimentación con Δ^9 THC. Los cannabinoides producen en el perro la combinación de los siguientes efectos: sedación, catalepsia, descoordinación motora e hiperexcitabilidad. Los resultados que se obtienen en estos experimentos se correlacionan con la intensidad de los efectos psicoactivos de la sustancia administrada (Walton y cols., 1937).

Otros ensayos comprenden: cambios comportamentales en monos, autoadministración de drogas en ratas y monos y efectos sobre la memoria. (Howlett y cols, 2002)

9.2 ENSAYOS "IN VITRO"

Hay un gran número de ensayos "in vitro" para estudiar la naturaleza cannabinoide de un compuesto. Entre ellos el principal es la inhibición de las contracciones inducidas eléctricamente en preparaciones de músculo liso aislado. Los dos tejidos mas utilizados son el conducto deferente de ratón y la fibra longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobayo.

El uso de estas preparaciones se basa en que los cannabinoides son capaces de inhibir las contracciones producidas por estimulación eléctrica. Este efecto se produce al inhibir la liberación de neurotransmisores por unión al receptor presináptico CB₁ (Pertwee,1997). Como un gran número de sustancias no cannabinoides pueden producir también este efecto, se debe asegurar la implicación de receptores cannabinoides bloqueándolos con un antagonista.

1 ESTUDIAR EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS CANNABINOIDES SOBRE AORTA AISLADA DE RATA.

Los efectos de los cannabinoides sobre vasos sanguíneos han sido estudiados principalmente en arterias mesentéricas, como prototipo de vasos de resistencia, pero existen pocos trabajos en vasos de conductancia, y ninguno en arteria aorta de rata.

El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar el mecanismo de acción mediante el cual dos cannabinoides de distinta naturaleza química, R-(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 producen vasorrelajación en aorta de rata precontraída con fenilefrina. Se estudiará la implicación del endotelio y de sus receptores, además de las principales vías, descritas hasta el momento, como mediadoras de la actividad vascular de los cannabinoides.

2 VALORACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CANNABINOIDE

En la segunda parte se ensayarán nuevos compuestos de naturaleza cannabinoide derivados triazoles trisustituidos, sintetizados por un equipo de Química Médica del CSIC dirigido por la Dra. Pilar Goya.

Estos compuestos se ensayarán en conducto deferente de ratón con objeto de caracterizar el efecto agonista o antagonista. En el caso de que sean activos se ensayarán sus efectos in vivo sobre comportamiento y analgesia. Los resultados obtenidos se compararán con compuestos de reconocida actividad cannabinoide. Esta comparación nos permitirá valorar su posible selectividad.

1 EFECTOS VASCULARES DE R(+)-METANANDAMIDA Y WIN55,212-2

1.1 MATERIAL

1.1.1 Fármacos y reactivos utilizados.

Los fármacos utilizados fueron los siguientes:

- ✓ **17-ODYA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Inhibidor de CYP450
- ✓ **AM404** (*TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España*). Inhibidor del transportador de anandamida.
- ✓ **APAMINA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). bloqueante de canales de Ca^{++} de baja conductancia activados por K^+ .
- ✓ **CAPSAICINA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Agonista VR.
- ✓ **CAPSAZEPINA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Antagonista VR.
- ✓ **CARBACOL** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Agonista colinérgico
- ✓ **CGRP 8-37 (rata)**: (*TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España*). Peptido antagonista de los receptores CGRP1.
- ✓ **CHARIBDOTOXINA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). bloqueante de canales de K^+ -voltaje dependientes y de Ca^{++} de alta conductancia activados por K^+ .
- ✓ **FENILEFRINA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Agonista alfa₁ adrenérgicos
- ✓ **INDOMETACINA** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Antagonista de Ciclooxygenasa₁/Ciclooxygenasa₂.
- ✓ **L-NAME** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*): Inhibidor de Oxido Nítrico Sintasa.

- ✓ **METANANDAMIDA** (*TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España*).

Agonista CB₁.

- ✓ **PMSF** (*Sigma-Aldrich, Madrid. España*). Inhibidor de FAAH.
- ✓ **SR141716A** (*SANOFI, París. Francia*). Antagonista CB₁.
- ✓ **SR144825** (*SANOFI, París. Francia*). Antagonista CB₂.
- ✓ **TOXINA PERTUSSIS** (*Research Biochemicals International, MA. USA.*)

Bloqueante de proteínas G

- ✓ **WIN 55,212-2** (*TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España*).

Agonista CB₁/CB₂.

Reactivos habituales de laboratorio (Solución fisiológica de Krebs).

1.1.2 Preparación de la Solución Fisiológica de Krebs

Para llevar a cabo los experimentos, se utilizó solución de Krebs, preparada según las modificaciones de Henseleit (Krebs y Henseleit, 1932), que se preparó como se describe a continuación:

- 2 gramos de glucosa
- 2 gramos de bicarbonato
- 84 ml de solución Krebs “madre”
- cantidad suficiente de agua destilada para enrrasar a 1 litro.

Se agita hasta obtener una solución homogénea con la siguiente composición:

- Sodio.....143.3 mM
- Potasio..... 5.9 mM
- Calcio..... 2.7 mM
- Magnesio..... 1.2 mM
- Cloro..... 128.3 mM
- Fosfato..... 2.2 mM
- Bicarbonato... 24.9 mM
- Sulfato..... 1.2 mM
- Glucosa..... 11.0 mM

1.1.3 Disolución de los fármacos

A Disolución de cannabinoides

Debido a la escasa solubilidad de los cannabinoides, la disolución de todos los fármacos se realizó, siguiendo la técnica descrita por Pertwee en 1992. Pero al observar que el Tween 80 a la dosis utilizada dañaba el endotelio de las preparaciones de arteria aorta de rata se procedió a disolverlos según la siguiente técnica:

En primer lugar se prepara una solución madre etanólica que recibe el nombre de solución stock y debe mantenerse congelada y protegida de la luz.

Se elimina el etanol por evaporación (calentando a 37°C y a vacío) y se dispersa en una solución de DMSO al 0,5%, para conseguir una disolución madre de molaridad 10^{-2} . Para asegurar que la dispersión sea homogénea, la solución de DMSO 0.5% se va añadiendo en una serie de alícuotas de volumen creciente, la mezcla se irá agitando en vortex entre cada adición de las alícuotas.

La dispersión se prepara diariamente y se mantiene protegida de la luz.

Los experimentos control, para comprobar que el vehículo es inerte, se hacen con una disolución de DMSO 0,5%.

B Disolución de antagonistas

Los compuestos L-NAME, CGRP 8-37, fenilefrina, carbacol, toxina pertussis, charibdotoxina y apamina se disolvieron en agua. Mientras que los compuestos SR141716A, SR144528, indometacina, capsaicina, capsazepina, PMSF, AM404 y 17-ODYA se disolvieron en etanol absoluto.

1.2 APARATOS

1.2.1 Baño de órganos y sistema de registro de contractilidad vascular

Para realizar el montaje de las preparaciones, se utilizó un baño de órganos formado por una copa de vidrio con capacidad para 10 ml, con una toma conectada a una bomba de gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y a un termostato que mantiene una temperatura constante, en el baño, de 37 °C (figura 13).

El sistema se conectó a dos soportes y estos a su vez a un transductor isométrico.

1.2.2 Sistema de registro de contractilidad vascular

La actividad contráctil de las preparaciones se registró mediante transductores fuerza-desplazamiento (Grass FT03; Yokogana 3021), conectados a dos polígrafos de dos canales cada uno (Omniscribe serie D-5000 y Linseis modelo L 6512). Otro sistema de registro utilizado fue un sistema informático acoplado al programa MacLab/4e (paquete informático Chart v3.4).

1.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas Wistar macho, con peso comprendido entre 250-300g procedentes del Animalario de la U.C.M. (ANUC).

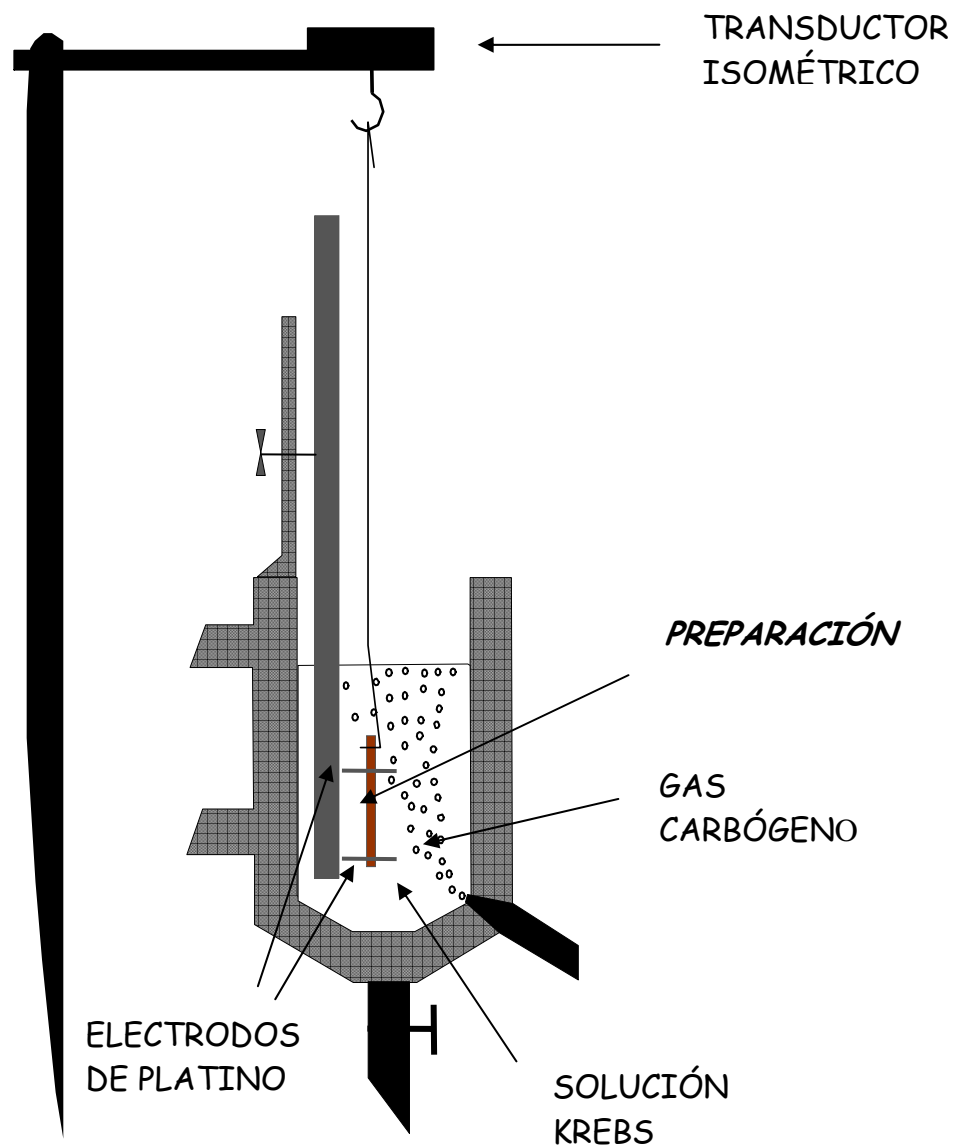


Figura 13. Esquema del montaje de las preparaciones en el baño de órganos.

1.4 MÉTODOS

1.4.1 Obtención de las preparaciones

A Aislamiento de anillos de aorta de rata

Después del sacrificio del animal se procedió a la disección y extracción de la arteria aorta torácica. Se accedió a ella por disección de la piel y de la musculatura torácica. A continuación se identificó la aorta descendente, se limpió y se extrajo, introduciéndola inmediatamente en una placa Petri que contiene una solución de Krebs bicarbonato frío.

Se eliminaron tejido conectivo y graso y una vez limpio, se procedió a cortar las arterias en anillos de 0,3 cm aproximadamente. En el caso de los experimentos sin endotelio, este se eliminó por raspado de la pared interior de la arteria.

Los anillos de aorta se suspendieron entre dos soportes de acero y se introdujeron en un baño de órganos sometiéndolas a una tensión de 2 g. Se estabilizaron durante 1 h.

1.4.2 Protocolo experimental

A Preparaciones de aorta de rata

Una vez estabilizadas las preparaciones, se comprobó la respuesta al efecto vasoconstrictor de fenilefrina a una dosis de 1 μ M, que fue establecida previamente en este trabajo y que mantiene la contracción durante todo el tiempo que dura el experimento, para comprobar la presencia de endotelio se empleó carbacol 10 μ M. Se desecharon todas las preparaciones que

presentaran una relajación menor de 50%. En los experimentos en los cuales se eliminó el endotelio se rechazaron aquellas con una relajación $\geq 10\%$.

Una vez que la contracción llegó al acmé, se añadieron al baño dosis crecientes de los agonistas (10^{-9} - 10^{-4} M) hasta construir la curva concentración-respuesta. Estos experimentos se llevaron a cabo en arterias con y sin endotelio.

Al comprobar que los cannabinoides carecían de efecto en ausencia de endotelio, el resto de los experimentos se realizaron en arterias con endotelio intacto.

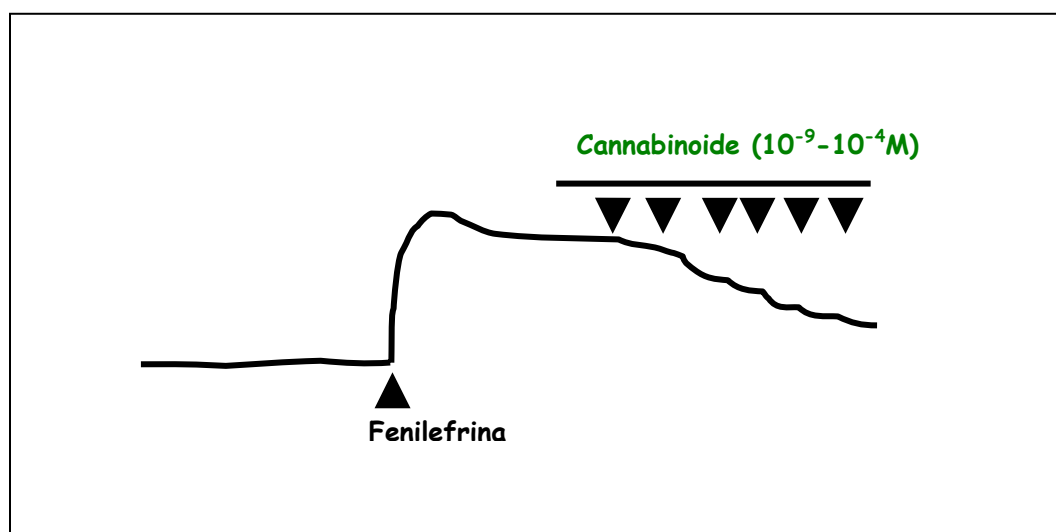


Fig.16 Representación de un experimento mostrando los pasos seguidos en una preparación de aorta de rata.

Cuando las curvas se construyeron en presencia de antagonistas estos se añadieron al baño antes que la fenilefrina a distintos tiempos dependiendo del compuesto (Tabla 2).

Los resultados se presentan como % del efecto máximo inducido por R(+)-metanandamida o WIN 55212-2.

ANTAGONISTA	DOSIS	TIEMPO INCUBACIÓN (min)	AGONISTA
AM404	10 μ M	30	Metanandamida
CAPSAZEPINA	100 nM	30	Metanandamida Win 55,212-2
CAPSAICINA	10 μ M	60	Metanandamida Win 55,212-2
CHARIBDOTOXINA + APAMINA	100nM	15	Metanandamida Win 55,212-2
INDOMETACINA	50 μ M	15	Metanandamida Win 55,212-2
L-NAME	100 μ M; 10 μ M	30	Metanandamida Win 55,212-2
PMSF	200 μ M, 100 μ M	30	Metanandamida
PTX	300ng/ml	180	Metanandamida Win 55,212-2
SR141716A	1 μ M, 3 μ M, 6 μ M	15	Metanandamida Win 55,212-2
SR144528	1 μ M, 3 μ M, 6 μ M	15	Metanandamida Win 55,212-2
SR141716A+SR144528	1 μ M	15	Metanandamida Win 55,212-2
CGRP 8-37	3 μ M	30	Metanandamida Win 55,212-2
17-ODYA	5 mM	30	Metanandamida

Tabla 2. Grupos experimentales, dosis y tiempo de incubación de los antagonistas

2 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE NUEVOS CANNABINOIDES

2.1 ENSAYOS IN VITRO : CONDUCTO DEFERENTE DE RATÓN

2.1.1 Material

A Fármacos y reactivos utilizados.

✓ **AM 251**(TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España).
Antagonista CB₁.

✓ **ANANDAMIDA** (TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España).
Agonista CB₁.

✓ **SR141716A** (SR) (SANOFI, París. Francia). Antagonista CB₁.

✓ **WIN 55,212-2** (Win) (TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España). Agonista CB₁/CB₂.

Nuevos compuestos cannabinoides sintetizados por el equipo de Química Médica del CSIC denominados **LHs.**:

LH 1.21	LH 30a
LH 1.11	LH 28a
LH 1.20	LH 25a
LH 304	LH 31a
LH 1.10a	LH 40
LH 1.16	LH 27
LH 1.22	LH 318
LH 1.29	
LH 214	
LH 39	
LH 36a	

I Disolución de los Fármacos Cannabinoides

Debido a la escasa solubilidad de los cannabinoides, la disolución de todos los fármacos se realizó, siguiendo la técnica descrita por Pertwee en 1992, y que a continuación se describe:

En primer lugar se prepara una solución madre etanólica de molaridad 10^{-2} que recibe el nombre de solución stock y debe mantenerse congelada y protegida de la luz.

Una alícuota de esta disolución stock alcohólica se mezcla con dos partes (peso/peso) de Tween 80, se elimina el etanol por evaporación (calentando a 37°C y sometiendo al vacío) y se dispersa en solución salina para obtener un mililitro de la disolución. Para asegurar que la dispersión sea homogénea, la solución salina se va añadiendo en una serie de alícuotas de volumen creciente ($50\ \mu\text{l} \times 2$, $100\ \mu\text{l} \times 2$, $200\ \mu\text{l}$ y $500\ \mu\text{l}$), la mezcla se irá agitando en vortex entre cada adición de las alícuotas.

Esta dispersión se puede disolver de manera seriada. Estas disoluciones pueden hacerse mezclando como máximo una parte (volumen) de la dispersión con nueve partes (volumen) de solución salina.

La dispersión se prepara diariamente y se mantiene protegida de la luz.

Los experimentos control, para comprobar que el vehículo es inerte, se hacen con Tween 80.

B Aparatos

I Baño de órganos

Para realizar el montaje de las preparaciones de conducto deferente de ratón y el registro de la contractilidad se utilizó el mismo sistema que en los ensayos de arterias aortas aisladas de rata.

Este se conectó a dos electrodos de platino en forma de anillo y este a su vez a un transductor isométrico.

C Animales de experimentación

Se utilizaron ratones CD-1 macho, con peso comprendido entre 25-30g procedentes del Animalario de la U.C.M. (ANUC).

2.1.2 Métodos

A Obtención de las preparaciones

I Aislamiento de la preparación conducto deferente de ratón

Se utilizaron ratones CD-1, de 25 a 30 g. de peso, que fueron sacrificados mediante sección del paquete vásculo-nervioso del cuello y de la columna vertebral. Tras la disección de la piel y de la musculatura de la pared anterior del abdomen, se aislaron los conductos deferentes, y se mantuvieron en solución Krebs para su conservación. A continuación, se separaron y se retiraron los vasos que acompañan a cada deferente, para el mejor funcionamiento posterior del mismo, y se ataron los dos extremos con sendos hilos para su posterior montaje en un baño de órganos (Hughes y col., 1975).

II Montaje de las preparaciones

Para realizar el montaje de las preparaciones, se utilizó un baño de órganos formado por una copa de vidrio con capacidad para 10 ml., que se llenó con 5 ml. de solución Krebs, se burbujeó con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y se mantuvo a una temperatura en el baño de 37 °C.

El sistema de **estimulación eléctrica** está formado por dos electrodos de platino en forma de anillo, conectados a un transductor isométrico y a un estimulador. La preparación se fija por un extremo al anillo inferior y se pasa por el interior del anillo superior fijando el extremo libre a un transductor isométrico, con una tensión basal de 0.5 gr y un tiempo de reposo o estabilización para las mismas de 45 min.

En la estimulación eléctrica de las preparaciones, se empleó un estimulador Cibertec CS-20 acoplado a un MacLab/4e (paquete informático Chart v 3.4). Se emplearon trenes de estímulos (frecuencia de 15 Hz., duración de 0.2 ms. y voltaje supramaximal), de 1 seg. de duración, repetidos a intervalos libres de estimulación de 1 min.

B Protocolo experimental

Transcurrido el período de estabilización de las preparaciones, se comprobó la funcionalidad de las mismas mediante su estimulación eléctrica. Se desecharon aquellas preparaciones cuya respuesta contráctil era menor de 0.25 gr. Cada preparación se utilizó para la realización de un sólo experimento.

I Valoración de la actividad farmacológica de los nuevos compuestos.

Para la caracterización *in vitro* de la actividad farmacológica de los nuevos cannabinoides sintetizados, se llevaron a cabo ensayos sobre la preparación de conducto deferente de ratón, que presenta receptores de cannabinoides del subtipo CB₁. En este tipo de preparaciones las sustancias de naturaleza agonista cannabinoide presentan la capacidad de inhibir las contracciones inducidas eléctricamente.

Una vez que las preparaciones presentaron una respuesta contráctil estable, se realizaron curvas concentración-respuesta, siguiendo el siguiente protocolo:

Se estimulan las preparaciones durante 5 minutos, se lava la preparación y se deja estabilizar 10 minutos, se repite dos veces y se estimulan por tercera vez obteniéndose la contracción que tomamos como **basal**. Se lava la preparación y se añade el compuesto a estudiar a concentraciones crecientes de $2,7 \times 10^{-8} \text{M}$ a 10^{-6}M para los agonistas, se deja incubar durante 10 minutos pasados los cuales se procede a estimular durante un periodo de 5 minutos, estos periodos de incubación, estimulación y lavado se repiten hasta haber terminado de construir la curva concentración-respuesta.

Cuando se utilizaron antagonistas las dosis fueron de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} M cuando fuera necesario.

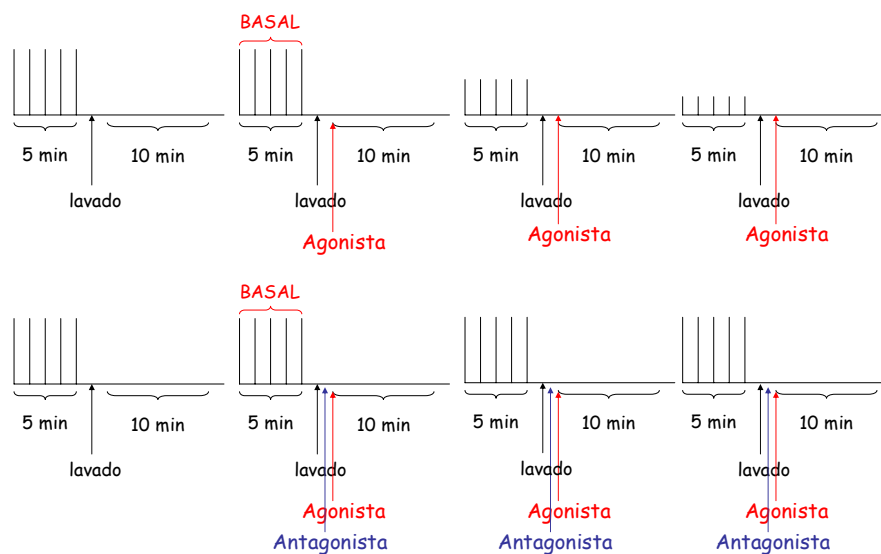


Fig.14: Esquema del protocolo experimental

Solo aquellos compuestos LH que fueron capaces de bloquear el efecto de una concentración 10^{-6} M de Win 55,212-2 añadida al final de cada curva, fueron probados como antagonistas construyendo curvas acumulativas de agonista en presencia de una dosis 10^{-6} M de los LHs. Las dosis ensayadas de agonistas y antagonistas se recogen en la tabla 3.

GRUPO	AGONISTA (concentración molar)	ANTAGONISTA (concentración molar)
1	WIN 55,212-2 (2,7x10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	AM251 (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸)
2	WIN 55,212-2 (2,7x10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	SR141716A (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸)
3	WIN 55,212-2 (2,7x10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	LH 1.21 (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷)
4	WIN 55,212-2 (2,7x10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	LH1.11 (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷)
5	WIN 55,212-2 (2,7x10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	LH 1.20 (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷)
6	ANANDAMIDA (2,7x10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	AM251 (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷)
7	ANANDAMIDA (2.7 x 10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	SR141716A (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷)
8	ANANDAMIDA (2.7 x 10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	LH 1.21 (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷)
9	ANANDAMIDA (2.7 x 10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	LH1.11 (10 ⁻⁶)
10	ANANDAMIDA (2.7 x 10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁶)	LH 1.20 (10 ⁻⁶)

2.2 **CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA (IN VIVO).**

2.2.1 Material

A Fármacos y reactivos utilizados.

Los fármacos utilizados fueron los siguientes:

- ✓ 5-(4-Clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-3-hexil-1*H*-1,2,4-triazol (**LH 1.21**)
- ✓ **SR141716A** (SR) (SANOFI, París. Francia). Antagonista CB₁.
- ✓ **WIN 55,212-2** (WIN) (TOCRIS, Biogen Científica S.L. Madrid. España). Agonista CB₁/CB₂.

Estos compuestos fueron disueltos siguiendo el protocolo de disolución de cannabinoides descrito por Pertwee (1992), ya explicado en el punto 1.1.3.A.

B Condiciones experimentales.

Para este trabajo se han utilizado ratones CD1 macho con peso comprendido entre 25-30g. suministrados por Harlan Ibérica de Barcelona. Los animales fueron mantenidos en jaulas, en grupos de 10, disponiendo de comida y agua "ad libitum". Los experimentos se realizaron 3 ó 4 días después de su llegada para facilitar la adaptación de los ratones a las condiciones ambientales del laboratorio. Se observó el comportamiento espontáneo antes y/o durante la realización de los distintos test. Aquellos roedores que mostraban anomalías del comportamiento eran descartados. Todos los experimentos se realizaron siempre a las mismas horas (entre las 9:00h y las 14h).

2.2.2 Métodos

A **Tétrada.**

La clásica tétrada cannabinoide evalúa temperatura, nocicepción, catalepsia y actividad locomotora. Para determinar estos parámetros, se utilizaron los siguientes test:

I TEMPERATURA:

La temperatura corporal del ratón se midió usando un termómetro P6 y una sonda rectal lubricada (CIBERTEC, España). La temperatura fue evaluada en cada animal antes y después de cada tratamiento.

II NOCICEPCIÓN:

La valoración de la nocicepción fue realizada con el test de la placa caliente, cuyo soporte físico lo constituye una placa metálica mantenida a una temperatura constante de 55 °C mediante la circulación de agua caliente por su interior. El tiempo (seg) que tarda el animal en lamerse las patas delanteras fue tomado como índice de nocicepción. Si transcurridos 30 segundos el animal no se había lamido las patas delanteras, era retirado de la placa para evitar daño tisular (tiempo de corte). La latencia fue medida antes del tratamiento, (tiempo control, TC), y 15 minutos después de cada tratamiento (tiempo latencia, TL), y la analgesia fue valorada según la fórmula del máximo efecto posible (M.E.P.).

$$\text{M.E.P.(\%)} = \frac{\text{TL} - \text{TC}}{30 - \text{TC}} \times 100$$

III CATALEPSIA:

La catalepsia fue medida realizando el test del anillo (“ring test”), similar al descrito por Pertwee en 1972 . El sistema consiste en un anillo de metal (6 cm de diámetro), fijado de forma horizontal y suspendido a una altura de 20 cm del suelo. Los agonistas cannabinoides CB₁ producen catalepsia al animal. Los ratones fueron colocados en el anillo y observados durante un periodo de 5 minutos. Se valoró el tiempo total (seg) de inmovilidad.

IV ACTIVIDAD LOCOMOTORA:

La actividad locomotora espontánea fue evaluada con un actímetro (CIBERTEC, España), que consiste en unas cámaras individuales con células fotoeléctricas. Los ratones fueron colocados en las cámaras y la movilidad espontánea fue medida como el número de cruces o cortes del campo fotoeléctrico durante 30 minutos.

B Protocolo experimental

Los animales fueron separados en grupos de 10 ratones. Los tratamientos administrados (vía i.p.) y el protocolo seguido fueron los siguientes:

- ✓ Solución salina o vehículo (grupo control).
- ✓ WIN (1.5 mg/Kg).
- ✓ LH1.21 (0.25, 0.50, 1 y 5 mg/Kg).
- ✓ LH1.21 (0.25, 0.50, 1 mg/Kg) + WIN (1.5 mg/Kg).
- ✓ SR 141716 A (1 y 5 mg/Kg) .
- ✓ SR 141716 A (1mg/Kg) + WIN (1.5 mg/Kg).

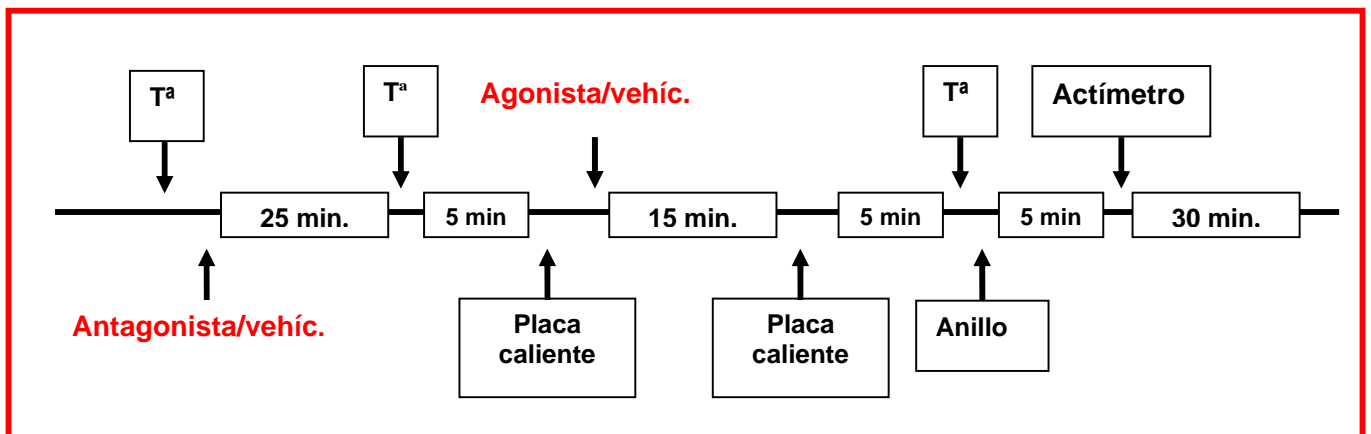


Fig. 15. Protocolo experimental

1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se presentan como la media de los valores obtenidos \pm el error estándar de la media (E.E.M.) de 5 a 10 resultados para los experimentos *in vitro* y de 8 a 10 animales para los experimentos *in vivo*. Los datos fueron estadísticamente analizados mediante el programa informático Prisma 2.1., utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías según se considere más adecuado, seguido, cuando es necesario, de un test post Hoc (Newman-Keuls o Bonferroni).

Se ha considerado una diferencia estadísticamente significativa a partir de una probabilidad de $p < 0.05$.

1 MECANISMO DE ACCIÓN VASODILATADOR DE R(+)-METANANDAMIDA Y WIN 55,212-2 EN ANILLOS DE ARTERIA AORTA DE RATA.

1.1 Efecto de DMSO 0.5%

En primer lugar se comprobó que el solvente utilizado para disolver los compuestos cannabinoides (DMSO 0,5%) no producía ningún efecto sobre las aortas, tanto sobre la basal como precontraídas con fenilefrina 10^{-6} M, ni la vasorrelajación inducida por carbachol. (Fig. 17).

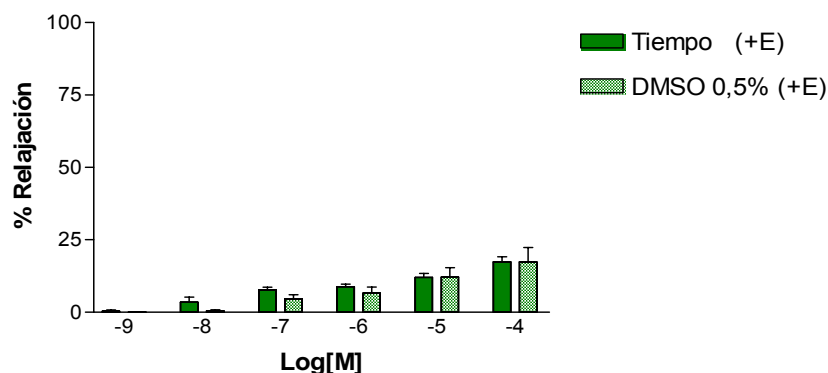


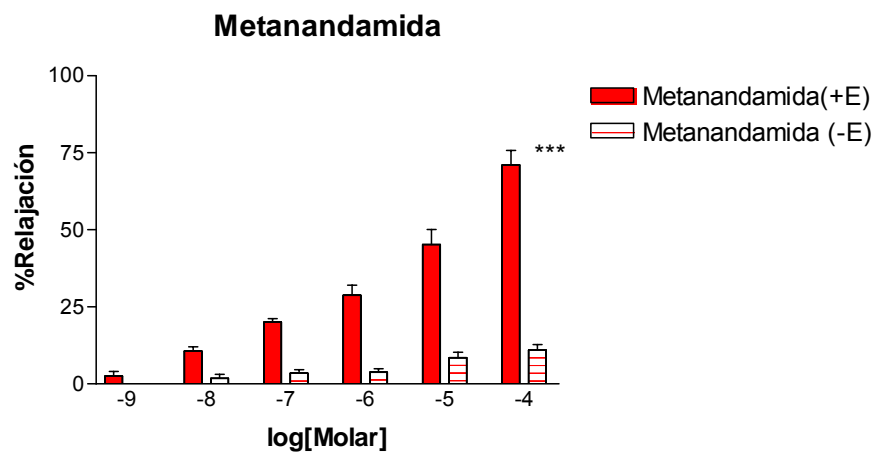
Fig. 17. Efecto de DMSO 0,5% y tiempo sobre la contracción inducida por fenilefrina $1\mu\text{M}$ en aorta aislada de rata.

1.2 Efecto de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 sobre arteria aorta de rata precontraída con fenilefrina.

Como muestra la fig 18 (A), la R(+)-metanandamida produjo una relajación concentración-dependiente de los anillos intactos de aorta de rata precontraídas con FE, con una respuesta máxima (R_{max}) de $71.04\% \pm 4.7$ ($n=6$). La figura 18 (B) muestra que el WIN 55,212-2 también produjo una relajación concentración-dependiente. Este efecto vasorrelajante fue significativamente menor que el producido por R(+)-metanandamida con una R_{max} de $52,87\% \pm 6.2\%$ ($n=17$). En ambos casos la relajación fue gradual y alcanzó el acmé a los 7-10 min. En las figuras se observa que tras la

eliminación del endotelio no hay respuesta vasodilatadora a los agonistas cannabionoides: *R(+)-metanandamida* con una R_{max} de $10.94\% \pm 1.85\%$ ($n=6$), y *WIN 55,212-2* con una R_{max} de $17.58\% \pm 1.8\%$ ($n=6$). Ambas R_{max} son similares a las obtenidas con el vehículo, *DMSO 0.5%*, (R_{max} de $17.39\% \pm 4.98\%$).

A)



B)

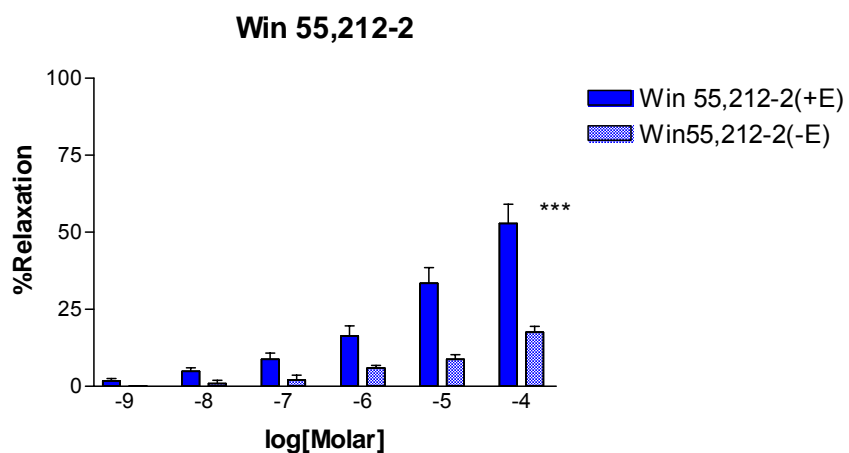


Fig. 18. Efecto de *R(+)-metanandamida* (A) ($n = 6$) y *Win 55,212-2* ($n = 17$) (B) sobre la contracción inducida por fenilefrina $1\mu\text{M}$ en aorta aislada de rata. (+ E = endotelio intacto; - E = sin endotelio). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

Con la finalidad de estudiar el mecanismo de acción de *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2* se procedió a bloquear con inhibidores de los diferentes mecanismos vasodilatadores dependientes de endotelio, utilizando

siempre preparaciones con endotelio intacto, obteniéndose los valores de R_{max} . Para facilitar la comparación entre los dos agonistas los resultados se presentan como % de las respectivas R_{max} obtenidas en preparaciones control (Tabla 4).

Antagonista	Metanandamida	Win 55,212-2
	%R max \pm e.e.m.	%R max \pm e.e.m.
L-NAME 100 μM	16.21 \pm 2.88	26.95 \pm 3.88
L-NAME 10 μM	16.27 \pm 1.32	19.16 \pm 4.21
PTX 300 ng/ml	27.43 \pm 4.99	48.70 \pm 3.64
Capsaicina 10μM	36.66 \pm 5.00	57.69 \pm 7.85
SR141716A 1μM	44.84 \pm 6.11	84.08 \pm 6.03
SR141716A 3 μM	43.20 \pm 6.44	77.43 \pm 2.53
SR141716A 6 μM	39.19 \pm 5.28	81.80 \pm 10.91
SR144528 1 μM	59.25 \pm 7.03	98.72 \pm 7.56
SR144528 3 μM	59.10 \pm 11.79	101.64 \pm 7.59
SR144528 6 μM	56.25 \pm 8.06	75.80 \pm 9.07
SR141716A 1 μM + SR144528 1 μM	30.87 \pm 1.55	76.46 \pm 3.96
Capsazepina 100 nM	43.97 \pm 6.42	49.25 \pm 8.27
CGRP 8-37 3 μM	57.20 \pm 7.08	56.99 \pm 4.14
Indometacina 50 μM	66.99 \pm 9.29	99.16 \pm 9.91
Charibdotoxina+Apamina 100 nM	98.75 \pm 11.68	101.05 \pm 7.28

AM404 10 μ M	74.24 \pm 4.94	-----
PMSF 200 μ M	53.65 \pm 5.04	-----
PMSF 100 μ M	47.01 \pm 3.28	-----
17-ODYA 5mM	82.93 \pm 7.61	-----

Tabla 4. % R_{max} de los cannabinoides en presencia de los inhibidores del mecanismo de acción

En ausencia de agonistas, ninguno de los inhibidores del mecanismo de acción ensayados produjo efectos, ni sobre la basal, ni sobre la contracción inducida por fenilefrina 10^{-6} M, ni sobre la vasorrelajación inducida por carbacol.

1.3 Efecto de toxina pertussis

La incubación de los anillos de aorta de rata con toxina pertussis (300 ng/ml) durante 3 horas abolió completamente la vasorrelajación causada por *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2* (tabla 4) lo que sugiere la implicación de receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (Figura 19).

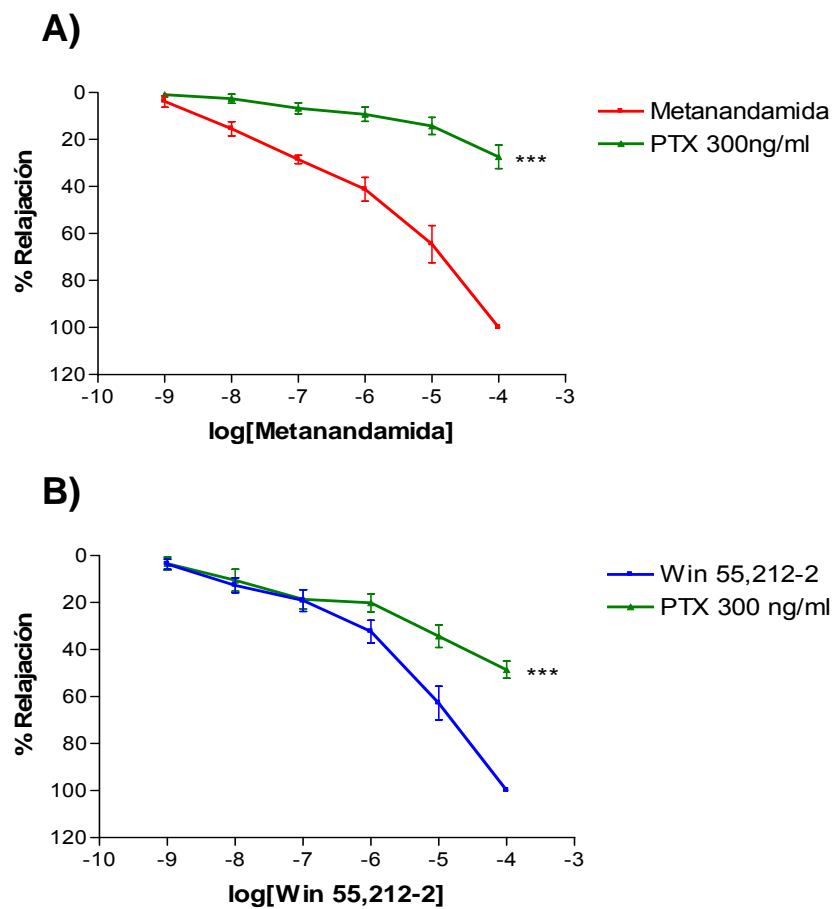


Fig. 19. Efecto vasorrelajante de *R(+)-metanandamida* ($n = 6$) (**A**) y *Win55,212-2* ($n = 6$) (**B**) en arteria aorta de rata en presencia y ausencia de toxina pertussis (300ng/ml). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

1.4 Efecto de L-NAME

Cuando las arterias fueron pretratadas con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (100 y 10 μ M), durante 30 minutos, el efecto de *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2* fue completamente abolido (tabla 4), indicando la importancia del NO endotelial en la vasorrelajación producida por *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2*. (figura 20).

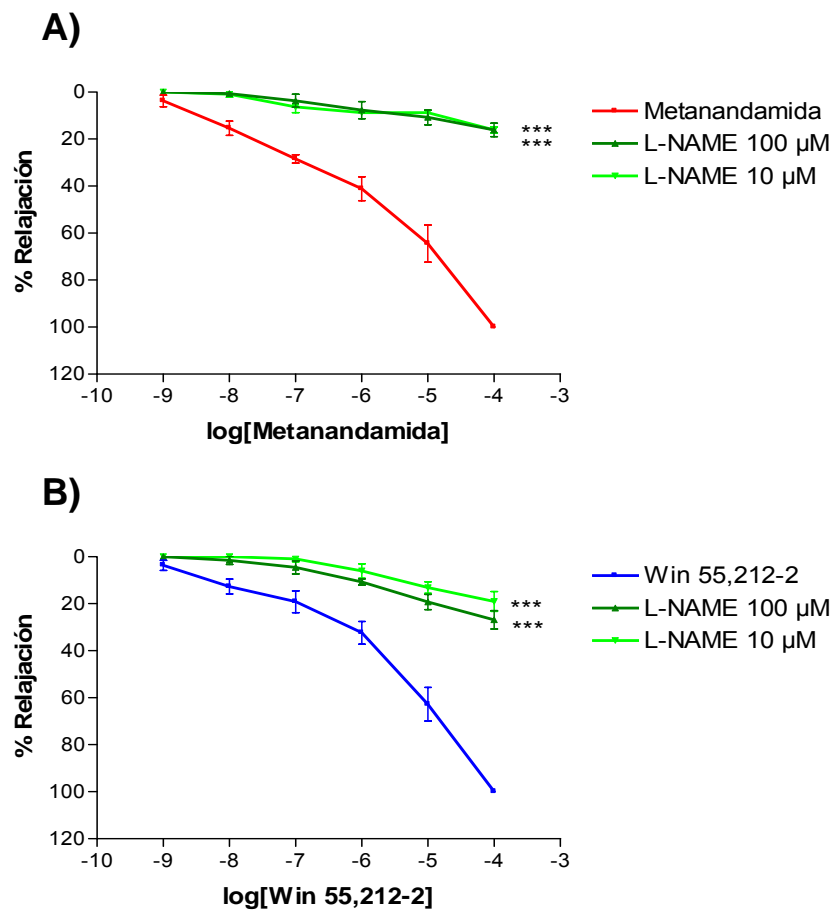


Fig. 20. Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (A) (n = 4-5) y *Win 55,212-2* (B) (n = 4-6) en presencia de L-NAME (10 y 100 μ M). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** p<0,001

1.5 Efecto de INDOMETACINA

La incubación de los anillos de aorta de rata con el inhibidor de la ciclooxigenasa Indometacina (50 μM) durante 15 min inhibió parcial y significativamente el efecto de *R(+)-metanandamida* (tabla 4). Sin embargo, no afectó a la vasorrelajación causada por WIN 55,212-2 (tabla 4), indicando la implicación de derivados de ciclooxigenasa en la vasorrelajación causada por *R(+)-metanandamida*. (Figura 21).

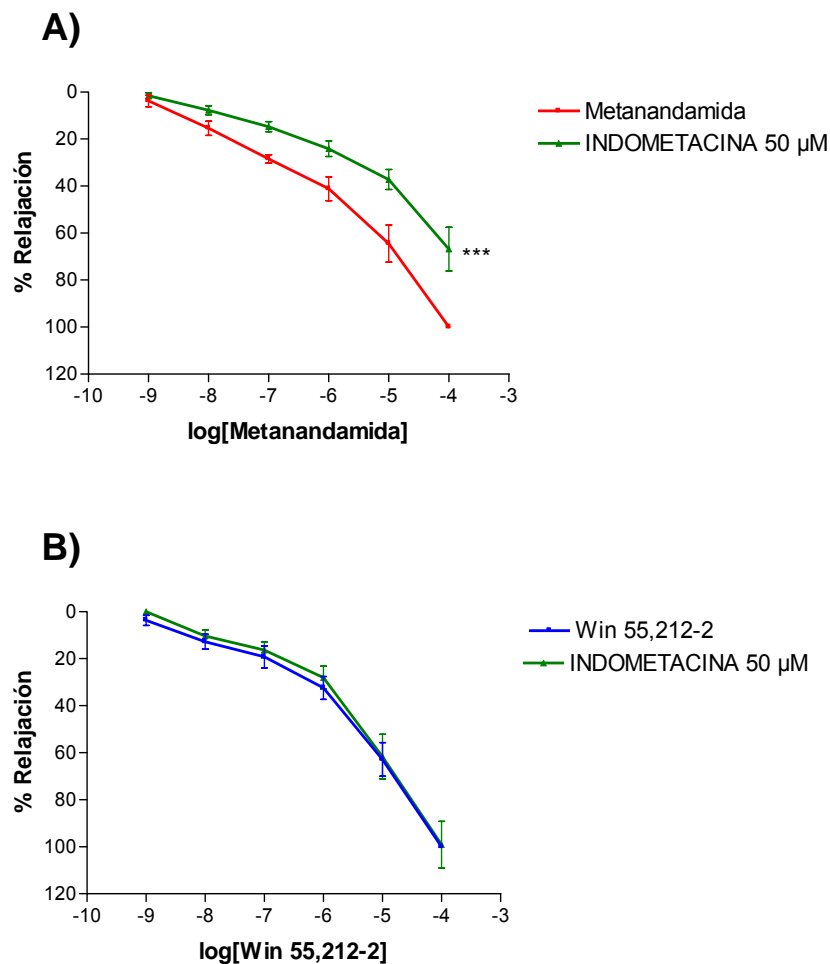


Fig. 21. Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (A) ($n = 9$) y Win 55,212-2 (B) ($n = 9$) en presencia de Indometacina (50 μM). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

1.6 Efecto de SR141716A, SR144528 y ambos asociados en bolo

La incubación de los anillos de aorta de rata con SR141716A (1, 3 y 6 μM) durante 15 min, produjo una inhibición significativa de la vasorrelajación inducida por *R(+)-metanandamida* a todas las concentraciones estudiadas (tabla 4). No se encontraron diferencias significativas entre la inhibición del efecto causada por las 3 concentraciones estudiadas (Figura 22). En el caso de *WIN 55,212-2* ninguna de las concentraciones estudiadas produjo una significativa inhibición de la vasorrelajación (tabla 4)(Figura 22).

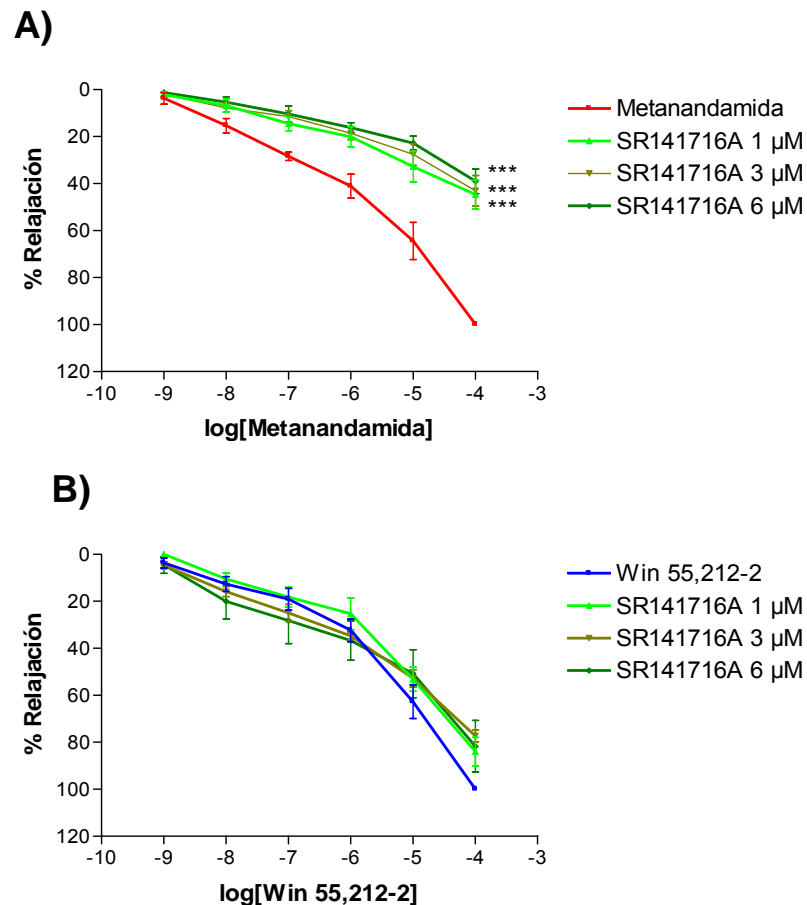


Fig. 22. Efecto vasorrelajante de *R(+)-metanandamida* (A) ($n = 6-7$) y *Win55,212-2* (B) ($n = 5-8$) en arteria aorta de rata en presencia y ausencia de SR141716A (1, 3, 6 μM). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

La incubación de los anillos de aorta de rata con las tres concentraciones de SR144528 (1, 3 y 6 μM) durante 15 min produjo una inhibición significativa de la vasorrelajación producida por *R(+)-metanandamida* (tabla 4). No hubo diferencias significativas entre la magnitud de la inhibición producida por las diferentes concentraciones utilizadas (1, 3 y 6 μM) (Figura 23).

La vasorrelajación producida por *WIN 55,212-2* solo fue inhibida significativamente por la incubación durante 15 min con SR144528 a la concentración de 6 μM (tabla 4) (Figura 23).

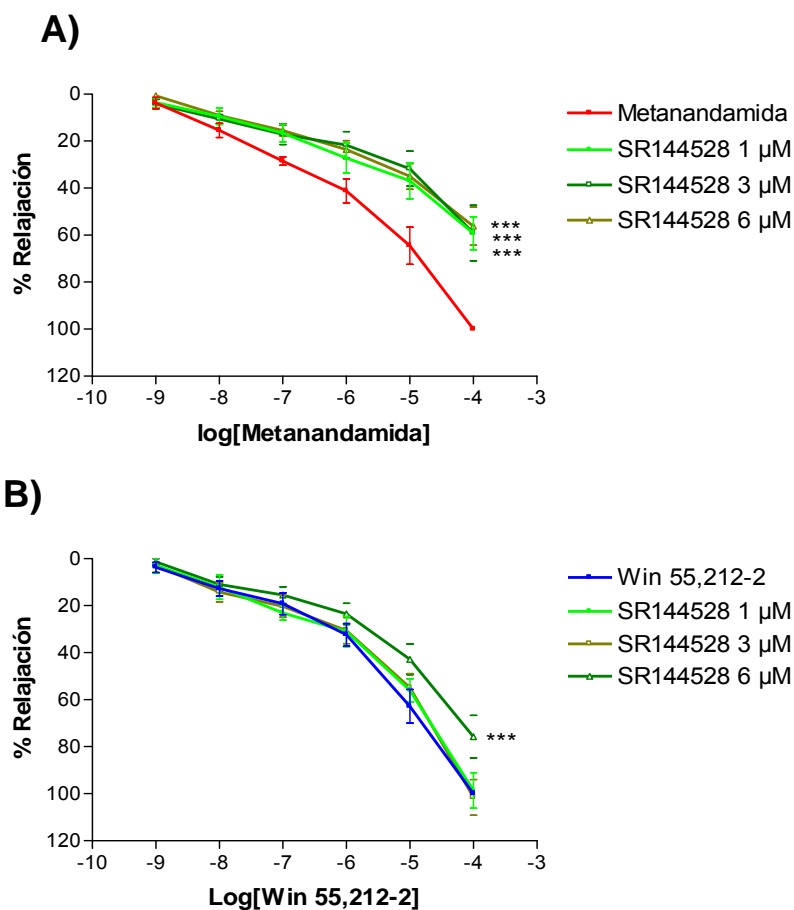


Fig. 23. Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (A) (n = 5-7) y *Win 55,212-2* (B) (n = 4-9) en presencia de SR144528 (1, 3, 6 μM). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

Con objeto de valorar un efecto sinérgico entre ambos antagonistas se evaluó el efecto de la combinación de ambos SR141716A y SR144528, utilizándose

solamente las concentraciones mas bajas (1 μ M). En presencia de ambos antagonistas la vasorrelajación producida por *R(+)-metanandamida* fue completamente bloqueada, resultando los valores de R_{max} mas bajos que los obtenidos con ambos antagonistas por separado (tabla 4), y similares a los obtenidos con vehículo (figura 24).

En presencia de ambos antagonistas se produjo una inhibición significativa de la vasorrelajación inducida por *WIN 55,212-2* (tabla 4) que fué similar a la producida por SR144528 a la concentración de 6 μ M. (figura 24).

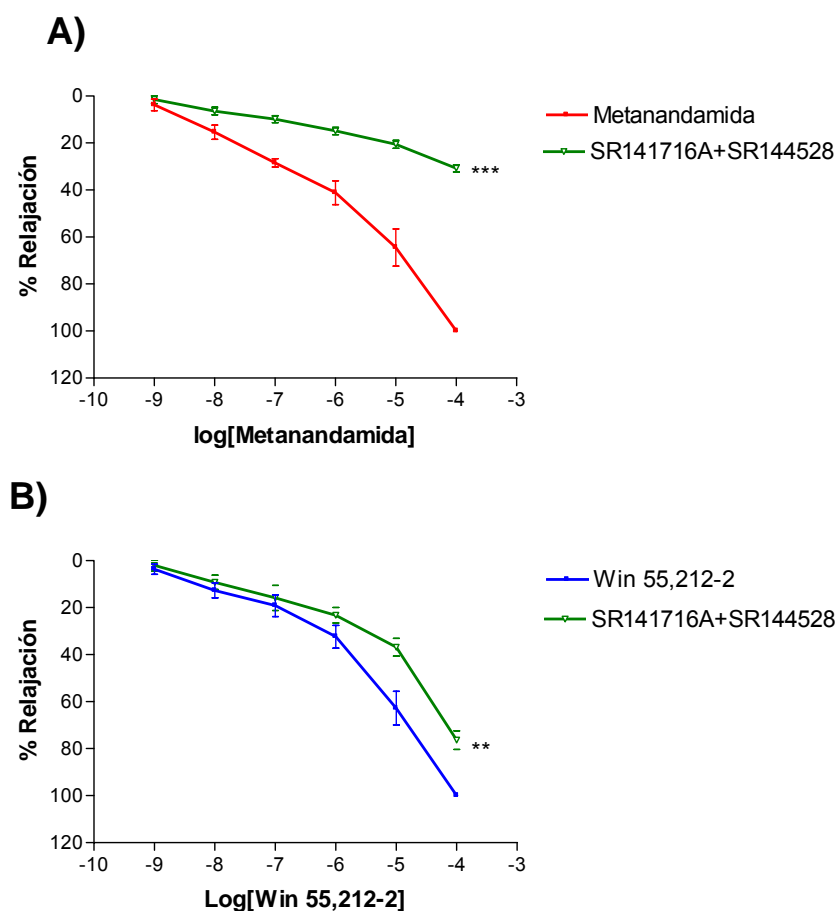


Fig. 24. Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (A) (n = 6) y *Win 55,212-2* (B) (n = 5) en presencia de SR141716A + SR144528 (1 μ M). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** p<0,001

1.7 Efecto de capsazepina

Cuando las arterias fueron pretratadas con el antagonista de los receptores VR₁, capsazepina (100 nM), durante 30 minutos, el efecto de *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2* fué parcial y significativamente inhibido, (tabla 4), indicando la implicación de receptores vanilloides (figura 25).

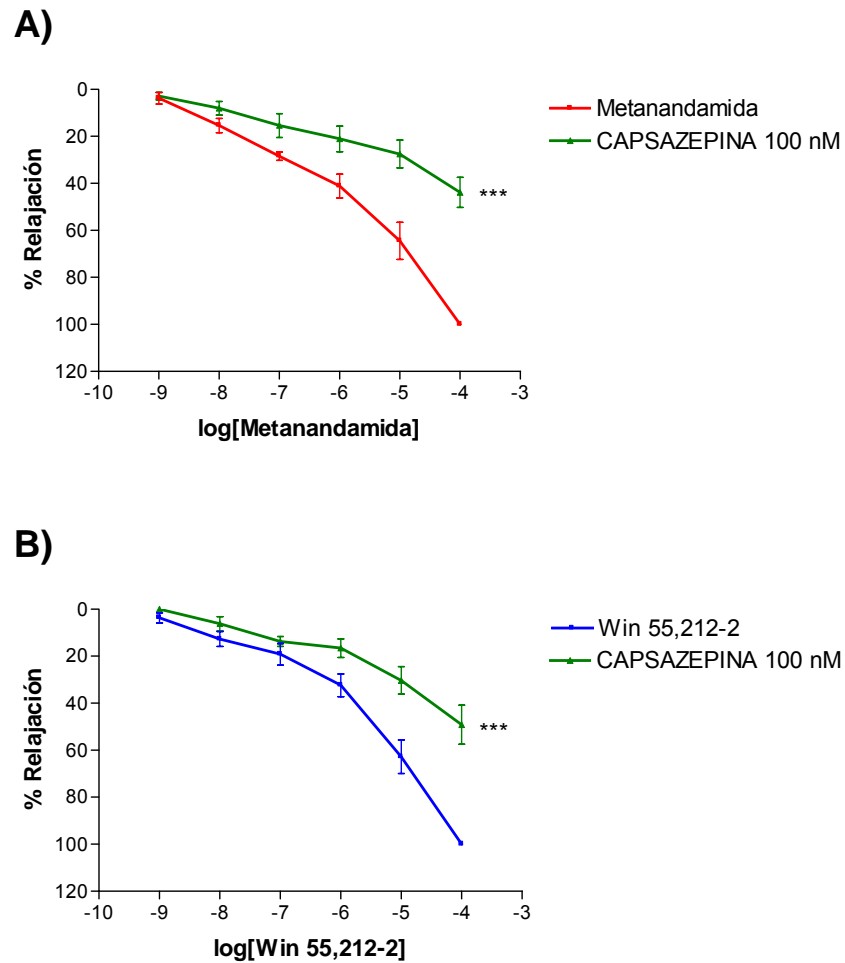


Fig. 25. Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (A) (n = 8) y *Win 55,212-2* (B) (n = 6) en presencia de Capsazepina (100 nM). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** p < 0,001

1.8 Efecto de la desensibilización con capsaicina

Para comprobar la implicación de receptores vanilloides, se incubaron los anillos de aorta de rata con capsaicina (10 μM) durante 1 hora, lo que produjo una inhibición parcial y estadísticamente significativa, de la vasorrelajación causada por *R(+)*-metanandamida y WIN 55,212-2 (tabla 4) (Figura 26).

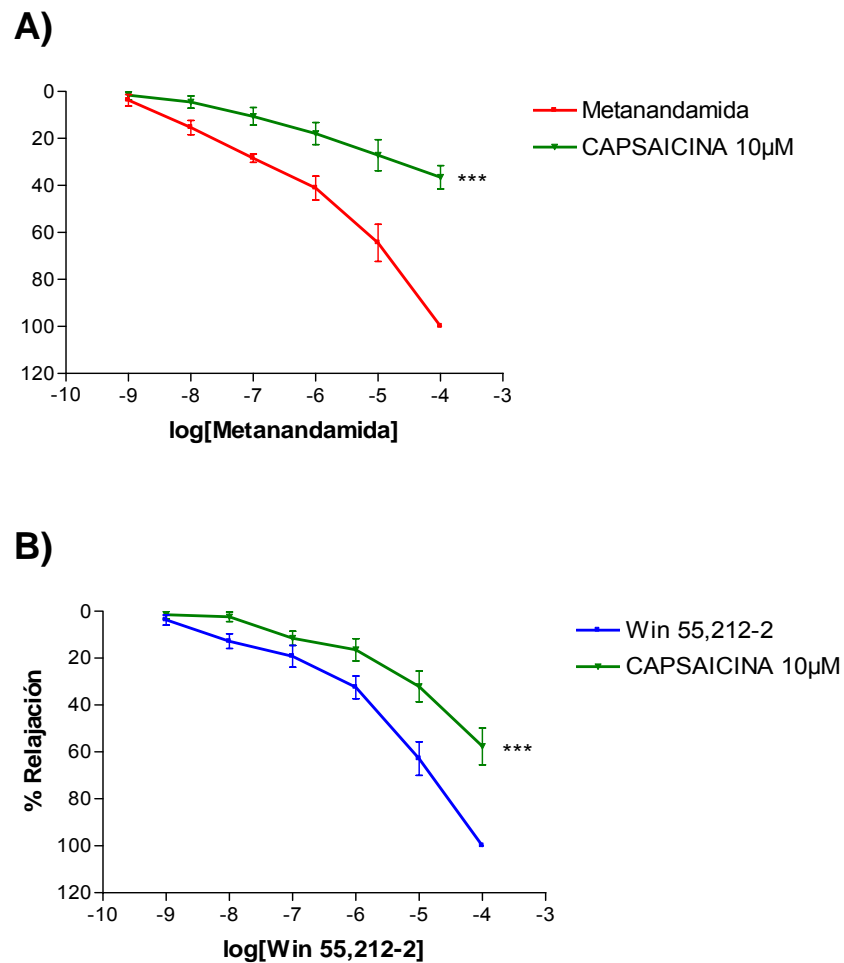
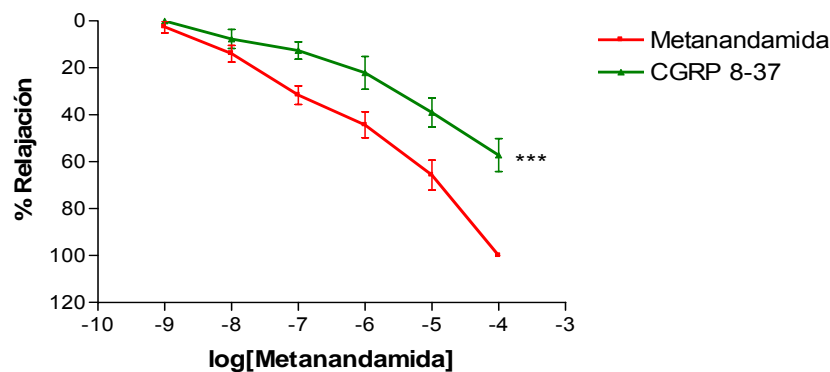


Fig. 26. Efecto del pretratamiento con capsaicina (10 μM) sobre las respuestas inducidas por *R(+)*-metanandamida (**A**) (n = 5) y Win 55,212-2 (**B**) (n = 7) en arteria aorta de rata. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** p<0,001

1.9 Efecto de CGRP 8-37

Debido a que la activación de receptores vanilloides conlleva la liberación de CGRP, se bloqueó el receptor (CGRP1) de este péptido con el antagonista CGRP 8-37 de rata. Se incubaron los anillos de aorta de rata con CGRP 7-38 (3 μ M) durante 30 min, lo que produjo una inhibición parcial y estadísticamente significativa, de la vasorrelajación causada por *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2* (tabla 4) (Figura 27). Esto corrobora la implicación de los receptores vanilloides en la vasorrelajación producida por estos cannabinoides en arteria aorta de rata.

A)



B)

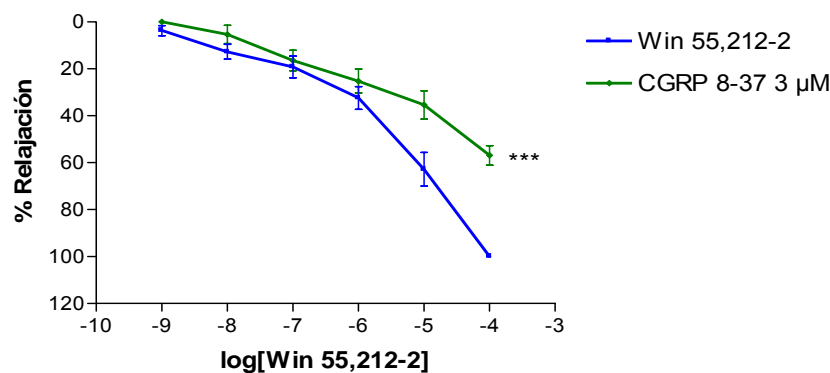


Fig. 27. Efecto del pretratamiento con CGRP8-37 (3 μ M) sobre las respuestas inducidas por *R(+)-metanandamida* (A) (n = 7) y *Win 55,212-2* (B) (n = 6) en arteria aorta de rata. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media
 *** p<0,001

1.10 Efecto de charibdotoxina y apamina

Cuando las arterias fueron pretratadas con la mezcla de toxinas, charibdotoxina (100 nM) y apamina (100 nM), durante 15 minutos, no se afectó la vasorrelajación causada por *R(+)-metanandamida* y *WIN 55,212-2* (tabla 4), descartando la implicación del EDHF en este efecto(figura 28).

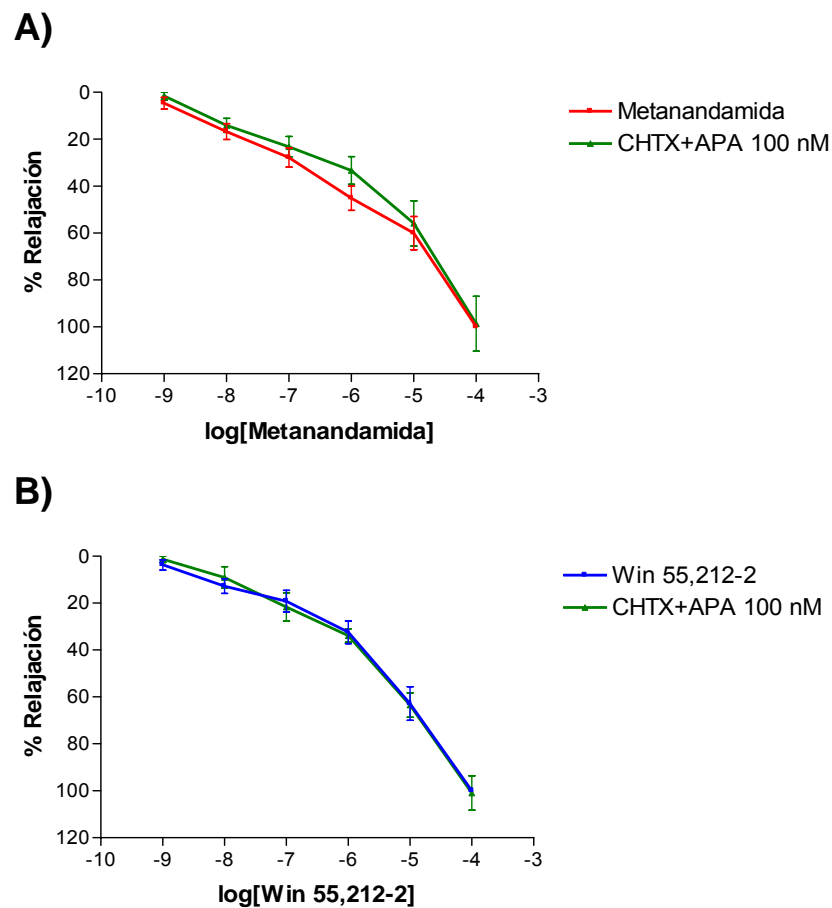


Fig. 28. Efecto del pretratamiento con charibdotoxina y apamina (100 nM) sobre las respuestas inducidas por *R(+)-metanandamida* (**A**) ($n = 8$) y *Win 55,212-2* (**B**) ($n = 6$) en arteria aorta de rata. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

1.11 Efecto de PMSF

La incubación de los anillos de aorta de rata con el inhibidor de la FAAH , PMSF (200 μM y 100 μM), durante 30 min inhibió parcial y significativamente el efecto de *R(+)-metanandamida* (tabla 4). No se encontraron diferencias significativas entre la inhibición del efecto causada por las 2 concentraciones estudiadas (Figura 29). De estos resultados se puede deducir la implicación de metabolitos de *R(+)-metanandamida* en su efecto vasodilatador.

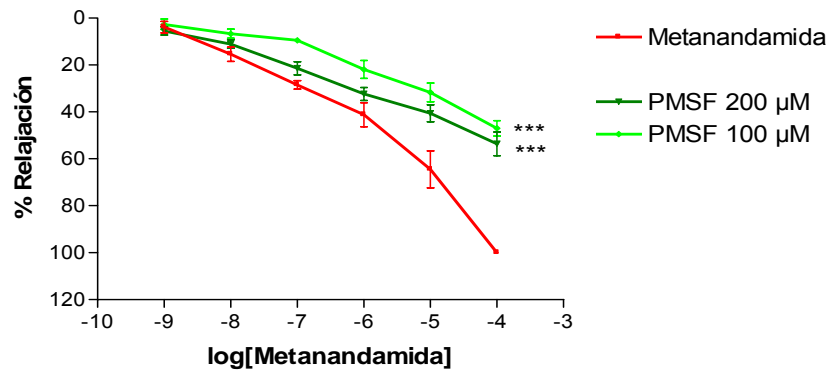


Fig. 29 Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (n = 6-7) en presencia de PMSF (200 y 100 μM). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media*** $p < 0,001$

1.12 Efecto de AM404

Cuando las arterias fueron pretratadas con el inhibidor del transportador de anandamida, AM404 (10 μ M), se produjo una leve (tabla 4), pero significativa, inhibición de la vasorrelajación producida por *R(+)-metanandamida*. (figura 30.).

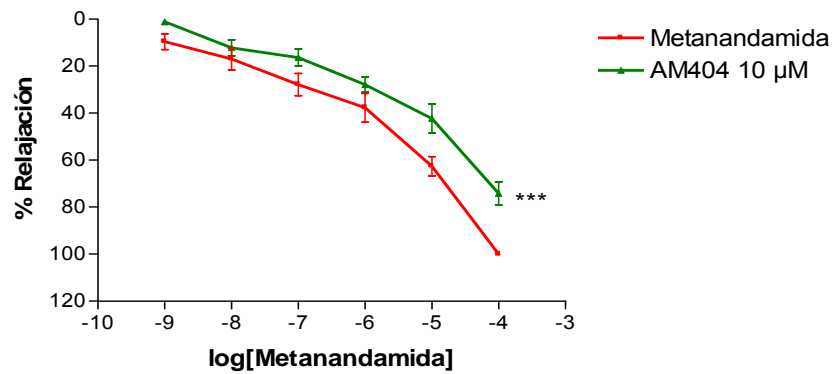


Fig. 30 Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (n = 10) en presencia de AM404 (10 μ M). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** p<0,001

1.13 Efecto de 17-ODYA

Cuando las arterias fueron pretratadas con el inhibidor inespecífico de CYP450 monoxigenasas, durante 30 minutos, no se afectó la vasorrelajación causada por *R(+)-metanandamida* (tabla 4), descartando la implicación de los metabolitos producidos por este enzima en la vasorrelajación producida por *R(+)-metanandamida* (figura 31).

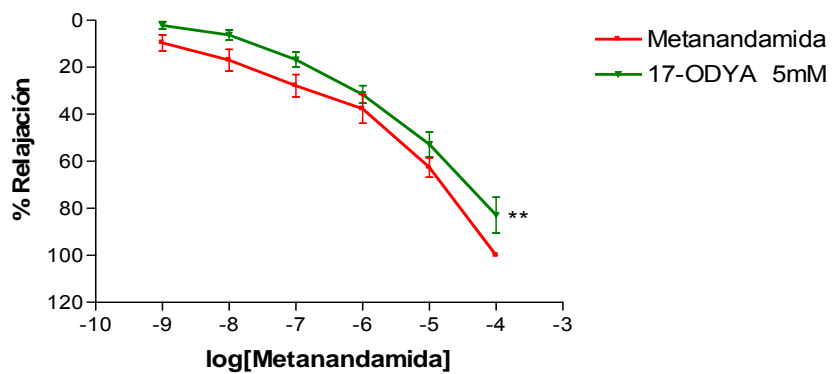


Fig. 31 Inhibición de la respuesta vasorrelajante a *R(+)-metanandamida* (n = 15) en presencia de 17-ODYA (5 mM). Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media *** $p < 0,001$

2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS NUEVOS COMPUESTOS SOBRE LA PREPARACION DE CONDUCTO DEFERENTE DE RATON.

En los ensayos llevados a cabo con las nuevas moléculas LH1.11, LH1.20 y LH1.21 en la preparación conducto deferente de ratón, se pudo observar que estos compuestos producían un bloqueo de la inhibición concentración-dependiente de la respuesta contráctil producida por los agonistas cannabinoides Win 55,212-2 y anandamida.

Ha sido estudiada la capacidad de cada uno de los compuestos, tanto los antagonistas de referencia SR141716A y AM251, como los nuevos LHs, para antagonizar la inhibición concentración-dependiente de la respuesta contráctil producida por los agonistas cannabinoides Win 55,212-2 y Anandamida. Los resultados obtenidos en cada grupo de preparaciones se exponen a continuación.

En abscisas se detallan las concentraciones molares utilizadas del agonista y en ordenadas el porcentaje de inhibición de la respuesta contractil de la preparación, respecto a la que esta presentaba en el primer periodo (5min) de estimulación, justo antes del comienzo de la realización de la curva concentración-respuesta (media \pm E.E.M.).

2.1 Efecto de Win 55,212-2

En las figuras se muestra el efecto del agonista Win 55,212-2 en ausencia y en presencia de distintas concentraciones, tanto de los antagonistas de referencia, como de los nuevos compuestos estudiados.

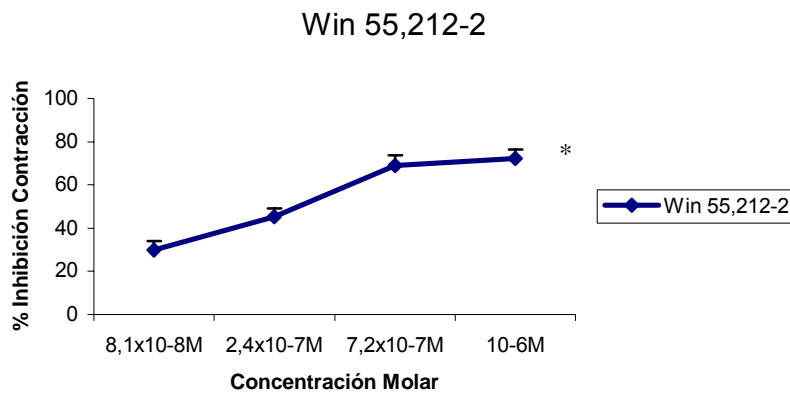


Fig. 32. Efecto inhibitorio de Win 55,212-2 (n =6) sobre la respuesta contractil de la preparación de conducto deferente de ratón. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$

2.2 Efecto inhibitorio de AM251

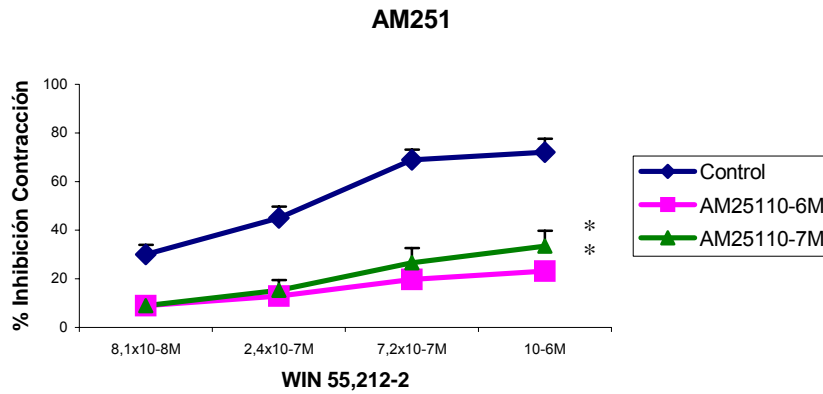


Figura 33 Efecto inhibitorio de AM251 (n= 5-8) a concentración 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por Win 55,212-2. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$

2.3 Efecto inhibitorio de SR141716A

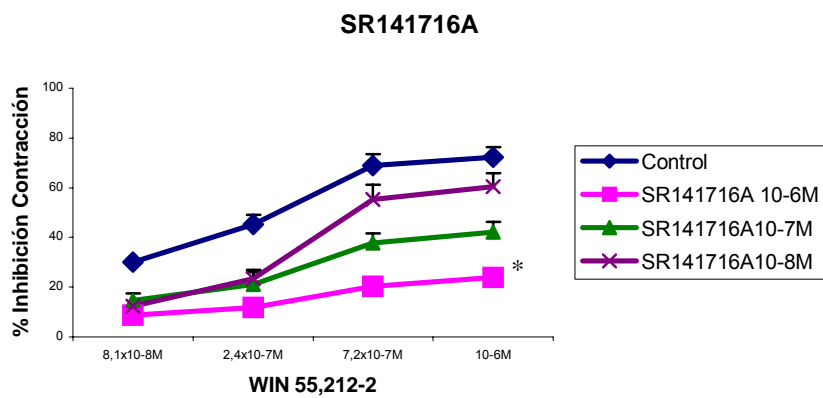


Figura 34 Efecto inhibitorio del antagonista CB1 SR141716A (n = 5-4) a concentración 10^{-6} M, 10^{-7} M y 10^{-8} M sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por Win 55,212-2. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$

2.4 Efecto inhibitorio de LH1.11

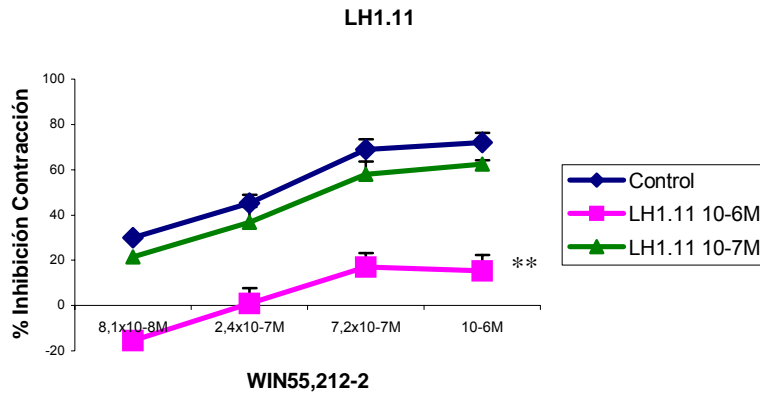


Figura 35 Efecto inhibitorio del nuevo compuesto LH1.11 (n=5) a concentración $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$ sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por Win 55,212-2. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media ** $p < 0,01$

2.5 Efecto inhibitorio de LH1.20

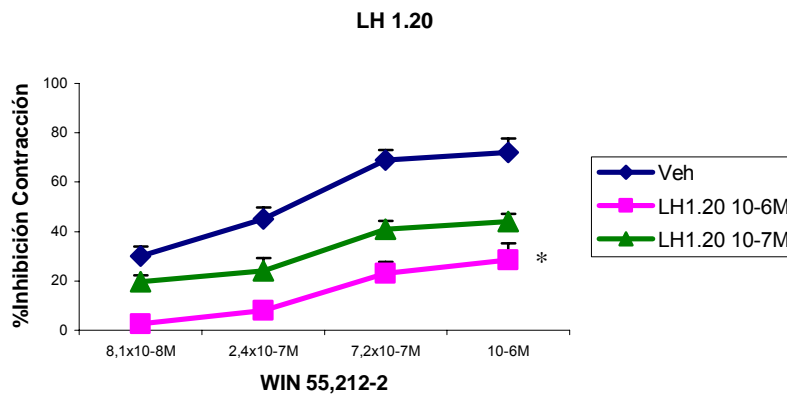


Figura 36 Efecto inhibitorio del nuevo compuesto LH1.20 (n= 5) a concentración $10^{-6}M$ y $10^{-7}M$ sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por Win 55,212-2. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$

2.6 Efecto inhibitorio de LH1.21

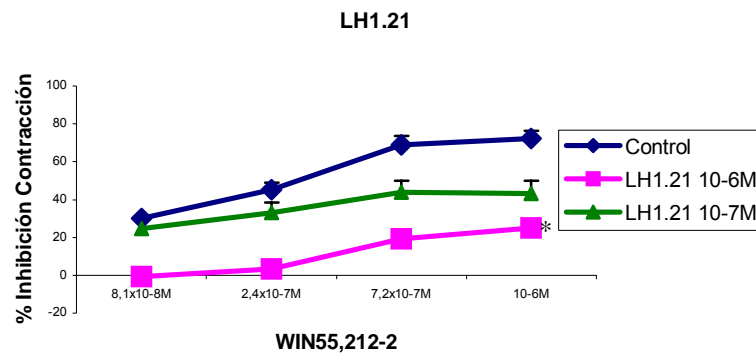


Figura 37 Efecto inhibitorio del nuevo compuesto LH1.21 (n= 6) a concentración 10^{-6} M y 10^{-7} M sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por Win 55,212-2. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$

2.7 Efecto de anandamida

En las figuras se muestra el efecto del agonista anandamida en ausencia y en presencia de distintas concentraciones, tanto de los antagonistas de referencia, como de los nuevos compuestos estudiados.

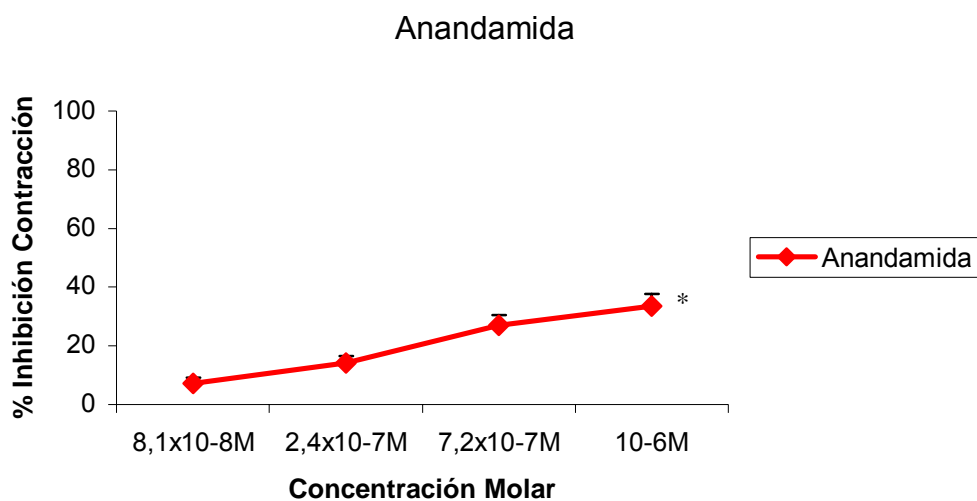


Fig. 38. Efecto inhibitorio de anandamida ($n = 7$) sobre la respuesta contractil de la preparación de conducto deferente de ratón. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media * $p < 0,05$

2.8 Efecto inhibitorio de AM251

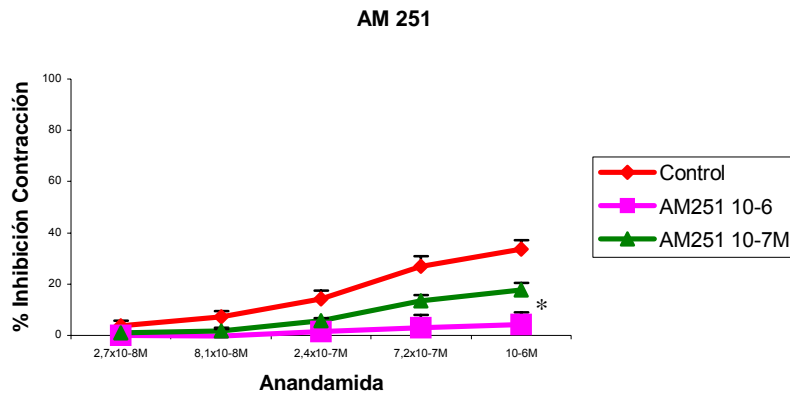


Figura 39 Efecto inhibitorio de AM251 (n = 5-9) a concentración 10^{-6} M y 10^{-7} M sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por anandamida. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media
* $p < 0,05$

2.9 Efecto inhibitorio de SR141716A

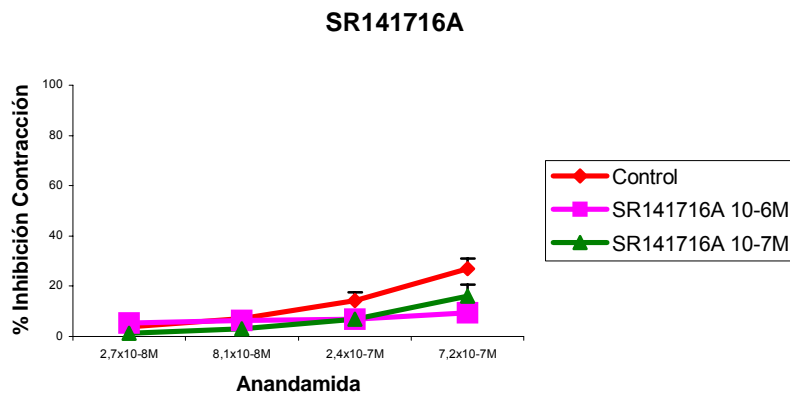


Figura 40 Efecto inhibitorio de SR141716A (n = 6-7) a concentración 10^{-6} M y 10^{-7} M sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por anandamida. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media

2.10 Efecto inhibitorio de LH1.11

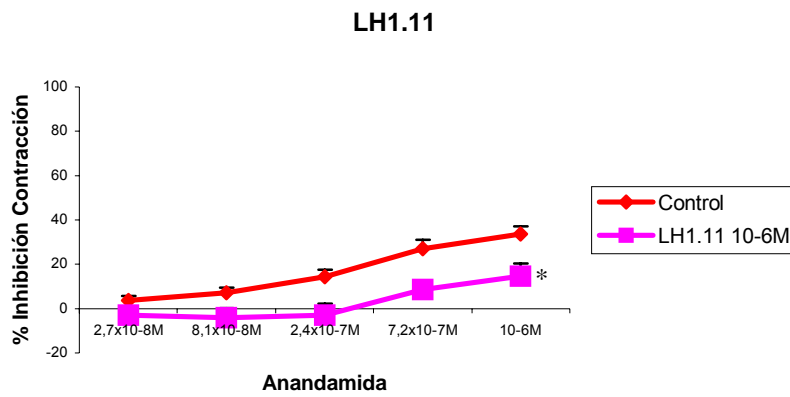


Figura 41 Efecto inhibitorio de LH1.11 (n= 4) a concentración 10^{-6} M, sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por anandamida. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media
* $p < 0,05$

2.11 Efecto inhibitorio de LH1.20

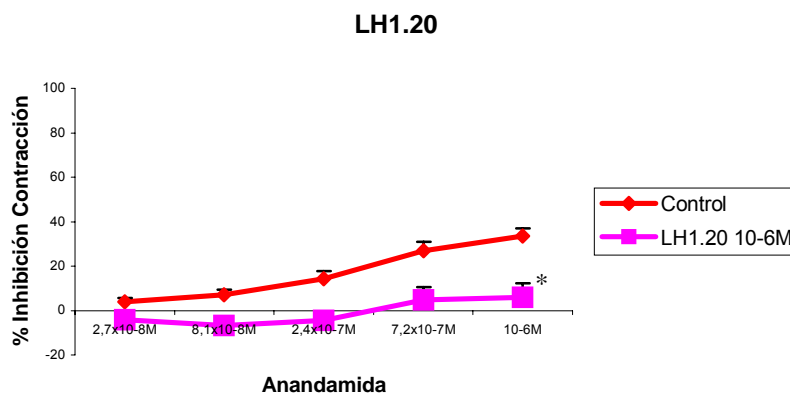


Figura 42 Efecto inhibitorio de LH1.20 (n = 5) a concentración 10^{-6} M, sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por anandamida. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media
* $p < 0,05$

2.12 Efecto inhibitorio de LH1.21

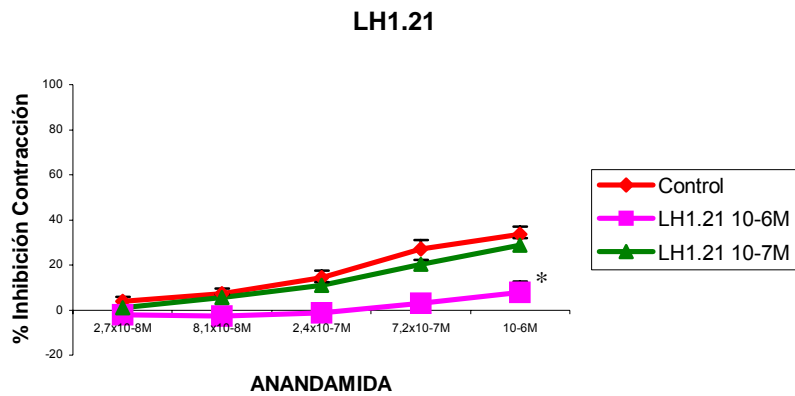


Figura 43 Efecto inhibitorio de LH1.21 (n= 5) a concentración 10^{-6} M, sobre la respuesta contractil de la preparación conducto deferente de ratón inducida por anandamida. Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media

* $p < 0,05$

3 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA (IN VIVO)

Debido a que fué el compuesto más activo en los ensayos *in vitro* el efecto del compuesto LH1.21 fue evaluado usando el modelo de evaluación de compuestos cannabinoides *in vivo*, la tetrada cannabinoide.

En estos ensayos se comparó el efecto de LH1.21 con el antagonista de referencia SR141716A. El tratamiento de ratones con estos compuestos no indujo modificaciones significativas en ninguno de los parámetros valorados (nocicepción, temperatura corporal, actividad espontánea y catalepsia).

Asimismo, se comprobó su capacidad para bloquear los efectos de WIN 55,212-2 (1.5 mg/kg) en este modelo animal. El compuesto LH1.21 se ensayó a tres concentraciones diferentes (0.25, 0.5 y 1 mg/kg) y el antagonista patrón sólo a la concentración 1mg/kg, obteniéndose resultados similares a esta dosis.

3.1 Efecto de agonistas y antagonistas cannabinoides sobre la temperatura corporal del ratón

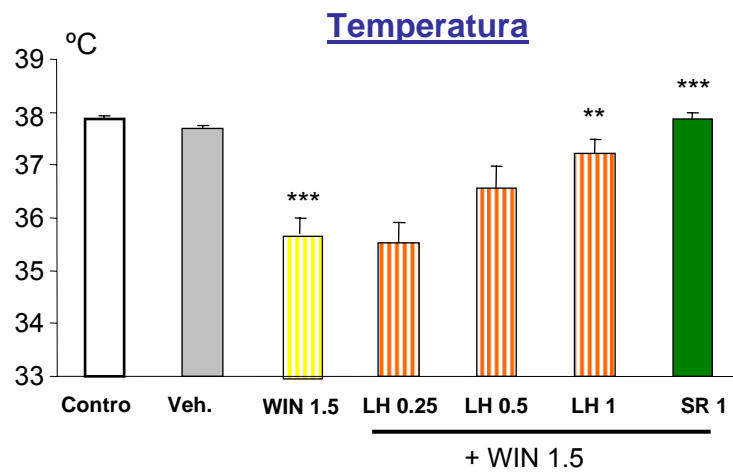


Figura 44 Inhibición del efecto de Win 55,212-2 (1,5mg/kg) por SR141716A y LH1.21 sobre la temperatura corporal del ratón. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m. ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$

3.2 Efecto de agonistas y antagonistas cannabinoides sobre la actividad locomotora

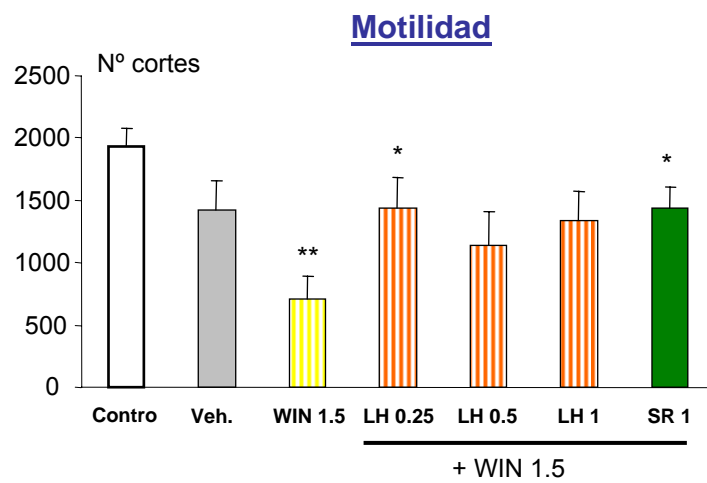


Figura 45 Inhibición del efecto de Win 55,212-2 (1,5mg/kg) por SR141716A y LH1.21 sobre la actividad locomotora del ratón. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$

3.3 Catalepsia producida por agonistas y antagonistas cannabinoides

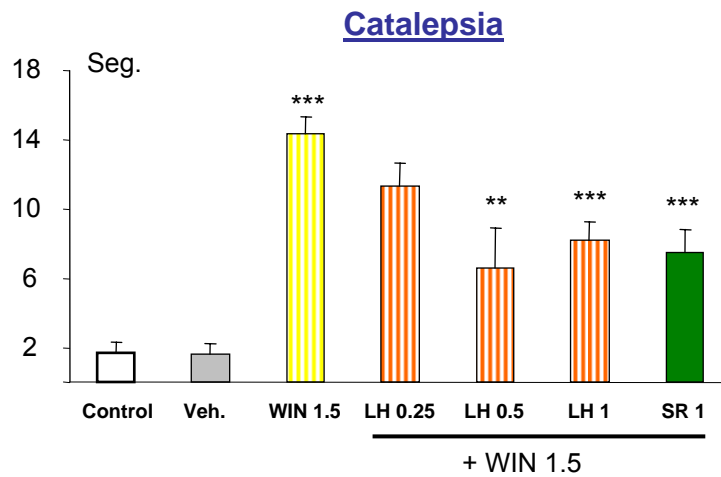


Figura 46 Inhibición del efecto cataléptico de Win 55,212-2 (1,5mg/kg) por SR141716A y LH1.21. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m. ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$

3.4 *Analgesia producida por agonistas y antagonistas cannabinoides*

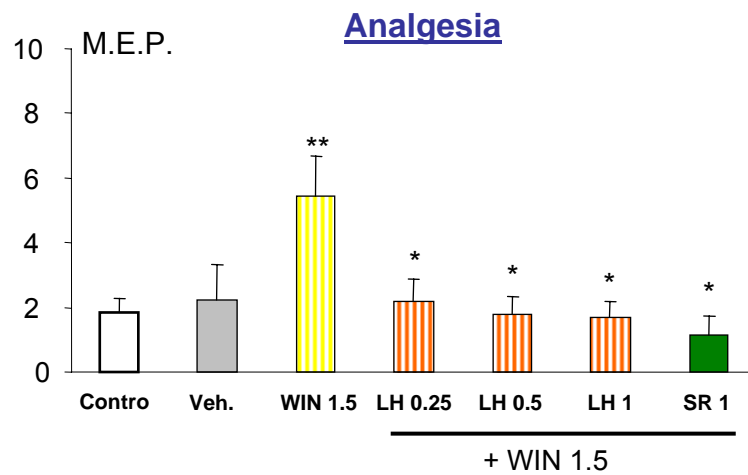


Figura 46 Inhibición del efecto analgésico de Win 55,212-2 (1,5mg/kg) por SR141716A y LH1.21. Los datos se presentan como la media \pm e.e.m. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$

1 ESTUDIO DE LOS EFECTOS VASCULARES DE LOS CANNABINOIDES.

La primera parte de esta tesis doctoral ha tenido como objetivo iniciar la caracterización del mecanismo de acción mediante el cual dos agonistas cannabinoides de distinta naturaleza química, R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2, producen relajación vascular en la aorta aislada de rata. Hasta la fecha no se había realizado ningún trabajo de este tipo en arteria aorta de rata. Se han estudiado algunos de los principales mecanismos moduladores de la vasodilatación arterial producida por cannabinoides.

Aunque los efectos de los cannabinoides, tanto naturales como sintéticos, han sido ampliamente estudiados, no hay datos concluyentes que demuestren la existencia de un mecanismo de acción general, ya que los resultados van a depender de la especie, del lecho vascular y de la metodología empleada (Lay y cols., 2000; O'Sullivan y cols., 2004; Randall y cols., 2004).

A pesar de que se han hecho diversos ensayos farmacológicos en vasos sanguíneos con la mayoría de los cannabinoides conocidos, el más utilizado es la anandamida. La mayoría de los autores consideran que la R(+)-metanandamida, un análogo estructural de anandamida, produce efectos muy similares a esta, aunque de más larga duración puesto que la velocidad de degradación es diferente. Estudios comparativos entre ambos compuestos han sido descritos dando resultados incluso contradictorios. En 1997, Zygmunt y cols comprobaron que anandamida y R(+)-metanandamida tienen la misma potencia vasorrelajante en arterias hepáticas y mesentéricas de rata. Por el contrario, Grainger y Boachie-Ansah (2001) demostraron que en arterias coronarias bovinas aisladas la anandamida produce vasorrelajación mientras que R(+)-metanandamida carece de efecto.

Estudiando sus efectos sobre presión arterial y frecuencia cardiaca en ratas anestesiadas, Malinowska y cols (2001) demostraron que la R(+)-metanandamida produce hipotensión y bradicardia con más potencia que la anandamida, lo que concuerda con los resultados de Mendizábal y cols. (2001) en lecho mesentérico de rata aislado y perfundido.

También se han descrito efectos contradictorios con WIN 55,212-2 en diversos vasos sanguíneos. Este compuesto no produce relajación en arteria hepática de rata, en arteria basilar de cobayo (Zygmunt y cols, 1997), ni en anillos de aorta de conejo (Mukhopadhyay y cols, 2001). Sin embargo sí la produce en las ramas mesentéricas de rata (Ho y Hiley, 2003) y en arterias cerebrales de gato (Gebremedhin y cols, 1999) Al estudiar sus efectos in vivo, se ha demostrado que produce hipotensión en conejos y ratas desmedulados (Niederhoffer y Szabo, 1999; Niederhoffer y cols, 2003).

Ninguno de los ensayos que se han hecho hasta la fecha con R(+)-metanandamida o con WIN 55,212-2, estudia todas las posibles vías mediante las cuales un compuesto cannabinoide produce su efecto vasorrelajante, y no hay ensayos comparativos entre ellos.

La primera diferencia entre estos dos compuestos es su afinidad por los receptores cannabinoides, siendo la R(+)-metanandamida más afín por los receptores CB₁, mientras que el WIN 55,212-2 es mas afín por los receptores CB₂ (Lake y cols, 1997; Niederhoffer y Szabo, 1999). Esto hace que la potencia del efecto sea variable dependiendo del tejido empleado y del número de receptores cannabinoides en cada tejido. Si este es bajo también lo será la actividad intrínseca del agonista cannabinoide estudiado (Ross,2003).

En nuestro estudio se comprobó que R(+)-metanandamida es más eficaz que WIN 55,212-2, puesto que la relajación producida es mayor (71%) para

R(+)-metanandamida que el efecto de WIN 55,212-2 52 (52%) a las mismas dosis.

1.1 MECANISMOS

1.1.1 Dependencia del endotelio

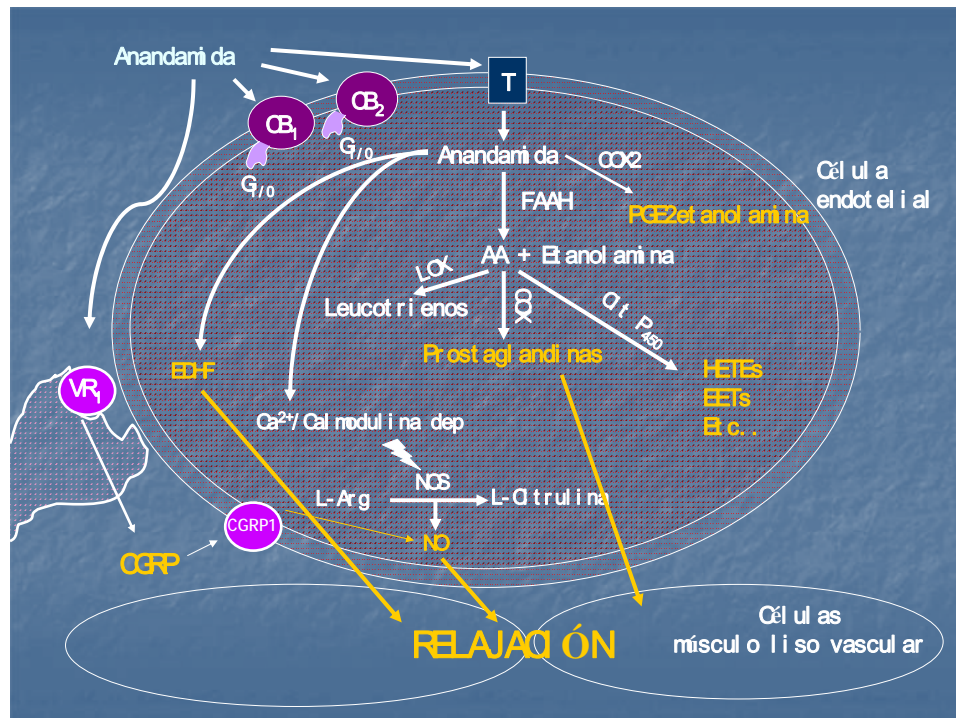
Nuestro estudio ha demostrado que en la arteria aorta de rata precontraída con fenilefrina, estos cannabinoides producen una lenta relajación concentración-dependiente cuando el endotelio está intacto, efecto que no aparece en arterias carentes de endotelio.

Aunque la vasorrelajación en arteria aorta de rata ha sido mencionada por algunos autores (O'Sullivan y cols., 2004) no hay estudios completos sobre los efectos vasorrelajantes de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 en vasos de conductancia, excepto en aorta de conejo, donde se demostró que tanto anandamida como R(+)-metanandamida inducen vasorrelajación siendo este último compuesto más eficaz. Sin embargo, en este tejido WIN 55,212-2 no produce relajación. Estos autores proponen que ambos R(+)-metanandamida y anadamida pueden activar al menos dos vías diferentes para producir la relajación. La primera sería endotelio-dependiente, sensible a SR141716A, regulada por proteínas G sensibles a toxina pertussis, que actuarían estimulando la liberación de NO por el endotelio. La segunda vía sería la liberación de NO no endotelial e independiente de proteínas G (Mukhopadhyay y cols, 2002).

En nuestras condiciones experimentales, la participación de mecanismos endotelio dependientes parece ser esencial debido a que las arterias sin endotelio presentan una pérdida de respuesta al efecto de los cannabinoides, hecho corroborado por muchos autores (Lake y cols., 1997; Pratt y cols., 1998; Chaytor y cols., 1999; Gotopoulos y cols., 2001; Grainger and Boachie-Ansah,

2001; Wagner y cols., 2001). No todos los datos previos están de acuerdo con la importancia del endotelio en otros lechos vasculares. En arterias coronarias bovinas, la anandamida produce el mismo tipo de relajación endotelio-dependiente (Pratt y cols., 1998), pero resultados obtenidos con otras arterias como la hepática (Zygmunt y cols., 1997; Zygmunt y cols., 2002), coronaria (White y cols 2001), carótida (Holland y cols, 1999), y mesentéricas de rata (White y Hiley, 1998; Zygmunt y cols., 2002) y la arteria basilar de cobayo (Deutsch y cols,1997) describen que la relajación es endotelio-independiente.

Con la finalidad de identificar el mecanismo de acción de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 se llevaron a cabo experimentos con compuestos que interfieren con los principales mecanismos vasodilatadores dependientes de endotelio que han sido previamente descritos como implicados en los efectos vasculares de los cannabinoides.



En primer lugar habría que señalar que en nuestros experimentos, y en ausencia de agonista, ninguno de los antagonistas utilizados causó por si mismo vasodilatación en arterias precontraídas con fenilefrina, ni modificación de la relajación producida por carbacol (10 μ M).

1.1.2 Mecanismos mediados por receptores

Clasicamente se admite que los receptores que median los efectos de los cannabinoides CB₁ y CB₂ son receptores acoplados a proteínas reguladoras Gi/o sensibles a toxina pertussis (Mukhodpyay y cols., 2002; Begg y cols., 2003; Offertáler y cols., 2003). Para comprobar si estos receptores están implicados en el mecanismo de acción relajante de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 en aorta de rata, se incubaron los anillos con dicha toxina. En nuestros resultados, al igual que en otros tejidos previamente estudiados, (Bouaboula y cols., 1999; Holland y cols., 1999; Mukhodpyay et 2002; Begg y cols., 2003; Offertáler y cols., 2003; Gebremedhin y cols., 1999), se comprobó la inhibición del efecto relajante de ambos cannabinoides R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2.

Esto confirma, en un tejido que no había sido estudiado previamente, la aorta de rata, la implicación de receptores acoplados a proteínas Gi/o en la vasorrelajación endotelio-dependiente causada por estos cannabinoides, al igual que sucede en la de conejo (Mukhopadhyay y cols., 2002).

Los resultados obtenidos hasta el momento en otros vasos sanguíneos son contradictorios. A pesar de que el efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 en otros tejidos vasculares parece mediado a través de receptores endoteliales, no existen datos previos sobre el subtipo de receptor implicado en la vasorrelajación producida por cannabinoides en aorta de rata.

Los receptores que median los efectos cannabinoides pueden ser de varios tipos:

a) *receptores CB₁* (Ishac y cols., 1996; Deutsch y cols., 1997; Lake y cols., 1997; Sugiura y cols., 1998; Gebremedhin y cols., 1999; Jarai y cols., 1999; Liu y cols. 2000; Maccarrone y cols, 2000, O'Sullivan y cols., 2004).

b) *receptores endoteliales CB₂*: su papel funcional no ha sido completamente establecido aunque su presencia en células aisladas de endotelio pulmonar de carnero ha sido confirmada recientemente (Zoratti y cols., 2003).

c) *receptores endoteliales de anandamida (no CB_{1/2})*: (Jarai y cols., 1999; Bukoski y cols., 2002; Kunos y cols., 2002; Zygmunt y cols., 2002; Ho y Hiley, 2003; Offertaler y cols., 2003).

d) *receptores vanilloides* (Zygmunt y cols 1999; Smart y cols., 2000; Ross, 2001; Mukhopadhyay y cols., 2002;Ralevic y cols., 2002)

e) *otros receptores*: numerosas evidencias sugieren la existencia de varios nuevos subtipos de receptores cannabinoides que aún no han sido identificados ni plenamente caracterizados: sensibles a SR141716A, no CB₁ no CB₂, similares a vanilloides que son antagonizados por capsazepina, acoplados o no a proteínas G, etc (Ross, 2002; Pertwee, 2003).

A Efecto de los antagonistas de receptores cannabinoides

Para identificar el subtipo de receptor cannabinoide implicado en el efecto de los agonistas, en nuestro trabajo se emplearon antagonistas relativamente específicos de receptores cannabinoides: SR141716A antagonista del receptor

CB₁ (Rinaldi-Carmona y cols., 1995) y SR144528 antagonista del receptor CB₂ (Rinaldi-Carmona y cols., 1998; Bouaola y cols., 1998; Shire y cols., 1999; Gouldson y cols., 2000).

Debido a que la implicación del receptor no CB₁/CB₂ no está bien definida ni caracterizada, ni tampoco estaba disponible el antagonista del “receptor de anandamida”, O-1918, no se pudieron llevar a cabo experimentos para comprobar la implicación de dicho receptor en el efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2

Los antagonistas empleados fueron ensayados a tres concentraciones diferentes: 1, 3 y 6 μ M. En nuestros experimentos no utilizamos concentraciones superiores a 6 μ M debido a que White y Hiley (1998) demostraron que SR141716A a concentraciones mayores de 10 μ M produce relajación vascular endotelio-independiente a través de la inhibición de canales de Ca⁺⁺ voltaje-dependientes y a la activación de canales de K⁺. Aunque no hay unanimidad, otros autores describen que dosis ≥ 1 μ M pueden bloquear receptores VR₁ (Zygmunt y cols., 1999), inhibir la neurotransmisión en la unión neuro-efectora (Chaytor y cols., 1999); receptores imidazolidínicos (Molderings y cols., 1999) o actuar como un agonista inverso (Bouaboula y cols., 1997).

En este trabajo, todas las dosis produjeron el mismo grado de bloqueo del efecto de R(+)-metanandamida, que fue en torno al 60% para SR141716A, y ~40% para SR144528, lo cual sugeriría la implicación de los receptores CB₁ y CB₂ en su efecto vasorrelajante.

El bloqueo del efecto de R(+)-metanandamida por SR141716A ha sido demostrado por muchos autores (Chaytor y cols., 1999; Jarai y cols., 1999; Wagner y cols., 2001; Mukhopadhyay y cols., 2002) en diferentes lechos vasculares y en animales de diferentes especies, implicando al receptor CB₁ en los efectos vasculares de R(+)-metanandamida. Aunque también efectos

contrarios han sido descritos por otros autores (Van Den Bossche y cols., 2000; Vanheel y cols., 2001; Wagner y cols., 2001).

Por el contrario, la relajación producida por WIN 55,212-2 no se afectó por la presencia de concentraciones bajas de ambos antagonistas y solamente se inhibió parcialmente con la dosis 6 μ M de SR144528 (~25%).

La ausencia de efecto de SR141716A sobre la relajación producida por WIN 55,212-2 en aorta de rata concuerda con los resultados de otros autores a concentración 3 μ M, en arterias mesentéricas de rata (Ho y Hiley, 2003; White y Hiley, 1998). Por el contrario, a dosis tan bajas como 100nM se ha demostrado que el efecto vasorrelajante de WIN 55,212-2 era bloqueado por SR141716A en arterias cerebrales de gato (Gebremedhin y cols., 1999).

Estos resultados indican una posible diferencia entre el subtipo de receptor implicado en la respuesta causada por R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2. En el caso de R(+)-metanandamida todo el efecto vasodilatador parece estar mediado a través de receptores CB₁ y CB₂. En cambio el efecto de WIN 55,212-2, parece estar mediado parcialmente por receptores CB₂.

La implicación de receptores CB₂ en los efectos vasculares de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 no había sido demostrada previamente.

No existen trabajos previos que utilicen la combinación de ambos antagonistas.

En este trabajo, cuando se administraron simultáneamente ambos antagonistas, la vasorrelajación inducida por R(+)-metanandamida fue completamente abolida.

Nuestros resultados demuestran claramente y por primera vez que tanto los receptores CB₁ como los CB₂ están implicados en las acciones vasculares, en vasos de conductancia, de R(+)-metanandamida, aunque hasta ahora su efecto se consideraba mediado en su mayor parte por receptores CB₁ (Mukhopadhyay y cols., 2002).

Este efecto es similar al obtenido al bloquear con toxina pertussis el efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida y demuestra de manera clara la implicación de receptores acoplados a proteínas G en la respuesta endotelio-dependiente.

Cuando se administraron simultáneamente ambos antagonistas, la vasorrelajación inducida por WIN 55,212-2 fue similar a la obtenida con la dosis más alta de SR144528, además es semejante al obtenido al bloquear con toxina pertussis, lo que implicaría nuevamente al receptor CB₂ en el mecanismo de acción de este compuesto.

B Efecto del bloqueo de receptores vanilloides

Entre los mecanismos propuestos previamente como mediadores de la vasorrelajación producida por cannabinoides se encuentra la activación de receptores vanilloides. El agonista natural de estos receptores es la capsaicina, pero también pueden ser activados por anandamida, R(+)-metanandamida y otros agonistas cannabinoides. Los mecanismos que se desencadenan tras la activación de estos receptores son muy complejos y, abarcan liberación de CGRP, NO, ATP, sustancia P, y NKA, fosforilación de proteínas, bloqueo de canales de Ca⁺⁺ e incluso fenómenos de desensibilización del receptor por exposición prolongada a agonistas (Ralevic y cols, 2002). El efecto mediado por estos receptores puede ser antagonizado tanto por bloqueantes competitivos de receptores VR₁ (capsazepina), CGRP₁ (CGRP 8-37), pero también puede ser inhibido por desensibilización con capsaicina.

Debido a que el efecto del antagonista competitivo del receptor VR₁, capsazepina, es mas bien moderado y que a concentraciones micromolares (las necesarias para inhibir las respuestas de capsaicina) también bloquea canales de Ca⁺⁺ (Docherty y cols, 1997) y receptores nicotínicos (Liu y Simon, 1997), en nuestros ensayos hemos estudiado el efecto de capsazepina, capsaicina y CGRP 8-37.

El efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 fue inhibido parcialmente (~50%), en los tres ensayos, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

Como demuestran nuestros resultados en el caso de la vasorrelajación producida por R(+)-metanandamida, parece existir una implicación parcial de los receptores vanilloides, puesto que se obtuvo inhibición, tanto con el bloqueo selectivo del receptor, como con la desensibilización del receptor, y con el bloqueo de uno de los mediadores vasodilatadores mas potentes implicado en su efecto.

Otros autores también han descrito el efecto de R(+)-metanandamida sobre receptores vanilloides , pero es la primera vez que se describe en arteria aorta de rata. También ha sido demostrado en arteria aorta de conejo (Mukhopadhyay y cols., 2002) y en arterias mesentéricas (Ralevic y cols., 2000; Malinowska y cols., 2001; Vanheel y Van De Voorde, 2001; Nieri y cols., 2002), donde se encontraron diferencias de efecto dependiendo de la rama mesentérica estudiada (O'Sullivan y cols., 2004).

De manera similar, no se había descrito previamente que el compuesto WIN 55,212-2 activase receptores vanilloides en vasos sanguíneos, ni se habían estudiado anteriormente sus efectos sobre aorta de rata.

A la vista de nuestros resultados podría sugerirse una implicación parcial de receptores vanilloides en el mecanismo de acción de WIN 55,212-2, debido a que se obtuvo un bloqueo del efecto vasodilatador tanto bloqueando selectivamente el receptor VR₁, desensibilizando el receptor, y con el bloqueo de receptores CGRP₁. Hay que señalar asimismo que la magnitud del bloqueo es similar para los dos cannabinoides estudiados.

No resulta fácil definir exactamente el subtipo de receptor vanilloide implicado en el mecanismo de acción de los cannabinoides en aorta de rata. Pertwee (2003). ha propuesto la existencia de un receptor de naturaleza vanilloide sensible a capsazepina y a SR141716A, que sería activado tanto por capsaicina como por los cannabinoides WIN 55,212-2 y CP 55940, que podría corresponderse con nuestros resultados .

1.1.3 Mecanismos intracelulares

Con el fin de identificar los principales mediadores celulares responsables de la vasodilatación producida por los cannabinoides estudiados en esta tesis doctoral, y teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la literatura, se han estudiado las principales vías de relajación endotelial como liberación de NO, prostaglandinas y EDHF.

Asimismo hemos estudiado el metabolismo y transporte al interior de la célula de R(+)-metanandamida porque los productos del metabolismo de cannabinoides también han sido propuestos como mediadores del efecto vasorrelajante. En este trabajo solamente han sido estudiados los efectos de la inhibición del transporte y metabolismo de R(+)-metanandamida ya que el WIN 55,212-2, debido a su naturaleza química, no puede seguir ninguna de estas vías.

A Mecanismos mediados por NO

Considerando que el NO es el principal mediador responsable de la relajación mediada por el endotelio, se estudió el efecto del inhibidor de la NO sintasa, L-NAME, sobre la respuesta inducida por cannabinoides en anillos de aorta de rata.

En presencia de L-NAME el efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 fue completamente abolido. Nuestros datos corroboran la importancia del papel del NO en esta respuesta vasodilatadora. Resultados similares han sido extensamente descritos, también en vasos de resistencia (Deutsch y cols., 1997; Maccarrone y cols., 2000; Högestätt y Zygmunt 2002). Asimismo, en células endoteliales aisladas de arteria renal de rata, la estimulación del receptor CB₁ da como resultado un incremento de la producción de NO (Deutsch y cols., 1997), lo que demuestra que en algunos lechos vasculares la anandamida es capaz de facilitar la vasodilatación dependiente de NO endotelial (Högestätt y Zygmunt 2002).

Con estos resultados se demuestra que la vasorrelajación producida por R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 en arteria aorta de rata es endotelio-dependiente, y que el NO juega un papel fundamental.

B Inhibición del metabolismo de R(+)-metanandamida

Los endocannabinoides son degradados por la FAAH dando lugar a ácido araquidónico. Este compuesto puede metabolizarse por distintas enzimas produciendo compuestos vasodilatadores. Por este motivo, en este trabajo se ha estudiado el metabolismo de R(+)-metanandamida y la posible implicación de algunos de los metabolitos que se producen por la vía del ácido araquidónico.

I Inhibición de la FAAH:

Para ello, el primer paso fue inhibir el metabolismo de R(+)-metanandamida por FAAH con dos dosis diferentes del compuesto PMSF, el más ampliamente utilizado para bloquear de la degradación de anandamida

Hasta el momento, no se ha llegado a conclusiones definitivas sobre el efecto que produce la inhibición de FAAH en la vasodilatación cannabinoide, habiéndose descrito, tanto inhibición en arterias mesentéricas (Ishioka y Bukoski, 1999) y en arterias coronarias bovinas (Grainger y Boachie-Ansah, 2001), como potenciación del efecto vasorrelajante en arterias mesentericas de ratas (White y cols, 1998), e incluso la ausencia de efecto en arteria coronaria y lecho mesentérico perfundido de rata (Vanheel y cols, 2001; White y cols, 2001).

En nuestro trabajo la inhibición del enzima FAAH por PMSF (200 y 100 μ M) produjo un bloqueo parcial y significativo del efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida (~50%), aunque este efecto no fue concentración-dependiente.

Por lo tanto parece que la R(+)-metanandamida penetra, al menos en parte, al interior celular, donde es metabolizada por la FAAH. Hay que señalar que esto parece lógico por la similitud estructural que tiene la R(+)-metanandamida con el endocannabinoide anandamida.

Nuestros resultados, además sugieren, de manera indirecta, la presencia de la enzima FAAH en aorta de rata.

Se sabe que el ácido araquidónico generado por la transformación de anandamida, se biotransforma por distintas rutas de las cuales las que han adquirido más importancia para justificar el efecto vascular de los

cannabinoides son las de metabolización via ciclooxigenasa y via CYP450. De hecho los metabolitos originados en estas rutas son conocidos vasodilatadores y se han implicado en la vasorrelajación producida por cannabinoides.

II Inhibición de COX

Con objeto de comprobar si la liberación de PGs vasodilatadoras en la arteria aorta de la rata participa en el efecto de R(+)-metanandamida, se empleó indometacina (50 μ M) para bloquear la síntesis de PGs.

En nuestras condiciones experimentales, la indometacina bloqueó parcialmente el efecto de R(+)-metanandamida (~30%).

Aunque el WIN 55,212-2 no es sustrato de COX, el efecto de su inhibición se estudió para descartar efectos inespecíficos.

Estos resultados indican que los metabolitos producidos por COX al metabolizar el ácido araquidónico están implicados en la vasorrelajación producida por R(+)-metanandamida, pero no nos permiten identificar que isoenzima es responsable de este efecto, ya que la indometacina es un inhibidor inespecífico de las dos isoenzimas de COX.

La participación de derivados de ciclooxigenasa en la vasorrelajación inducida por cannabinoides ha sido descrita previamente en arterias cerebrales de ratas, (Ellis y cols, 1995; Randall, 2003), en arterias mesentéricas de rata (Vanheel y Van de Voorde, 2001) y conejo (Fleming y cols, 1999) y en arterias coronarias bovinas (Grainger y Boachie-Ansah, 2001) donde los cannabinoides producen vasorrelajación que es sensible a indometacina.

Contrariamente a estos resultados, Chaytor y cols (1999) no encontraron implicación de prostanoïdes en el efecto de anandamida y R(+)-metanandamida en arteria mesentérica de conejo.

Además de la transformación de R(+)-metanandamida a derivados de PGs, el efecto de indometacina podría ser explicado por el hecho de que la R(+)-metanandamida podría inducir la expresión de COX₂ y por tanto aumentar la liberación de PGs (Ramer y cols.,2001; Hinz y cols, 2003).

III Inhibición del CYP450:

La utilización de un inhibidor de CYP450, 17-ODYA, inhibió escasamente la respuesta vasorrelajante producida por R-(+)-metanandamida.

Estos resultados indican que los metabolitos del ácido araquidónico producidos por CYP450 no son de importancia en el efecto vasorrelajante producido por R(+)-metanandamida en la aorta de la rata. Esto concuerda con los resultados obtenidos utilizando miconazol en las ramas de la arteria mesentérica de rata (Ishioka y Bukoski, 1999) y miconazol y 17-ODYA en arterias coronarias bovinas (Grainger y Boachie-Ansah, 2001).

C Mecanismos mediados por EDHF

Se ha descrito que la activación de receptores cannabinoides estimula la liberación de EDHF, el cual, produce hiperpolarización de la membrana celular por apertura de canales de K⁺.

La implicación de EDHF no se había descrito anteriormente con R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2. En esta tesis doctoral, se evaluó el efecto de la combinación de dos toxinas: charibdotoxina (un bloqueante de canales de K⁺-voltaje dependientes y de Ca⁺⁺ de alta conductancia activados por K⁺) y apamina (un bloqueante de canales de Ca⁺⁺ de baja conductancia activados por K⁺) que regulan la liberación de EDHF en anillos de aorta de rata.

En ninguno de los casos la combinación de ambas toxinas produjo inhibición del efecto vascular de los cannabinoides estudiados, lo que descarta en principio la implicación de EDHF en el efecto vasorrelajante de R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 en aorta aislada de rata.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en arteria basilar de cobayo (Zygmunt y cols, 2000), en arteria hepática de rata (Zygmunt y cols, 1997) y en arteria mesentérica de conejo (Kagota y cols, 2001). Los resultados descritos en relación a este tema siguen siendo contradictorios. De hecho, en la arteria mesentérica de rata la implicación de EDHF ha sido ampliamente demostrada (Jarai y cols, 1999; Randall y Kendall, 1997; Harris y cols., 2002; Offertaler y cols, 2003; O'Sullivan y cols, 2004).

Estas diferencias, así como los resultados obtenidos en esta tesis doctoral podrían explicarse por lo propuesto por Triggle y Ding (2002), que sugieren que la liberación de EDHF y la consiguiente hiperpolarización de la membrana es más importante en vasos de resistencia que en vasos de conductancia.

D Inhibición del transporte de anandamida por AM404:

Para demostrar la importancia y participación del metabolismo de los cannabinoides en su efecto vasodilatador es necesario que estos accedan al interior de la célula, tanto endotelial como células de la musculatura lisa. Como ya se ha descrito en la introducción de esta tesis doctoral, existe una gran controversia sobre la participación del transportador de anandamida en los efectos de los endocannabinoides, e incluso sobre su existencia. (Beltramo y cols., 1997; Glaser y cols, 2003).

Lo primero que hay que señalar es que la influencia de este transporte solo se ha evaluado con el análogo estable de anandamida, R(+)-

metanandamida, ya que este transportador es específico de anandamida y por tanto de los cannabinoides estudiados en este trabajo, solo la R(+)-metanandamida podría utilizar este transportador para acceder al interior celular por su similitud estructural con anandamida.

En nuestras preparaciones la respuesta vasorrelajante a R-(+)-metanandamida fue inhibida parcialmente (25%) por AM 404. Otros autores describen resultados similares a los obtenidos en esta tesis doctoral en arterias mesentéricas aisladas de conejo (Chaytor y cols., 1999). Estos investigadores comprueban que el efecto inhibitor de AM404 es más potente sobre anandamida (~40%) que sobre R-(+)-metanandamida (~29%).

También en este punto hay discrepancias, ya que mientras algunos autores ratifican el efecto inhibitor de AM404 sobre anandamida en diferentes lechos vasculares como arterias coronarias bovinas (Grainger y Boachie-Ansah, 2001), otros afirman que no solo no inhibe sino que potencia los efectos vasorrelajantes de anandamida en lecho mesentérico aislado y perfundido de rata (Mendizábal y cols., 2001).

2 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NUEVAS MOLÉCULAS DE NATURALEZA CANNABINOIDE.

La caracterización farmacológica de las nuevas moléculas de naturaleza cannabinoide sintetizadas por el equipo de química médica del CSIC dirigido por la Dra. Pilar Goya, tanto *in vitro* como la valoración *in vivo* de sus efectos en ratón, ha constituido el fundamento de la segunda parte de la presente tesis doctoral.

La síntesis de nuevos compuestos de naturaleza cannabinoide con una mayor selectividad por algún subtipo de receptor, tiene una gran importancia en la actualidad. En los últimos años han aparecido múltiples trabajos sobre relación estructura-actividad y especialmente selectividad por algún subtipo de receptor CB.

A pesar de que hay muchos tejidos que contienen receptores CB₁, la mayoría de los ensayos preliminares *in vitro* se hacen siempre en conducto deferente de ratón. Los agonistas cannabinoides poseen la capacidad de producir una inhibición de las respuestas contráctiles inducidas por estimulación eléctrica en algunos tejidos aislados, como el conducto deferente de ratón, y este efecto es bloqueado por los antagonistas de receptores cannabinoides (Pertwee, 1997).

Otra de las pruebas iniciales que se llevan a cabo cuando se estudia la posible naturaleza cannabinoide de un compuesto, es la comprobación de los efectos *in vivo* en el ratón, lo que se conoce con el nombre de “tetrada cannabinoide” (analgesia, hipotermia, inhibición de la actividad motora espontánea y catalepsia) que aparece cuando se inyecta por vía intraperitoneal al ratón un compuesto agonista cannabinoide y que es bloqueada por antagonistas cannabinoides (Martin y cols., 1987; Pertwee, 1972; Compton y cols., 1993).

En nuestro trabajo, para comprobar el efecto de los nuevos compuestos, denominados LHs, hemos utilizado ambos tipos de pruebas, comparandolos tanto con agonistas cannabinoides (anandamida y WIN 55,212-2) como con antagonistas del receptor CB₁ (AM251 y SR141716A).

2.1 ENSAYOS “*IN VITRO*”

Para comprobar el efecto de los nuevos compuestos, se empleó el conducto deferente de ratón, que posee diversos tipos de receptores para numerosas sustancias, entre los cuales se encuentran los receptores CB₁ de cannabinoides (Pertwee y cols., 1996; Lay y cols., 2000), y no se puede descartar la presencia del subtipo CB₂ (Griffin y cols., 1997).

La inhibición del efecto contráctil producido por estimulación eléctrica en diversos tejidos aislados se debe probablemente a un efecto presináptico, disminuyendo la liberación de neurotransmisores que son los responsables de la contracción de la musculatura lisa. Este efecto podría ser el resultado, a su vez, de la inhibición de flujos de Ca⁺⁺ producida por los cannabinoides (Pertwee y Griffin, 1995). Los antagonistas como AM251 y SR141716A, activos sobre receptor CB₁, atenúan significativamente este efecto inhibitor de los agonistas (Rinaldi-Carmona y cols., 1995; Lay y cols., 2000).

En nuestros experimentos, los agonistas cannabinoides WIN 55212-2 y anandamida inhibieron las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en conducto deferente de ratón, mientras que ninguno de los nuevos compuestos ensayados tuvo efecto sobre dichas contracciones. Esto permite descartar el efecto agonista de estos compuestos, no solo de receptores cannabinoides sino de otros receptores presentes en conducto deferente de ratón (adrenérgicos, μ , δ y K opioides y purinérgicos).

Posteriormente, y con objeto de valorar su posible efecto antagonista cannabinoide, se ensayó su capacidad de inhibir la respuesta de los agonistas cannabinoides WIN 55212-2 y anandamida. Los antagonistas de referencia utilizados en este trabajo (SR141716A y AM251), produjeron una disminución del efecto vasodilatador, lo que concuerda con los resultados obtenidos por otros autores con los mismos compuestos y que demuestra la validez de la técnica (Rinaldi-Carmona y cols., 1995).

De todos los compuestos ensayados en este trabajo, solo tres (LH1.11, LH1.20 y LH1.21) producen una reducción estadísticamente significativa del efecto inhibitor de la contracción producido por WIN 55,212-2 y anandamida, de una forma similar a la de los compuestos de referencia.

Dada la ausencia de efecto en tejido aislado y el hecho de que no se observaron modificaciones significativas de la contracción cuando se administraron solos, podemos sugerir que estos tres compuestos se comportan como antagonistas cannabinoides.

Con los datos de que disponemos no podemos afirmar ni descartar que se trate de un antagonismo competitivo ya que la baja solubilidad de los agonistas no permite incrementar las concentraciones en el baño de órganos y por lo tanto no es posible comprobar si se alcanzaría el efecto máximo.

A pesar de que se ha demostrado un efecto antagonista en estos estudios funcionales, ensayos de unión al receptor no corroboraron los resultados obtenidos en tejido aislado.

Esta discrepancia entre actividad biológica y ensayos de unión al receptor ha sido descrita para muchas sustancias incluidas los bloqueantes de la recaptación de dopamina y cannabinoides (Lake y cols., 1997; Xu y cols., 2002), y pueden ser debidas a la naturaleza de la interacción ligando-receptor

(antagonismo competitivo o no competitivo), tipo de ensayo *in vitro*, existencia de distintos subtipos del receptor, incluidos los cambios conformacionales del receptor (descritos para receptores CB₁) (Losonczy y cols., 2004).

Hasta el momento no se ha conseguido sintetizar compuestos antagonistas puros del receptor cannabinoide CB₁, puesto que se ha descrito, que tanto el SR141716A como el AM 251, pueden actuar como agonistas inversos (Landsman y cols., 1997; Bouaboula y cols., 1999).

2.2 ENSAYOS “*IN VIVO*”

El efecto del compuesto LH1.21 fue evaluado usando el modelo más aceptado de evaluación de compuestos cannabinoides *in vivo*, la tetrada cannabinoide. El tratamiento de ratones con LH1.21 no indujo modificaciones significativas en ninguno de los parámetros valorados (nocicepción, temperatura corporal, actividad espontánea y catalepsia).

Esto descarta nuevamente la posible actividad agonista cannabinoide de este compuesto. Asimismo, se comprobó la capacidad de este compuesto para bloquear los efectos de WIN 55,212-2 en este modelo animal, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con el antagonista SR141716A.

Estos resultados corroboran los obtenidos en conducto deferente de ratón, aunque son necesarios más estudios para comprobar la naturaleza exacta del antagonismo producido por estos nuevos compuestos, puesto que su interés ha quedado demostrado por el hecho de que hayan sido patentados y que un laboratorio farmacéutico esté interesado en adquirir los derechos de esta patente.

CONCLUSIONES.....133
1 Efectos vasculares de R(+)-metanandamida y Win 55,212-2 134
2 Caracterización Farmacológica de nuevos Cannabinoides 135

CONCLUSIONES

1 Efectos vasculares de R(+)-metanandamida y Win 55,212-2

1) El efecto vasorrelajante de R-(+)-metanandamida y Win 55,212-2 en la aorta aislada de rata, parece ser producido por la mediación de varios mecanismos. En relación a los receptores implicados en la vasodilatación producida por estos cannabinoides, ambos compuestos actúan a través de receptores cannabinoides, aunque no parece que sean los receptores clásicos los exclusivamente implicados, sino que en este efecto vasodilatador también participan, aunque de manera parcial, los receptores VR_1 y sistemas efectores activados por estos. Esta es la primera vez que se describe este efecto con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2.

2) Con estos resultados se demuestra que la vasorrelajación producida por R(+)-metanandamida y WIN 55,212-2 en arteria aorta de rata es endotelio dependiente, produciendo su efecto a través de la liberación de NO, pero no de prostanoïdes o EDHF. Al contrario que en las arterias de pequeño calibre, ninguno de los dos compuestos estudiados produce hiperpolarización de células de la musculatura lisa de la arteria aorta de la rata.

3) La metabolización de R(+)-metanandamida produce compuestos vasodilatadores implicados en su mecanismo de acción,

2 Caracterización Farmacológica de nuevos Cannabinoides

Con los resultados obtenidos con los nuevos derivados 1-24 triazólicos ensayados en este trabajo, podemos afirmar que poseen actividad antagonista de receptores de cannabinoides. El compuesto LH1.21 tiene una eficacia similar al antagonista de referencia SR141716A.

BIBLIOGRAFÍA.....135

- Adams,M.D.; Earnhardt,J.T.; Martin,B.R.; Harris,L.S.; Dewey,W.L.; Razdan,R.K.: A cannabinoid with cardiovascular activity but no overt behavioral effects. *Experientia* 33.9 : 1204-05, 1977
- Adams,I.B.; Ryan,W.; Singer,M.; Thomas,B.F.; Compton,D.R.; Razdan,R.K.; Martin,B.R.: Evaluation of cannabinoid receptor binding and *in vivo* activities for Anandamide analogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **273**: 1172-1181, 1995
- Andersson,D.A.; Adner,M.; Hogestatt,E.D.; Zygmunt,P.M.: Mechanisms underlying tissue selectivity of anandamide and other vanilloid receptor agonists. *Mol Pharmacol* **62(3)**: 705-713, 2002
- Ashton, C. H. Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *Br.J.Anaesth.* **83.4**: 637-49, 1999
- Ashton,C.H.: Biomedical benefits of cannabinoids? *Addiction Biology* **4**: 111-126, 1999
- Begg, M.; Mo, F-M.; Offertáler, L.; Bátkai, S.; Pacher, P.; Razdan, R.K.; Lovinger, D.M.; Kunos,G.:G Protein-coupled Endothelial Receptor for atypical Cannabinoid ligands modulates a Ca²⁺ -dependent K⁺ Current. *J Biol Chem*, **278 (46)**: 46188-46194, 2003
- Beltramo, M; Stella, N; Calignano,A; Lin, S.Y.; Makriyannis,A; Piomelli,D.: Functional role of high-affinity anadamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**: 1094-1097, 1997
- Bilfinger,T.V.; Salzet,M.; Fimiani,C.; Deutsch,A.; Tramu,G.; Stefano,G.B.: Pharmacological evidence for anandamide amidase in human cardiac vascular tissues. *Int J Cardiology* **64**: S15-S22, 1998
- Bisogno,T.; Berrendero,F.; Ambrosino,G.; Cebeira,M; Ramos,J.A.; Fernández-Ruiz,J.J.; Di Marzo,V.: Brain regional distribución of endocannabinoids: implications for their biosíntesis ad biological function. *Biochem Res Commun* **256**: 377-380, 1999.

-
- Bornheim,L.M.; Kim,K.Y.; Chen,B.; Correia,M.A.: Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem.Pharmacol.* **50.5**: 677-86, 1995
- Bouaboula,M.; Desnoyer,N.; Carayon,P.; Combes,T.; Casellas,P.: Gi protein modulation induced by a selective inverse agonist for the peripheral cannabinoid receptor CB2: implication for intracellular signalization cross-regulation. *Mol Pharmacol* **55**: 473-480, 1999
- Bouchard,J. F.; Lepicier,P.; Lamontagne,D.: Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* **72.16**: 1859-70, 2003
- Buchwald,A.; Browne,C.E.; Wu,W.M.; Ji,F.; Bodor,N.: Soft cannabinoid analogues as potential anti-glaucoma agents. *Pharmazie* **55**: 196-201, 2000.
- Bukoski,R.D., Batkai, S., Jarai, Z., Wang,Y. Offertaler,L., Jackson, W.F., Kunos, G :CB1receptor antagonist SR141716A inhibits Ca⁺⁺ induced relaxation in CB1 deficient mice. *Hypertension*, **39**:251-257, 2002
- Burstein,S.H.; Rossetti,R.G.; Yagen,B.; Zurier,R.B.. Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **61.1-2**: 29-41, 2000
- Campbell,F.;Tramer,M.R.; Reynolds,D.J.: Are cannabinoids an efective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *Bri. Med. J.* **323 (7303)**:13-16, 2001.
- Carlisle,S.J.; Marciano-Cabral,F.; Staab,A.; Ludwick,C.; Cabral,G.A. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int.Immunopharmacol.* **2.1**: 69-82, 2002
- Caterina, M.J.: The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**:816-824, 1999
- Chaytor,A.T.; Martin; P.E.; Evans,W.H.; Randall,M.D.; Griffith,T.M.: The endothelial component of cannabinoid-induced relaxation in rabbit mesenteric artery depends on gap junctional communication. *J Physiol.* **520**: 539-550, 1999

- Chen, J.; Krauss, A.H-P.; Protzman, C.E.; Uasnaky, H.; Burk, R.M.; Andrews, S.W.; Woodward, D.F.: Studies on the pharmacology of prostamideF2 α a naturally occurring substance. *Br. J. Pharmacol.* **133**: 63P, 2001
- Christopoulos,A.; Coles,P.; Lay,L.; Lew,M.J.; Angus,J.A.: Pharmacological analysis of cannabinoid receptor activity in the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol* **132**: 1281-1291, 2001
- Clayton,N.; Marshall,F.H.; Bountra,C.; O'Shaughnessy,C.T.CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain* **96.3**: 253-60, 2002
- Colombo,G.; Agabio,R.; Diaz,G.; Lobina,C.; Reali,R.; Gessa,G.L.: Appetite supresión and weight loss after the cannabinoid antagonist SR141716A. *Life Sci* **63**: L113-L117, 1998.
- Cravatt,B.F.; Giang,D.K.; Mayfield,S.P.; Boger,D.L.; Lerner,R.A.; Gilula,N.B.: Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**: 83-87, 1996.
- Croxford, J. L.: Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS.Drugs* **17.3**: 179-202, 2003
- Deutsch,D.G.; Goligorsky, M.S.; Schmid,P.G.; Krebsbach,R.J.; Schmid,R.J.; Das,S.K.; Dey,S.K.; Arreaza,G.; Thorup,C.; Stefano,G.; Moore,L.C.: Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest*, **100**: 1538-1546, 1997
- Devane,W.A.; Dysarz,F.A.; 3rd;; Johnson,M.R.; Melvin,L.S.; Howlett,A.C.: Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **34**: 605-613, 1988.
- Devane,W.A.; Hanus,L.; Breuer,A.; Pertwee,R.G.; Stevenson,L.A.; Griffin,G.; Gibson,D.; Mandelbaum,A.; Etinger,A.; Mechoulam,R.: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258.5090**: 1946-49, 1992
- Dewey,W.L.: Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **38**:151-178, 1976

- Di Carlo, G.; Izzo, A.A.: Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert.Opin.Investig.Drugs* **12.1**: 39-49, 2003
- Di Marzo,V.: Endocannabinoids in the new millennium. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* **66.2-3** : 91-92, 2002
- Di Marzo,V.; Bisogno,T.; De Petrocellis,L.; Melck,D.; Martin,B.R.: Cannabimimetic fatty acid derivatives: The anandamide family and other "Endocannabinoids". *Curr Med Chem* **6**: 721-744, 1999
- Di Marzo,V.; Breivogel,C.; Bisogno,T.; Melck,D.; Patrick,G.; Tao,Q.; Szallasi,A.; Razdan,R.K.; Martin,B.R.: Neurobehavioral activity in mice of N-vanillyl-arachidonyl-amide *Eur J Pharmacol* **406**: 363-374, 2000
- Di Marzo,V.; Goparaju,S.K.; Wang,L.; Liu,J.; Bátkai,S.; Járai,Z.; Fezza,F.; Miura,G.I.; Palminter, R.D.; Sugiura,T.; Kunos,G.: Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **410**: 822-825, 2001
- 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.: A Structure/Activity relationship study on Arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid. *J Pharmacol Exp Ther* **300(3)**: 984-991, 2002
- Di Marzo,V.; Hill,M.P.; Bisogno,T.; Crossman,A.R.; Brotchie,J.M.: Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson`s disease. *The FASEB Journal* **14**: 1432-1438, 2000
- Ellis, E.F.; Moore,S.F. ; Willoughby,K.A: Anandamide and THC dilation of cerebral arterioles is blocked by indomethacin, *Am J Physiol* **38**: H1859-H1864, 1995
- Evans, A. T.; Formukong,E.; Evans.F.J.: Activation of phospholipase A2 by cannabinoids. Lack of correlation with CNS effects. *FEBS Lett.* **211.2** : 119-22. 1987
- Felder, C. C.; Glass.M.: Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **38** : 179-200, 1998

- Fernandez-Ruiz,J.; Lastres-Becker,I.; Cabranes,A.; De Lago, E.: Utilidad de los cannabinoides en la patología motora. En: Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides. Ed.José Antonio Ramos Atance y Javier Fernandez-Ruiz. Madrid, 2003, pp59-76
- Fleming,I.; Schermer,B.; Popp,R.; Busse,R.: Inhibition of the production of endothelium-derived hyperpolarizing factor by cannabinoid receptor agonists. *Br.J.Pharmacol.* **126.4** : 949-60, 1999
- Fowler,C.J.; Jonsson,K-O.; Tiger,G.: Fatty acid amide hydrolase: biochemistry, pharmacology, and therapeutic possibilities for an enzyme hydrolyzing anandamide, 2-arachidonoylglycerol, palmitoylethanolamide, and oleamide. *Biochemical Pharmacology* **62**: 517-526, 2001
- Fulton, D. and J. Quilley. Evidence against anandamide as the hyperpolarizing factor mediating the nitric oxide-independent coronary vasodilator effect of bradykinin in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **286.3** : 1146-51, 1998
- Furchgott,R.F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research* **53(5)**: 557-573, 1983
- Furchgott,R.F.; Zawadzki,J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376, 1980
- Gardiner,S.M.; March,J.E.; Kemp,P.A.; Bennett,T.. Regional haemodynamic responses to the cannabinoid agonist, WIN 55212-2, in conscious, normotensive rats, and in hypertensive, transgenic rats. *Br.J.Pharmacol.* **133.3** : 445-53, 2001
- Gebremedhin,D.; Lange,A.r.; Campbell,W.B.; Hillard,C.J.; Harder,D.R.: Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* **276**: H2085-H2093, 1999.
- Glaser,S.T.; Abumrad,N.A.; Fatade,F.; Kaczocha,M.; Studholme,K.M.; Deutsch,D.G.Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100.7**: 4269-74, 2003

- Glass, M., Dragunow, M.; Faull, R.L.: The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* **97.3** : 505-19, 2000
- Glass, M.; Dragunow, M.; Faull, R.L.: Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* **77.2**: 299-318, 1997
- Glass, M.; Brotchie, J.; Maneuf, M.P.: Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *Eur. J. Neurosci.* **9.2**: 199-203, 1997
- Glass, M.; Faull, R.L.; Dragunow, M.: Loss of cannabinoid receptors in the substantia nigra in Huntington's disease. *Neuroscience* **56**: 523-527, 1993.
- Gouldson, P.; Calandra, B.; Legoux, P.; Kernéis, A.; Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; LeFur, G.; Ferrara, P.; Shire, D.: Mutational analysis and molecular modelling of the antagonist SR144528 binding site on the human cannabinoid CB2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **401**: 17-25, 2000
- Goutopoulos, A.; Fan, P.; Khanolkar, A.D.; Xie, X.; Lin, S.; Makriyannis, A.: Stereochemical selectivity of methanandamides for the CB1 and CB2 cannabinoid receptors and their metabolic stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **9**: 1673-1684, 2001
- Goya, P.; Jagerovic, N.: Recent advances in cannabinoid receptors agonists and antagonists. *Exp. Opin. Ther. Patents*, **10**: 1529-1538, 2000.
- Grainger, J.; Boachie-Ansah, G.: Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* **134**: 1003-1012, 2001
- Griffin, G.; Fernando, S.R.; Ross, R.A.; McKay, N.G.; Ashford, M.L.J.; Shire, D.; Huffman, J.W.; Yu, S.; Lainton, J.A.H.; Pertwee, R.G.: Evidence for the presence of CB₂-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol* **339**: 53-61, 1997

- Guiffrida,A.; Beltramo,M.; Piomelli,D.: Mechanisms of endocannabinoid inactivation: Biochemistry and Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **298(1)**: 7-14, 2001
- Guzman, M., Sanchez,C.; Galve-Roperh,I.: Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol.Sci.* **22.1**: 19-22, 2001
- Guzman, M., Sanchez,C.; Galve-Roperh,I.: Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J.Mol.Med.* **78.11**: 613-25, 2001
- Guzmán,M.: Neurons on cannabinoids: dead or alive? *Br. J. Pharmacol* **140**: 439-440, 2003
- Harris,D.; McCulloch,A.I.; Kendall,D.A.; Randall,M.D.: Characterization of vasorelaxant responses to anandamide in the rat mesenteric arterial bed. *Journal of Physiology* **539.3**: 893-902, 2002
- Hillard,C.J.: Endocannabinoids and vascular function. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 27-32, 2000.
- Hillard,C.J.; Edgemond,W.S.; Jarrahan,A.; Campbell,W.B.: Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* **69**: 631-638, 1997.
- Hinz, B., Ramer,R.; Brune,K.: Induction of COX-2 expression by the endocannabinoid derivative R(+)-methanandamide. *Adv.Exp.Med.Biol.* **525**: 145-52. 2003
- Ho, W. S.; Hiley,C.R.: Endothelium-independent relaxation to cannabinoids in rat-isolated mesenteric artery and role of Ca²⁺ influx. *Br.J.Pharmacol.* **139.3**: 585-97, 2003
- Högestätt E.D., Zygmunt P.M.: Cardiovascular pharmacology of anandamide. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **66**: 343-351, 2002
- Holland ,M.; Challis,R.A.; Standen,N.B.; Boyle,J.P.. Cannabinoid CB1 receptors fail to cause relaxation, but couple via Gi/Go to inhibition of adenylyl cyclase in carotid artery smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 597-604, 1999

- 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.: International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews* **54(2)**: 161-202, 2002
- Howlett,A.C.; Fleming,R. M.: Cannabinoid Inhibition of Adenylate Cyclase. *Mol Pharmacol* **26**: 532-538, 1984
- Howlett,A.C.; Johnson,M.R.; Melvin,L.S.; Milne,G.M.: Nonclassical Cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* **33**: 297-302, 1988
- Ishac,E.J.; Jiang,L.; Lake,K.D.; Varga,K.; Abood,M.E.; Kunos,G.: Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* **118**: 2023-2028,1996.
- Ishioka,N. and Bukoski,R.D: A role for N-arachidonylethanolamida (anadamide) as a mediator of sensory nerve-dependent Ca⁺⁺-induced relaxation. . *J Pharmacol Exp Ther* **289**:245-250, 1999
- Izzo,A.A.; Mascolo,N.; Tonini,M.; Capasso,F.: Modulation of peristalsis by cannabinoid CB1 ligands in the isolated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol* **129**: 984-990, 2000
- Jagerovic,N.; Hernandez-Folgado,L.; Alkorta,I.; Goya,P Navarro,M.; Serrano,A Rodriguez de Fonseca,F.; Dannert,M.T.; Alsasua,A.; Suardiaz,M.; Pascual,D.; Martín,M.I.; Discovery of 5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1H-1,2,4-triazole, a Novel in Vivo Cannabinoid Antagonist Containing a 1,2,4-Triazole Motif *J Med Chem*, 2004 (en prensa)
- Jarai,Z.; Wagner,J.A.; Goparaju,S.K.; Wang,L.; Razdan,R.K.; Sugiura,T.; Zimmer,A.M.; Bonner,T.I.; Zimmer,A.; Kunos,G.: Cardiovascular effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice. *Hypertension* **35.2** : 679-84, 2000

- Jarai,Z; Wagner,J.A.; Varga,K.; Lake,K.D.; Compton,D.R.; Martin,B.M.; Zimmer,A.M.; Bonner,T.I.; Buckley,N.E.; Mezey,E.; Razdan,R.K.; Zimmer,A.; Kunos,G.: Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14136-14141, 1999.
- Joyeux,M.; Arnaud,C.; Godin-Ribuot,D.; Demenge,P.; Lamontagne,D.; Ribuot,C.: Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc.Res.* **55.3**: 619-25, 2002
- Kagota,S.; Yamaguchi,Y.; Nakamura,K.; Sugiura,T.; Waku,K.; Kunitomo,M.: 2-Arachidonoylglycerol, a candidate of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Eur.J.Pharmacol.* **415.2-3**: 233-38, 2001
- Kaminsky,L.J.; Wang, N.E.: Anandamide-induced depressor effect in spontaneously hypertensive rats: role of the vanilloid receptor. *Hypertension*,**41(3Pt2)**:757-62,2003.
- Kathmann,M.; Bauer,U.; Schlicker,E.; Gothert,M.: Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of NMDA- and kainate-stimulated noradrenaline and dopamine release in the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**: 466-470, 1999.
- Kozak, K.R.; Crews, B.C.; Morrow,J.D.; Wang, L-H.; Ma, Y.H.; Weinander, R.; Jakobsson, P-J.; Marnett, L.J.: Metabolism of the endocannabinoids, 2-Arachidonoylglycerol and Anandamide, into Prostaglandin, Thromboxane, and Prostacyclin Glycerol Esters and Ethanolamides. *The Journal of Biological Chemistry* **277(47)**: 44877-44885, 2002
- Kunos, S. Batkai, L. Offertaler, F. Mo, J. Liu, J. Karcher, and J. Harvey-White. The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. *Chemistry and Physics of Lipids* **121 (1-2)**:45-56, 2002.
- Kunos,G.; J arai,Z.; B atkai,S.; Goparaju,S.K.; Ishac,E.J.N.; Liu,J.; Wang,L.; Wagner,J.A.: Endocannabinoids as cardiovascular modulators. *Chemistry and Physics of Lipids*,. **108**: 159-168, 2000

- Lake, K.D.; Compton, D.R.; Varga, K.; Martin, B.R.; Kunos, G.: Cannabinoid-induced hypotension and bradycardia in rats is mediated by CB1-like cannabinoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **281(3)**: 1030-1037, 1997
- Landsman, R.S.; Burkey, T.H.; Consroe, P.; Roeske, W.R.; Yamamura, H.I.: SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol* **334**: R1-R2, 1997.
- Lang, W.; Qin, C.; Lin, S.; Khanolkar, A.D.; Goutopoulos, A.; Fan, P.; Abouzid, K.; Meng, Z.; Biegel, D.; Makriyannis, A.. Substrate specificity and stereoselectivity of rat brain microsomal anandamide amidohydrolase. *J.Med.Chem.* **42.5**: 896-902, 1999
- Lastres-Becker, I.; de Miguel, R.; Fernandez-Ruiz, J. J.: The endocannabinoid system and Huntington's disease. *Curr.Drug Target CNS.Neurol.Disord.* **2.5** : 335-47, 2003
- Lastres-Becker, I.; Fezza, F.; Cebeira, M.; Bisogno, T.; Ramos, J.A.; Milone, A.; Fernandez-Ruiz, J.; Di, Marzo, V: Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport* **12.10** : 2125-29, 2001
- Lay, L.; Angus, J.A.; Wright, C.E.: Pharmacological characterisation of cannabinoid CB1 receptors in the rat and mouse. *Eur. J. Pharmacol* **391**: 151-161, 2000
- Lemberger, L.: Nabilone: a synthetic cannabinoid of medicinal value. In: G.G. Nahas, K.M. Sutin, D.J. Harvey, S. Agurel (Eds.) *Marihuana and Medicine*. pp.561-566.
- Lepicier, P.; Bouchard, J.F.; Lagneux, C.; Lamontagne, D: Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* **139(4)**: 805-815, 2003
- Li, J.; Daughters, R.S.; Bullis, C.; Bengiamin, R.; Stucky, M.W.; Brennan, J.; Simone, D.A.: The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain* **81**: 25-33, 1999

- Lichtman, A. H.; Martin, B. R.: Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **258.2**: 517-23. 1991
- Liu, J.; Gao,B.; Mirshahi, Sanyal,A.J. ; Khanolkar,A.D.; Makriyannis,A.; Kunos,G.: Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J*, **346**:835-840, 2000
- Lopez-Miranda,V.; Herradón E., Dannert M.T, Alsasua A.; Martín M.I.: Cannabinoids and vascular research: are we using the right solvent in our protocols? *Cardiovasc Res*, 2004 (en prensa).
- López-Miranda V., Dannert M.T, Herradón E., Martín M.I., Alsasua A.: Implication of CB₁ and CB₂ receptors in the vasorelaxation induced by anandamide and methanandamide in rat aorta. role of endothelium. *Eur J Pharmacol.* , 2004 (en prensa).
- Losonczy, A.; Biro, A. A.; Nusser, Z.: Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons.*Proc. Natl. Acad Sci U.S.A.* **101**: 1362-1367, 2004
- Macarrone,M.; Bari,M.; Lorenzon,T; Bisogno,T.; DiMarzo,V; Finazzi-Agro,A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*, **275 (18)**: 13484-13492, 2000
- Mackie,K.; Hille.: Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3825-3829, 1992.
- Maingret,F.; Patel,A.J.; Lazdunski,M.; Honore,E.: The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1. *EMBO J.*, **20**:47-54, 2001
- Malan, T.P.; Ibrahim, M.M.; Lai, J.; Vanderah, T.W.; Makriyannis, A.; Porreca, F.: CB2 cannabinoid receptor agonists: pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol.* **3(1)**:62-7, 2003
- Malan,T.P.; Ibrahim,M.M.; Vanderah,T.W.; Makriyannis,A.; Porreca,F.: Inhibition of pain responses by activation of CB2 cannabinoid receptors. *Chemistry and Physics of Lipids* **121.1-2**: 191-200, 2002

-
- Malinowska,B.; Kwolek,G.; Göthert,M.: Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **364**: 562-569, 2001
- Maneuf,Y.P.; Nash,J.E.; Crossman,A.R.; Brotchie,J.M. Activation of the cannabinoid receptor by delta 9-tetrahydrocannabinol reduces gamma-aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *Eur.J.Pharmacol.* **308.2** : 161-64, 1996
- Manzanares,J.; Corchero,J.; Romero,J.; Fernández-Ruiz,J.J.; Ramos,J.A.; Fuentes,J.A.: Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *TiPs* **20**: 287-294, 1999
- Martin,B.R.: Identification of the Endogenous Cannabinoid system through Integrative Pharmacological Approaches. *J Pharmacol Exp Ther* **301(3)**: 790-796, 2002
- Martin,B.R.; Compton,D.R.; Little,P.J.; Martin,T.J.; Beardsley,P.M.: Pharmacological evaluation of agonistic and antagonistic activity of cannabinoids. *NIDA Res.Monogr* **79** : 108-22, 1987
- Martin,B.R.; Mechoulam,R.; Razdan,R.K.: Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life science* **65(6/7)**: 573-595, 1999.
- Martin,W.J.; Hohmann,A.G.; Walker,J.M.: Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: antinociceptive effects. *J. Neurosci* **16(20)**: 6601-6611, 1996
- Matsuda,L.A.; Lolait,S.J.; Brownstein,M.J.; Young,A.C.; Bonner,T.I.: Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**: 561-564, 1990.
- Mechoulam,R.: Recent advantages in cannabinoid research. *Forsch Komplementarmed* **6(suppl3)**: 16-20, 1999.
- Mechoulam,R.; Ben-Shabat,S.; Hanus,L.; Ligumsky,M.; Kaminski,N.E.; Schatz,A.R.; Gopher, A.; Almog,S.; Martin,B.R.; Compton,D.R.; Petrwee,R.G.; Griffin,G.; Bayewitch,M.; Barg,J.; Vogel,Z.: Identification of

- an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* **50**: 83-90, 1995.
- Mechoulam,R.; Gaoni,Y.: A total synthesis of dl delta-1tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* **87**: 3273-3275, 1965.
- Melck,D.; Bisogno,T.; De Petrocellis,L.; Beaulieu,P.; Rice,A.S.; Di,Marzo,V.: Cannabimimetic eicosanoids in cancer and inflammation: an update. *Adv.Exp.Med.Biol.* **507**: 381-86, 2002
- Melck,D.; De Petrocellis,L.; Orlando,P.; Bisogno,T.; Laezza,C.; Bifulco,M.; Di,Marzo,V.: Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* **141.1**: 118-26, 2000
- Mendizabal, V.E.; Orliac,M.L.; Adler-Grashinsky,E.: Long-term inhibition of nitric oxide synthase potentiates effects of anandamide in the rat mesenteric bed *Eur J Pharmacol* **427**:251-262, 2001
- Moezi, L.; Rezayat,M.; Samini,M.; Shafaroodi,H.; Mehr, S.E .; Ebrahimkhani, M.R.; Dehpour,A.R.. Potentiation of anadamide effects in mesenteric beds isolated from bile duct-ligated rats:role of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* **486**:53-59, 2004
- Molderings, G.; Likungu,J.J.; Gothert,M.: Presynaptic cannabinoid and imidazoline receptors in the human heart and their potential relationship. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **360.2**: 157-64, 1999
- Monhenius, R.; Azami,J.; Green,D.L.; Roberts,M.H.T. CB1 receptor mediated analgesia from the Nucleus Reticularis Gigantocellularis pars alpha is activated in an animal model of neurophatic pain. *Brain Res*, **908(1)**:67-74,2001.
- Morisset ,V.; Ahluwalia,J.; Nagy,I.; Urban,L. Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. *Eur.J.Pharmacol*, **429**:93-100, 2001
- Mukhopadhyay,S.; Chapnick,B.M.; Howlett,A.C.: Anandamide-induced vasorelaxation in rabbit aortic rings has two components: G protein

- dependent and independent. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* **282(6)**: H2046-H2054, 2002
- Muller-Vahl,K.R.; Kolbe,H.; Schneider,U.; Emrich,H.M.: Cannabinoids: possible role in patho-physiology and therapy of Gilles de la Tourette syndrome. *Acta Psychiatr Scand* **98**: 502-506, 1998.
- Munro,S.; Thomas.K.L.; Abu-Shaar,M.: Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**: 61-65, 1993.
- Nakazi,M.; Bauer,U.; Nickel,T.; Kathmann,M.; Schlicker,E.: Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**: 19-24, 2000.
- Niederhoffer,N.; Szabo,B.: Effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 on sympathetic cardiovascular regulation. *Br. J. Pharmacol* **126**: 457-466, 1999
- Niederhoffer,N.; Szabo,B.: Involvement of CB1 cannabinoid receptors in the EDHF-dependent vasorelaxation in rabbits. *Br. J. Pharmacol* **126**: 1383-1386, 1999
- Nieri,P.; Martinotti,E.; Testai,L.; Adinolfi,B.; Calderone,V.; Breschi,M.C.. R+-methanandamide inhibits tracheal response to endogenously released acetylcholine via capsazepine-sensitive receptors *Eur.J.Pharmacol.* **459.1** : 75-81, 2003
- Offertáler,L.; Mo,F-M.; Bátkai,S.; Liu,J.; Begg,M.; Razdan,R.K.; Martin,B.R.; Bukoski,R.D.; Kunos.: Selective ligands and cellular effectors of a G Protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* **63**: 699-705, 2003
- O'Sullivan, S. E., D. A. Kendall, and M. D. Randall. Heterogeneity in the mechanisms of vasorelaxation to anandamide in resistance and conduit rat mesenteric arteries. *Br.J.Pharmacol*, 2004. (en prensa)
- O'Sullivan,S.E.; Kendall,D.A.; Randall,M.D. Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine (NADA). *Br J Pharmacol* **141**: 803-812, 2004

-
- Paulvannan, K.; Chen, T.; Hale, R. An improved synthesis of 1,2,4-triazoles using Ag₂CO₃. *Tetrahedron* **56**: 8071-8076, 2000
- Pertwee, R. G.: Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem.Soc.Trans.* **26.2**: 267-72, 1998
- Pertwee, R. G.: Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol.Ther.* **74.2**: 129-80, 1997
- Pertwee, R. G.: Pharmacology of cannabinoid receptors. En anales del first european workshop on cannabinoid research. P7, Madrid, 2003
- Pertwee,R.G.: Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology* **63**:596-611, 2001
- Pertwee,R.G.: Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* **48**: 859-867, 2001
- Pertwee,R.G.: Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* **6**: 635-664, 1999
- Pertwee,R.G.: The ring test: a quantitative method for assessing the "cataleptic" effect of cannabis in mice. *Br. J. Pharmacol.* **46**: 753-763, 1972
- Pertwee,R.G.; Fernando,S.R.: Evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse urinary bladder. *Br. J. Pharmacol* **118**: 2053-2058, 1996
- Pertwee,R.G.; Fernando,S.R.; Griffin,G.; Ryan,W.; Razdan,R.K.; Compton,D.R.; Martin,B.R.: Agonist-antagonist characterization of 6'-cyanohept-2'-yne- Δ^8 -tetrahydrocannabinol in two isolated tissue preparations. *Eur. J. Pharmacol* **315**: 195-201, 1996
- Pertwee,R.G.; Griffin,G.; Lainton,J.A.H.; Huffman,J.W.: Pharmacological characterization of three novel cannabinoid receptor agonists in the mouse isolated vas deferens. *Eur. J. Pharmacol* **284**: 241-247, 1995
- Pertwee,R.G.; Joe-Adigwe,G.; Hawksworth,G.M.: Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol* **296**: 169-172, 1996

- Pertwee,R.G.; Stevenson,L.A.; Elrick,D.B.; Mechoulam,R.; Corbett,A.D.: Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine. *Br. J. Pharmacol* **105**: 980-984, 1992
- Pertwee,R.G.; Stevenson,L.A.; Griffin,G.: Cross-tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN 55,212-2 and anandamide. *Br. J. Pharmacol* **110**: 1483-1490, 1993
- Piomelli,D.; Giuffrida,A.; Calignano,A.; Rodríguez de Fonseca,F.: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *TiPS* **21**: 218-224, 2000
- Porter,A.; Felder,C.C.: The endocannabiboid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.*, **90**:45-60,2000.
- Porter,A.C.; Sauer,J.M.; Knierman,M.D.; Becker,G.W.; Berna,M.J.; Bao,J.; Nomikos,G.W.; Carter,P.; Bymaster,F.P.; Leese,A.B.; Felder,C.C.: Characterization of a novel endocannabinoid, Virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **301(3)**: 1020-1024, 2002
- Portier,M-; Rinaldi-Carmona,M.;Pecceu,F.; Combes,T.; Poinot-Chazel,C.; Calandra,B.; Barth,F.; Le Fur,G.; Casellas, P.: Sr144528, an antagonist for the peripheral cannabinoid receptor that behaves as an inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther* **288(2)**:582-589, 1998
- Pratt,P.F.; Hillard, C.J.; Edgemond,W.S.; Campbell, W.B.: N-arachidonylethanolamide relaxation of bovine coronary artery is not mediated by CB1 cannabinoid receptor. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* **43**: H375-H381, 1998
- Ralevic,V.: Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission, *Eur. J. Pharmacol* **472**: 1-21, 2003
- Ralevic,V.; Kendall,D.A.: Cannabinoid inhibition of capsaicin-sensitive sensory neurotransmission in the rat mesenteric arterial bed. *Eur J Pharmacol* **418**: 117-125, 2001

- Ralevic,V.; Kendall,D.A.: Cannabinoids inhibit pre- and postjunctionally sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* **444**: 171-181, 2002
- Ralevic,V.; Kendall,D.A.; Jerman,J.C.; Middlemiss,D.N.; Smart,D.: Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* **424**: 211-219, 2001
- Ralevic,V.; Kendall,D.A.; Randall,M.D.; Smart,D.: Cannabinoid modulation of sensory neurotransmission via cannabinoid and vanilloid receptors: Roles in regulation of cardiovascular function. *Life Sciences* **71**: 2577-2594, 2002
- Ralevic,V.; Kendall,D.A.; Randall,M.D.; Zygmunt,P.M.; Movahed,P.; Högestätt,E.D.: Vanilloid receptors on capsaicin-sensitive sensory nerves mediate relaxation to methanandamide in the rat isolated mesenteric arterial bed and small mesenteric arteries. *Br. J. Pharmacol* **130**: 1483-1488, 2000
- Ramer,R.; Brune,K.; Pahl,A.; Hinz,B.: R(+)-methanandamide induces cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells via a non-cannabinoid receptor-mediated mechanism. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **286.5**: 1144-52, 2001
- Ramos Atance,J.A.; Fernandez Ruiz,J.: Cannabinoides: Propiedades químicas y aspectos metabólicos. *Adicciones. Monografía Cannabis* **12(2)**: 41-58, 2000
- Ramos Atance,J.A.; Fernandez Ruiz,J.: Sistema cannabinoide endógeno: Ligandos y receptores acoplados a mecanismos de transducción de señales. *Adicciones. Monografía Cannabis* **12(2)**: 59-81, 2000
- Ramos Atance,J.A.; Fernandez Ruiz,J.: Uso de los cannabinoides a través de la historia. *Adicciones. Monografía Cannabis* **12(2)**: 19-30, 2000
- Randal,M.D.: A new endothelial target for cannabinoids. *Mol Pharmacol* **63**: 469-470, 2003

- Randall, M. D., D. A. Kendall, and S. O'Sullivan. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br.J.Pharmacol.* **142.1**: 20-26, 2004
- Randall,M.D.; Alexander, S.P.H.; Bennett, T.; Boyd, E.A.; Fry, J.R.; Gardiner, S.M.; Kemp,P.A.; McCulloch, A.I.; Kendall, D.A.: An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 114-120, 1996
- Randall,M.D.; Kendall,D.A.: The involvement of an endogenous cannabinoid in EDHF-mediated vasorelaxation in the rat coronary vasculature. *Eur J Pharmacol* **335**: 205-209, 1997
- Randall,M.D.; Kendall,D.A.:Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act via a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol* **346**: 51-53, 1998
- Rhee,M.H.; Kim,S.K.: SR144528 as inverse agonist of CB2 cannabinoid receptor. *J Vet Sci* **3(3)**:179-184, 2002
- Richardson,J.D, Aanonsen,L.; Hargreaves,K.M. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur.J.Pharmacol.* **345**:145-153, 1998.
- Richfield,E.K.; Herkenham,M.: Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* **36**: 577-584, 1994.
- Rinaldi-Carmona,M.; Barth,F.; Heaulme,M.; Alonso,R.; Shire,D.; Congy,C.; Soubrie,P.; Breliere,J.C.; Le Fur,G.: Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci.* **56.23-24**: 1941-47, 1995
- Rinaldi-Carmona,M.; Barth,F.; Heulme,M.; Shire,D.; Calandra,B.: SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS lett* **350**:240-244, 1994.
- Rinaldi-Carmona,M.; Barth,F.; Millan,J.; Derocq,J.M.; Casellas,P.; Congy,C.; Oustric,D.; Sarran,M.; Bouaboula,M.; Calandra,B.; Portier,M.; Shire,D.; Breliere,J.C.; Le Fur,G.L.:SR 144528, the first potent and selective

- antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **284.2**: 644-50, 1998
- Rinaldi-Carmona,M.; Calandra,B.; Shire,D.; Bouaboula,M.; Oustric,D.; Barth,F.; Casellas,P.; Ferrara,P.; Le Fur,G.: Characterization of two cloned human CB1 Cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* **278(2)**: 871-878, 1998
- Romero,J.; de Miguel,R.; Ramos,J.A.; Fernandez-Ruiz,J.J.: The activation of cannabinoid receptors in striatonigral GABAergic neurons inhibited GABA uptake. *Life Sci.* **62.4** : 351-63, 1998
- Romero,J.; Garcia,L.; Cebeira,M.; Zadrozny,D.; Fernandez-Ruiz,J.J.; Ramos,J.A.: The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* **56.23-24** : 2033-40, 1995
- Ross,R.A. : Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol* **140**: 790-801, 2003
- Ross,R.A.; Craib,S.J.; Stevenson,L.A.; Pertwee,R.G.; Henderson,A.; Toole,J.; Ellington,H.C.: Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: Prostaglandin E2 ethanolamide. *JPET* **301**: 900-907, 2002
- Ross,R.A.; Gibson,T.M.; Brockie,H.C.; Leslie,M.; Pashmi,G.; Craib,S.J.; Di Marzo,V.; Pertwee,R.G.: Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br. J. Pharmacol* **132**: 631-640, 2001
- Rueda,D.; Galve-Roperh,I.; Haro,A.; Guzman,M.: The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol.Pharmacol.* **58.4**: 814-20, 2000
- Sañudo-Peña,M.C.; Patrick,S.L.; Khen,S.; Patrick,R.L.; Tsou,K.; Walker,J.M.: Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **248**: 171-174,1998.

- Shen,M.; Piser,T.M.; Seybold,V.S.; Thayer,S.A.: Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* **16**: 4322-4334, 1996.
- Shen,M.; Thayer,S.A.: Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Mol Pharmacol* **54**: 459-462, 1998.
- Shire,D.; Calandra,B.; Bouaboula, M.; Barth,F.; Rinaldi-Carmona,M.; Casellas,P.: Ferrara,P Cannabinoid receptor interactions with the antagonists SR141716A and SR144528. *Life Sci.* **65**:627-635, 1999
- Smart, D.; Jerman,J.C.: Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol.Sci.* **21.4**: 134, 2000
- Smart,D.; Gunthorpe,M.J.; Jerman,J.C.; Nasir,S.; Gray,J.; Muir,A.I.; Chambers,J.K.; Randall,A.D.; Davis,J.B.: The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br.J.Pharmacol.* **129.2**: 227-30, 2000
- Smith,P.B.; Compton,D.R.; Welch,S.P.; Razdan,R.K.; Mechoulam,R.; Martin,B.R.: The Pharmacological activity of Anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270(1)**: 219-227, 1994
- Smith,P.B.; Welch,S.P.; Martin,B.R.: Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **268**: 1381-1387, 1994.
- Stefano, G.B.; Esch,T.; Cadet,P.; Zhu,W.; Mantione,K.;Benson,H.: Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response. *Med Sci Monit.* **9(4)**: RA83-95, 2003
- Stefano,G.B.: Autoimmunovascular regulation: morphine and anandamide stimulated NO release. *Journal of Neuroimmunology* **83**: 70-76, 1998
- Stella, N.; Schweitzer,P.; Piomelli,D.: A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388.6644**: 773-78, 1997

- Straiker,A.J.; Maguire,G.; Mackie,K.; Lindsey,J.: Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 2442-2448, 1999.
- Sugiura,T.; Kodaka,T.; Nakane,S.:Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid Cb1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator?. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 838-843, 1998
- Sugiura,T.; Kondo,S.; Sukagawa,A.; Nakane,S.; Shinoda,A.; Itoh,K.; Yamashita,A.; Waku,K.: 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **215.1**: 89-97, 1995
- Sugiura,T.; Kondo,S.; Sukagawa,A.; Tonegawa,T.; Nakane,S.; Yamashita,A.; Waku,K.: Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca²⁺-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 113-117, 1996.
- Szabo,B.; Muller,T.; Koch,H.: Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J Neurochem* **73**: 1084-1089, 1999.
- Szabo,B.; Wallmichrath,I.; Mathonia,P.; Pfreundtner,C.: Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* **97.1** : 89-97, 2000
- Szallasi, A.; Blumberg,P.M.: Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharm Rev* **51(2)**: 160-202, 1999.
- Triggle, C.R.; Ding,H.: Endothelium-derived hyperpolarizing: is there a novel chemical mediator?. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**: 153-160, 2002
- Twitchell,W.; Brown,S.; Mackie,K.: Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **78**: 43-50, 1997.

-
- Van den Bossche,I; Vanheel, B. Influence of cannabinoids on the delayed rectifier in freshly dissociated smooth muscle cells of the rat aorta. *Br.J.Pharmacol.* **131.1**: 85-93, 2000
- Vanheel,B.; Van de Voorde,J.: Regional differences in anandamide- and methanandamide-induced membrane potential changes in rat mesenteric arteries. *J Pharmacol Exp Ther* **296(2)**: 322-328, 2001
- Varga,K.; Lake,K.; Martin,B.R.; Kunos,G.: Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* **278**: 279-283, 1995
- Vidrio, H.; Sanchez-Salvatori,M. A.; Medina,M.: Cardiovascular effects of (-)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **28.2** : 332-36 1996
- Wagner,J.A.; Varga,K.; Ellis,E.F.; Rzigalinski,B.A.; Martin,B.R.; Kunos,G.: Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* **390.6659** : 518-21, 1997
- Wagner,J.A; Jarai,Z; Bátkai,S.; Kunos,G : Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*, **423**: 203-210, 2001
- Watanabe,H.; Vriens,J.; Prenen,J.; Droogmans,G.; Voets,T.; Nilius,B.: Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**: 434-438, 2003
- Watson,S.J.; Benson,J.A.; Joy,J.E.: Marijuana and medicine: assessing the science base: a summary of the 1999 Institute of medicine report. *Arch Gen Psychiatry* **57**: 547-552, 2000.
- White, R. and C. R. Hiley. The actions of the cannabinoid receptor antagonist, SR 141716A, in the rat isolated mesenteric artery. *Br.J.Pharmacol.* **125.4**: 689-96, 1998
- White,R.; Hiley,C.R.: The actions of some cannabinoid receptor ligands in the rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol* **125**: 533-541, 1998

- White,R.; Ho,W.S.; Bottrill,F.E.; Ford,W.R.; Hiley,C.R.: Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* **134**: 921-929, 2001
- Williams,C.M.; Kirkham,T.C.: Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* **143**: 315-317, 1999.
- Williamson,E.M.; Evans, F.J.: Cannabinoids in clinical practice. *Drugs*, **60(6)**:1303-1314, 2000.
- Xu, L.; Izenwasser, S.; Katz, J. L.; Kopajtic, T.; Klein-Stevens,C.;. Synthesis and biological evaluation of 2-substituted3,-tolyltropane derivatives at dopamine, serotonin, and norepinephrinetransporters. *J. Med. Chem.* **45**, 1203-1210, 2002
- Zhang,Y.; Tazzeo,T.; Hirota,S.; Janssen,L.J.: Vasodilatory and electrophysiological actions of 8-iso-Prostaglandin E2 in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* **305**: 1054-1060, 2003.
- Zoratti, C.; Kipmen-Korgun,D.; Osibow,K.; Malli,R.; Graiger,W.F.: Anadamide initiates Ca²⁺ signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol* **140**: 1351-1362, 2003
- Zygmunt, P. M.; Andersson,D.A.; Högestätt,E.D.: Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabinol activate capsaicin-sensitive sensory nerves via a CB1 and CB2 cannabinoid receptor-independent mechanism. *J.Neurosci.* **22.11**: 4720-27, 2002
- Zygmunt, P. M.; Andersson,D.A.; Högestätt,E.D.: Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery. *Br.J.Pharmacol.* **122.8**: 1679-86, 1997
- Zygmunt,P.M.; Edwards,G.; Weston,A.H.; Davis,S.C.; Hogestatt,E.D.: Effects of cytochrome P450 inhibitors on EDHF-mediated relaxation in the rat hepatic artery. *Br.J.Pharmacol.* **118.5**: 1147-52, 1996
- Zygmunt,P.M.; Petersson,J.; Andersson,D.A.; Chuang,H.; Sörgård,M.; Di Marzo,V.; Julius,D.; Högestätt,E.D.: Vanilloid receptors on sensory nerves mediated the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452-457, 1999

